

Korištenje adenovirusnih vektora u istraživanju ciklusa tumorskih stanica

Pranjić, Blanka

Master's thesis / Diplomski rad

2008

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:645812>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Blanka Pranjić

Korištenje adenovirusnih vektora u istraživanju
ciklusa tumorskih stanica

Diplomski rad

Zagreb, 2008

Ovaj diplomski rad predan je na ocjenu Biološkom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u svrhu stjecanja zvanja
dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković pod voditeljstvom dr.sc. Marijete Kralj i suvoditeljstvom doc.dr.sc. Maje Matulić.

Zahvaljujem najprije svojoj mentorici, dr. Marijeti Kralj za praćenje mog rada, na velikom trudu, podršci, strpljenju, prijateljstvu te nevjerojatnoj i nesebičnoj pomoći.

Također zahvaljujem doc. dr. Maji Matulić što je za vrijeme studija usmjerila moj znanstveni interes, pružila mi podršku i savjetovala me.

Zahvaljujem dipl. ing. Marku Marjanoviću za strpljivo vođenje mog rada, savjetovanje i spremnosti na pomoći u svakoj situaciji, na izvanrednom objašnjavanju teoretskih dijelova ovog rada, podršci i prijateljstvu.

Zahvaljujem svim ostalim djelatnicima Zavoda za molekularnu medicinu na susretljivošću i savjetima i ugodnom društvu.

Zahvaljujem svojoj obitelji.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

KORIŠTENJE ADENOVIRUSNIH VEKTORA U ISTRAŽIVANJU CIKLUSA TUMORSKIH STANICA

Blanka Pranjić
Zavod za molekularnu medicinu
Institut Ruđer Bošković, Bijenička 54, Zagreb

SAŽETAK

Poremećaj regulacije staničnog ciklusa uzrokuje nekontroliranu proliferaciju stanica te je jedan od glavnih uzroka pojave raka. Postoji niz gena koji reguliraju stanični ciklus i čuvaju stanice od zloćudne preobrazbe, među kojima je gen $p21^{WAF1/CIP1}$ čiji proteinski produkt je inhibitor kompleksa kinaze ovisne o ciklinu (CDK) i ciklina. Njegova povećana ekspresija u tumorskim stanicama predstavlja potencijalno oružje u genskom liječenju raka, međutim istraživanje njegove uloge ukazuje na niz kontradiktornih rezultata zbog kojih je nužno dodatno rasvijetliti njegovu ulogu u tumorskim stanicama. U ovom je radu praćen utjecaj povećane ekspresije gena $p21$ unošenjem njegove cDNA replikacijski nesposobnim adenovirusnim vektorima (Ad5-p21) u tumorske stanice karcinoma debelog crijeva SW480 i SW620, koje potječu od istog pacijenta, ali imaju različit stupanj zloćudne preobrazbe. Kao kontrolni vektor je korišten adenovirus s ugrađenim genom dojavljivačem (Ad5-β-gal). Oba vektora umnožena su u visokoj koncentraciji u komplementirajućim stanicama HEK 293, izolirana i pročišćena. Virusni titar je izmjeren određivanjem koncentracije ukupnih i infektivnih virusnih čestica. Djelotvornost transdukcije stanica karcinoma debelog crijeva SW620, SW480, a i HCT116 adenovirusnim vektorom Ad5-β-gal određena je praćenjem pojave plavog obojenja aktivnošću enzima β-galaktozidaze. Uočena je slabija djelotvornost transdukcije SW620 stanica putem Ad5-β-gal u odnosu na SW480 i HCT116 stanice. Također je primijećeno toksično djelovanje samog vektora na tumorske stanice, poglavito na stanice SW620. Utjecaj Ad5-p21 i Ad5-β-gal na stanični ciklus SW620 i SW480 stanica praćen je metodom protočne citometrije. Povećana ekspresija gena $p21$ izaziva zastoj u G1 fazi staničnog ciklusa stanica SW480. Njegova je uloga u stanicama SW620 upitna zbog snažnog utjecaja samog adenovirusnog vektora na stanični ciklus, budući da je uočen zastoj staničnog ciklusa u G2 fazi nakon zaražavanja stanica s kontrolnim vektorom Ad5-β-gal. Kako i sami adenovirusni vektori mogu utjecati na stanični ciklus te uzrokovati lažne rezultate, potreban je izuzetan oprez kod njihovog korištenja u istraživanju gena koji reguliraju stanični ciklus.

(63 stranice, 37 slika, 2 tablice, 64 literaturnih navoda, hrvatski jezik)

Ključne riječi: stanični ciklus, gen $p21^{WAF1/CIP1}$, adenovirus, rak

Voditelji: dr.sc. Marijeta Kralj, viši znanstveni suradnik i doc.dr.sc. Maja Matulić

Ocjenjivači: doc. dr. sc. Maja Matulić
dr. sc. Marijeta Kralj, viši znanstveni suradnik
prof. dr. Nada Oršolić
prof. dr. Željka Vidaković-Cifrek

Rad je prihvaćen: listopad, 2008

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Diploma thesis

CELL CYCLE ANALYSIS OF TUMOR CELLS USING ADENOVIRAL VECTORS

Blanka Pranjić
Division of Molecular Medicine
Ruđer Bošković Institute, Bijenička 54, Zagreb

ABSTRACT

Deregulation of the cell cycle induces uncontrolled cell proliferation and is one of the main causes of cancer development. A variety of genes has cell cycle regulating properties and can therefore protect cells from malignant transformation. An example is $p21^{WAF1/CIP1}$ which is an inhibitor of cyclin-dependent kinases (CDK)/cyclin complexes. Overexpression of $p21^{WAF1/CIP1}$ in tumor cells might represent a potential tool for cancer gene therapy. However, the study of $p21^{WAF1/CIP1}$ functions in tumor cells revealed contradictory findings and therefore it is necessary to clarify its role in tumor cells with different genetic background. The effect of $p21^{WAF1/CIP1}$ overexpression was monitored by introducing $p21$ cDNA into colon carcinoma cells SW480 and SW620, using the replication-deficient recombinant adenoviral vectors. These cell lines were derived from the same patient, but from cells with different level of malignancy. Adenoviral vector containing the reporter gene for β -galactosidase was used as a control. Both vectors were propagated in HEK 293 helper cells in high concentrations, isolated and purified. Viral titer was determined measuring the concentration of total and infectious viral particles. The efficiency of transduction of colon carcinoma cells SW620, SW480, as well as HCT116, with adenoviral vectors was determined by β -galactosidase staining of infected cells. Transduction of SW620 with Ad5- β -gal had lower efficiency, as compared to SW480 and HCT116. In addition, a vector related toxic effect on tumor cells was detected, in particular on SW620 cells. The effect of Ad5- $p21$ and Ad5- β -gal on the cell cycle of SW620 and SW480 cells was monitored by flow cytometry. $p21^{WAF1/CIP1}$ overexpression in SW480 cells induced cell cycle arrest in G1 phase. In SW620, a strong effect of the vector itself, Ad5- β gal, was detected, resulting in G2/M arrest. Since the adenoviral vector itself can effect the cell cycle leading to false results, their use in the investigation of the cell cycle regulating genes should be handled with care.

(63 pages, 37 figures, 2 tables, 64 references, original in Croatian language)

Keywords: cell cycle, $p21^{WAF1/CIP1}$ gene, adenovirus, cancer

Supervisors: Dr. Marijeta Kralj, Senior Research Associate and Prof. Dr. Maja Matulić, Assistant Professor

Reviewers: Prof. Dr. Maja Matulić, Assistant Professor
Dr. Marijeta Kralj, Senior Research Associate
Prof. Dr. Nada Oršolić, Associate Professor
Prof. Dr. Željka Vidaković-Cifrek, Associate Professor

Thesis accepted: October, 2008.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Stanični ciklus	2
1.1.1. Protein p21 ^{CIP1/WAF1}	4
1.2. Prijenos genetičkog materijala	8
1.2.1. Nevirusni sustav prijenosa gena	8
1.2.2. Virusni sustav prijenosa gena	9
1.2.3. Adenovirusi i adenovirusni vektori	9
1.2.3.1. Struktura adenovirusa	10
a) Genom adenovirusa	10
b) Proteinska ljuska adenovirusa	11
1.2.3.2. Životni ciklus adenovirusa	13
1.2.3.3. Konstrukcija rekombinantnih adenovirusnih vektora	14
1.2.3.4. Prednosti i nedostaci adenovirusa	15
1.3. CILJ RADA	17
2. MATERIJALI I METODE	18
2.1. Uspostavljanje staničnih kultura	19
2.1.1. Uzgoj stanica	19
2.1.2. Brojanje stanica	19
2.2. Konstrukcija rekombinantnog adenovirusnog vektora	20
2.3. Umnožavanje adenovirusnih vektora	21
2.3.1. Zaražavanje stanica HEK 293	21
2.3.2. Sabiranje zaraženih stanica HEK 293	21
2.4. Pročišćavanje adenovirusnih vektora	22
2.4.1. Ultracentrifugiranje u gradijentu gustoće cezijevog klorida	22
2.4.2. Dijaliza	24
2.5. Određivanje virusnog titra	25
2.6. Određivanje koncentracije adenovirusnih čestica u suspenziji pročišćenih adenovirusa	26

2.7. Određivanje broja infektivnih virusnih čestica korištenjem gena dojavljivača β -galaktozidaze	27
2.8. Određivanje djelotvornosti transdukcije bojenjem na β -galaktozidaznu aktivnost	28
2.9. Određivanje staničnog ciklusa protočnom citometrijom	29
2.9.1. Određivanje utjecaja Ad5-p21 i Ad5- β -gal na stanični ciklus	30
2.9.1.1. Zaražavanje stanica raka debelog crijeva sa Ad5-p21 i Ad5- β -gal	30
2.9.1.2. Priprema za protočni citometar	30
2.9.1.3. Analiza staničnog ciklusa	31
2.9.1.4. Obrada rezultata	31
3. REZULTATI	33
3.1. Određivanje virusnog titra	34
3.1.1. Određivanje broja infektivnih čestica	34
3.1.2. Određivanje broja infektivnih virusnih čestica korištenjem gena dojavljivača β -galaktozidaze	34
3.1.3. Određivanje koncentracije adenovirusnih čestica u suspenziji pročišćenih adenovirusa	35
3.2. Određivanje djelotvornosti transdukcije bojenjem na β -galaktozidaznu aktivnost u kulturi stanica	37
3.3. Analiza utjecaja Ad5-p21 i Ad5- β -gal na stanični ciklus	41
4. RASPRAVA	48
5. ZAKLJUČAK	57
6. LITERATURA	59

1. UVOD

Rak je krajnja točka nakupljanja višestrukih mutacija koja rezultira fenotipom karakteriziranim nekontroliranim rastom stanica.¹ Razvojem molekularne biologije otkrivaju se mehanizmi nastanka raka i uloga imunološkog sustava u tom procesu, ali i različite strategije uništenja promijenjenih stanica.² Usprkos izvanrednom napretku u razumijevanju raka ključne molekularne promjene u višestepenom procesu nastanka raka su još uvijek nepoznate. Bolje razumijevanje ovih procesa će rezultirati produkcijom učinkovitijih terapija.³ U napretku bolesti aktivacija onkogeni i inaktivacija regulatora staničnog ciklusa (tumor supresorskih gena) je presudna. Tumor supresorski geni sudjeluju u ključnim funkcijama stanice kao što su prijenos signala, transkripcija gena i kontrola stanične proliferacije i stanične smrti. Gubitak i/ili mutacija, ponekad samo jednog alela, ovih gena pridonosi malignom fenotipu. Teoretski, supstitucija mutiranih ili deletiranih tumor supresorskih gena sa funkcionalnom kopijom bi mogla popraviti oštećenje i obnoviti normalne funkcije stanice.³

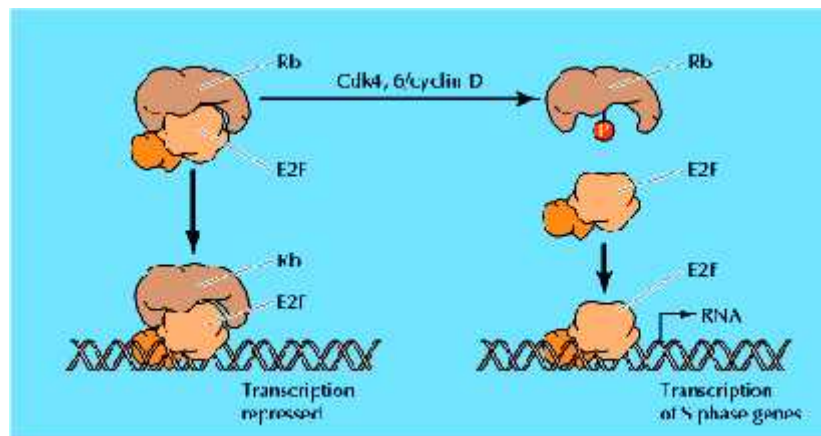
U zadnjih nekoliko godina povećava se interes za biokemijske mehanizme uključene u regulaciju staničnog ciklusa, njegovu progresiju i smrt stanice. Ključne odluke stanice na rast, diferencijaciju ili ulazak u mirovanje, starenje i programiranu staničnu smrt su kontrolirani putem brojnih međusobno povezanih i kompleksnih signalnih puteva. Mutacije u bilo kojem od gena uključenih u te regulatorne signalne puteve predstavljaju potencijalan mehanizam koji vodi karcinogenezi. Stoga, temeljni cilj bazičnih istraživanja regulacije staničnog ciklusa i karcinogeneze je razvoj novih strategija liječenja kao alternativna ili pomoćna terapija uz konvencionalnu kemoterapiju i terapiju zračenjem.³

1.1. Stanični ciklus

Zadaća staničnog ciklusa je osigurati vjernu kopiju DNA i raspodijeliti je na dvije stanice kćeri. Vrijeme i redoslijed događaja u staničnom ciklusu strogo su regulirani nizom gena čiji produkti čine različite kontrolne sustave. Prijelaz u pojedinu fazu staničnog ciklusa, kao što su prijelaz iz G1 u S fazu i prijelaz iz G2 u M fazu reguliran je tzv. kontrolnim točkama. Kontrolne točke čine niz sustava koji omogućavaju proliferaciju stanice (prijelaz u sljedeću fazu) samo u prisustvu stimulatornih signala (npr. čimbenika rasta), a

istodobno inhibiraju ciklus u slučaju pogreške na DNA ili diobenom vretenu.^{4,5} Pogreške u ovim kontrolnim sustavima dovode do genetičke nestabilnosti, kao što su delecije, amplifikacije, translokacije, poliploidije ili aneuploidije, odnosno dovode do pojave tumora.^{4,6} Progresiju stanice kroz stanični ciklus omogućavaju kinaze ovisne o ciklinu (CDK, od engl. *cyclin dependent kinases*).⁷

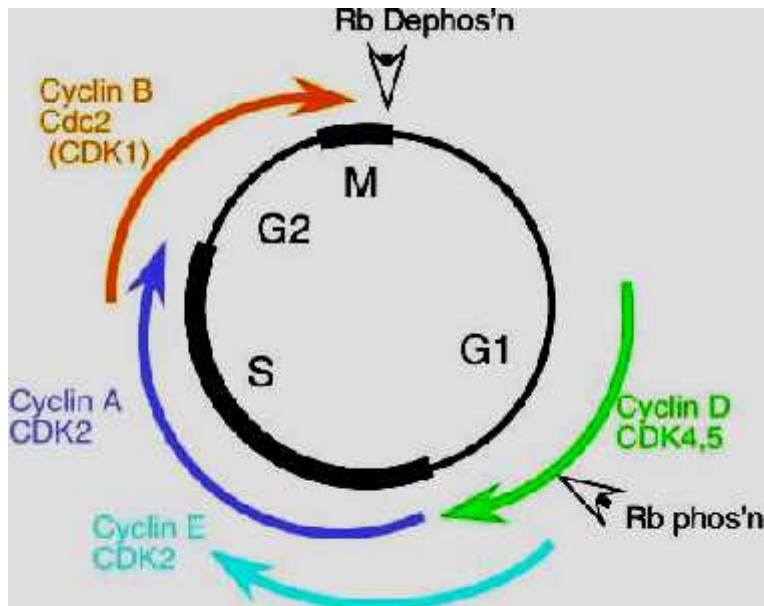
Nakon stimulacije stanice nekim mitogenim signalom (prijelaz iz G_0 u G_1 fazu) dolazi do nakupljanja ciklina D koji potom veže kinaze CDK4 i CDK6. Glavni supstrat ovih kompleksa je proteinski produkt gena *Rb*. Retinoblastoma protein (pRb) je glavni negativni regulator staničnog ciklusa. Ukoliko pRb nije fosforiliran, veže se na transkripcijski faktor E2F i tako ga inaktivira. Kada kompleks ciklin-D/CDK4/6 fosforilira pRb, pRb otpušta transkripcijski faktor E2F. E2F tada dovodi do transkripcijske aktivacije gena odgovornih za ulazak u S fazu staničnog ciklusa (slika 1).^{7,8}



Slika 1: Regulacija E2F transkripcijskog faktora; preuzeto iz knjige: The Cell, Cooper (2000)⁹

E2F potiče sintezu ciklina E i A. Aktivnost kompleksa ciklina E i CDK2 neophodna je za prijelaz iz G_1 u S fazu (slika 2), dok kompleks ciklina A i CDK2 omogućava progresiju kroz S fazu. Aktivnost ciklina A/CDK2 ostaje visoka tijekom G_2 i rane mitoze da ne bi došlo do replikacije DNA. Istovremeno, tijekom G_2 faze raste sinteza ciklina B, odgovornog za ulazak u mitozu. Kompleks ciklina B i CDK1 je reguliran nizom fosforilacija i defosforilacija mehanizmima povratne sprege da bi se omogućio nagli početak mitoze. Isto tako, mehanizmi povratne sprege dovode do inaktivacije mitotskog

kompleksa nakon anafaze i razgradnje ciklina B, izlaska iz mitoze i ponovne rekonstitucije dijelova stanice.^{7,8}



Slika 2: Stanični ciklus; preuzeto sa stranice: <http://www-rcf.usc.edu/~forsburg/images/CDKcyclins.jpg>¹⁰

U mehanizmima regulacije staničnog ciklusa sudjeluju i specifični inhibitori kinazne aktivnosti kompleksa ciklina i njihovih kinaza, tzv. inhibitori kinaza ovisnih o ciklinu (CKI). Jedan od takvih inhibitora CDK je p21 protein.¹¹

1.1.1. Protein p21^{CIP1/WAF1}

Protein p21 je član obitelji Kip/Cip, široke grupe inhibitora kinaza ovisnih o ciklinu. Ovaj inhibitor je istovremeno otkriven od dvije istraživačke grupe i nazvan je Waf1 (od engl. *wild-type p53-activated fragment*) i Cip1 (od engl. *CDK-interacting protein 1*). Kao što samo ime govori p21^{CIP1/WAF1} je pod kontrolom p53 tumor supresor gena, koji inducira apoptozu u oštećenim stanicama.¹²

p21 je inhibitor kompleksa kinaza ovisnih o ciklinu i ciklina što ga čini regulatorom staničnog ciklusa. Taj protein također inhibira replikaciju DNA, te svojim proteinskim interakcijama regulira transkripciju gena i utječe na apoptozu.¹³ p21 je nuklearni protein koji je uključen u mehanizam nastanka zastoja staničnog ciklusa koji omogućuje stanici popravak oštećenja DNA, diferencijaciju i dovodi do apoptoze.¹⁴ Kao odgovor na

oštećenje DNA aktivira se tumorski supresor p53. Tumor supresori sudjeluju u normalnom funkcioniranju staničnog ciklusa, sprečavajući nekontrolirano djeljenje stanica odnosno pojavu tumora. Aktivacija p53 rezultira transkripcijom niza gena među kojima je i gen *p21*.¹⁵ Aktivacija p21 proteina uzrokuje zastoj ciklusa u G1 fazi staničnog ciklusa. p21 inhibira kompleks ciklin D/CDK4 i ciklin E/CDK2 koji su nužni za prijelaz iz restriksijske točke, odnosno iz G1 u S fazu staničnog ciklusa.^{9,13} Prijelaz ciklin/CDK kompleksa iz aktivnog u inaktivno stanje je uzrokovano promjenom količine p21 proteina vezanog za taj kompleks. Aktivni kompleks sadrži vezanu samo jednu molekulu p21 proteina, za razliku od inaktivnog kompleksa koji na sebe ima vezanu više od jedne molekule.¹⁷ p21 također inhibira kompleks ciklin A/CDK2 prije prijelaza iz S u G2 fazu staničnog ciklusa.¹⁶ p21 protein dakle ima također važnu ulogu kontrolne točke u G2 fazi. Ekspresija p21 u G2 fazi izaziva zastoj staničnog ciklusa.¹⁸



Slika 3: Prikaz glavnih interakcijskih regija i mjesta fosforilacije: Cyclin- regija koja veže cikline, CDK- regija koja veže kinaze ovisne o ciklinu, NLS- sekvenca odgovorna za smještaj u jezgri (od engl. *nuclear localisation signal*); preuzeto iz Child i sur. (2006)¹³

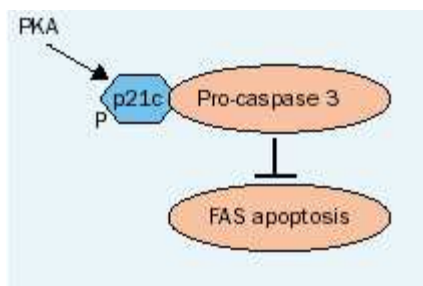
Protein p21 je nestrukturirani protein koji usvaja različite konformacije ovisno o ciljnom proteinu kojeg susreće i s kojim će se vezati. Prilikom vezanja sa ciklinima ili kinazama ovisnim o ciklinu amino-kraj p21 proteina formira visoko organiziranu strukturu u kojoj udaljene aminokiselinske regije, evolucijski očuvane i u drugim proteinima (kao npr. E2F-1 ili Cdc25A), ulaze u interakciju s hidrofobnim regijama na površini ciklina ili kinaza ovisnih o ciklinu. Karboksilni kraj je slabo očuvan među tim proteinima omogućavajući izvršavanje različitih uloga. Jedna od prvih opisanih uloga karboksilnog kraja p21 proteina je interakcija s proliferirajućim antigenom PCNA (od engl. *proliferating cell nuclear antigen*) putem aminkiselina R₁₄₃-S₁₆₀. PCNA je dio kompleksa DNA polimeraze δ i ξ i vezivanje p21 proteina na njega prekriva vezna mjesta za proteine esencijalne za replikaciju DNA (slika 3).¹³ p21 može sudjelovati i u regulaciji genske ekspresije, kooperirati s transkripcijskim koaktivatorom CBP/p300 u pojačavanju

djelovanja nekih transkripcijskih faktora. p21 ulazi u interakcije s nekoliko transkripcijskih faktora uključenih u kontrolu staničnog ciklusa, kao što su E2F i c-Myc te tako smanjuje ekspresiju gena potrebnih za progresiju kroz ciklus.¹⁹

Mnoge fiziološke uloge p21 proteina ovise o samom smještaju ovog proteina. Uloge p21 proteina smještenog u jezgri su inhibicija kinaza ovisnih o ciklinu uzrokujući zaustavljanje staničnog ciklusa kao odgovor na oštećenje DNA (općenito ovisno o aktivaciji p53 proteina), stimulacija diferencijacije te starenje stanica. p21 je pozitivni i negativni regulator progresije ciklusa u G1. Bazalne razine p21 potrebne su za nastanak i aktivnost kompleksa ciklina i njihovih kinaza. Visoke razine p21 blokiraju aktivnost kompleksa ciklina E/CDK2 i ciklina D/CDK4/6. Također, progresija kroz S fazu se blokira vezanjem i inhibicijom proliferirajućeg antigena i DNA metiltransferaze. Međutim, p21 ne interferira s procesima popravka. Kao član obitelji inhibitora KIP može inhibirati aktivnost raznih kinaza ovisnih o ciklinu u kompleksu sa ciklinima, pa tako i ciklina B koji je ključan za prijelaz iz G2 faze u mitozu. Takvi protu-proliferativni učinci p21 proteina su potpomognuti njegovom sposobnošću vezanja na PCNA i prekidanja sinteze DNA.¹³ Nasuprot njegovim protu-proliferativnim funkcijama, p21 ima pro-proliferativne funkcije uzrokujući preživljavanje stanica. Omogućava vezanje ciklina D s CDK4 i CDK6, njihovu translokaciju u jezgru te sprečava njihov izlazak iz jezgre. Rezultat toga je povišena razina kompleksa ciklina-D/CDK4/6 za inicijaciju fosforilacije pRB proteina, stimulirajući prolazak kroz G1 fazu staničnog ciklusa. Slično tome, aktivacija ciklin B/CDK1 kompleksa je ovisna o p21 u G2 fazi.

p21 ima ulogu u odgovoru stanice na apoptotski signal. S jedne strane, kao odgovor na oštećenje DNA zaustavlja ciklus. Supstrat je aktivirane kaspaze 3 u terminalnoj fazi apoptoze. S druge strane, citoplazmatski p21 se može vezati za prokaspazu 3 i spriječiti njenu aktivaciju, sprečavajući tako apoptozu u kojem Fas igra ulogu posrednika. Protein p21 inhibira i pro-apoptotske kinaze ASK1 (interakcija koja se odvija u citosolu) potvrđujući svoju ulogu inhibitora apoptoze. Funkcija i stabilnost p21 proteina se mijenja ovisno o njegovoj lokalizaciji i vezivanju na pojedine proteine te o stanju fosforilacije. Protein p21 koji se nalazi u jezgri regulira različite transkripcijske odgovore i promjene stanja metilacije DNA. Kao kod većine regulatora staničnog ciklusa poluvrijeme života p21 proteina je relativno kratko (kraće od jednog sata) omogućavajući stanici brz

odgovor na promjene.¹³ Fosforilacija p21 proteina na specifičnim serinskim i treoninskim ostacima objašnjava kontradiktorne funkcije tog proteina. Fosforilacija proteina je ključni regulatorni mehanizam koji omogućava različite unutarstanične procese promjenom svojstava proteina kao što su stabilnost, unutarstanična lokalizacija, afinitet vezivanja drugih proteina, katalitička aktivnost itd.¹³ Fosforilacija p21 proteina na treoninu 145 putem serinske treoninske kinaze Akt dovodi do promjene svojstava tog proteina. Prva posljedica je da p21 gubi sposobnost vezivanja na PCNA, čime se omogućava replikacija DNA. Druga pojava je relokalizacija proteina p21 iz jezgre u citosol. Tu p21 može doći u interakciju s prokaspazom 3 i sprečava apoptozu posredovanu proteinom Fas (slika 4).²⁰ Izlazak p21 iz jezgre također povećava vezanje za ciklin-D/CDK kompleks.



Slika 4: Fosforilacija p21 inhibira apoptozu; preuzeto iz Swanton (2004)²¹

Iako još nisu razjašnjeni učinci fosforilacije p21 proteina jasno je da ta modifikacija uzrokuje velike promjene funkcije ovog proteina. Za liječenje raka je važno ustanoviti razinu p21 proteina te njegov fosforilacijski status, budući da mnoge brzo proliferirajuće stanice raka pokazuju čak povišenu razinu p21 proteina što je suprotno očekivanju. Vjerojatno su takve stanice raka specifično fosforilirane na treoninu 57/145 ili serinu 46/130.¹³ Povećana ekspresija p21 proteina je u takvim stanicama povezana s povećanom sposobnošću preživljavanja stanica. Time se možda može objasniti i zašto još nije uočena mutacija ovog gena u tumorima.^{16,22}

S druge strane, p21 može djelovati pro-apoptotski. Uočena je povećana ekspresija p21 proteina nakon zračenja stanica čime se sprečava njihova proliferacija.²³ Mimosin (β -[N-(3-hidroksi-4-piridon)]- α -aminopropionska kiselina), koji se nalazi u listovima i sjemenkama biljke *Mimosa pudica*, inhibira rast tumorskih stanica povećavajući ekspresiju p21 proteina.¹⁷ Dakle, uloga p21 proteina u tumorima je kompleksna zbog toga što posjeduje pro- i antiapoptotske učinke. Njegovu je primjenu i korisnost u

konvencionalnoj ili genskoj terapiji potrebno istražiti. Također je bitno ustanoviti unutarstaničnu razinu p53 i p21 proteina za predviđanje ishoda određene terapije. Kako je p21 prekomjerno eksprimiran u nekim tumorima u naprednom stadiju njegova inhibicija može pospješiti kemoterapiju.²² Neke od metoda za istraživanje utjecaja prekomjerne ekspresije gena *p21* koriste se i u genskom liječenju.

Gensko liječenje je genetička modifikacija stanica s nasljednom ili stečenom promjenom genoma, kojom se poremećeni gen nastoji zamijeniti normalnim, kako bi se bolest izliječila ili barem ublažila.²⁴ Genskim se liječenjem ustaljeni princip liječenja lijekovima, kojim se zapravo samo uklanjaju simptomi bolesti, zamjenjuje novim pristupom kojim se bolest napada upravo na njenom izvoru, popravljanjem genetičke pogreške u nekim od stanica bolesnika.²⁵

1.2. Prijenos genetičkog materijala

Ključ uspjeha genskog liječenja nije samo u pronalaženju pogodnog terapijskog gena, nego i u korištenju dobrog vektora koji će dopremiti gen do ciljnih stanica učinkovito i točno. Pouzdanost metoda prijenosa gena ovisi o sposobnosti ciljanog prijenosa i o jačini ekspresije gena. Vektor ili prijenosnik je posebno konstruirana molekula DNA, koja se koristi za prienos genetičkog materijala u ciljnu stanicu. Jedinstveni i idealni vektor još uvijek ne postoji, budući da različiti pristupi liječenju zahtijevaju različite vektore.

Općenito se dobrim karakteristikama vektora smatraju: visoka učinkovitost prijenosa gena, veliki kapacitet ugradnje strane DNA u vlastiti genom, specifičnost za ciljne stanice, kontrolirana ekspresija gena, bezopasna uporaba po čovjeka i okolinu, mogućnost jeftine produkcije u visokim koncentracijama, te neimunogeničnost i neizazivanje upale. Vektori se mogu podijeliti po podrijetlu na virusne i nevirusne.²⁶

1.2.1. Nevirusni sustav prijenosa gena

Nevirusne vektore je relativno jednostavno konstruirati. Mogu prenijeti velike odsječke strane DNA s mnogo kontrolnih elemenata i nisu patogeni niti imunogenični, ali su i manje učinkoviti od virusnih. Velik im je nedostatak što ne mogu specifično ulaziti u stanice. Nevirusne vektore možemo unijeti u stanicu raznim metodama.

Kemijske metode prijenosa gena su metode koprecipitacije plazmidne DNA s kalcijevim fosfatom koji narušava integritet stanične membrane. Mehaničke metode su mikroinjektiranje, elektroporacija i bombardiranje česticama, a moguće je unositi vektore metodama zasnovanim na endocitozi i procesima lipofekcije kationskim ili anionskim liposomima.^{26,27}

1.2.2. Virusni sustav prijenosa gena

Već u počecima genskog liječenja virusi su privukli pažnju znanstvenika. Evolucijom su se specijalizirali za ulazak u stanice i ekspresiju svojih gena u tim stanicama. Kad bi im se eksperimentalno, metodama genetičkog inženjerstva uklonili geni odgovorni za replikaciju i virulenciju te se zamijenili potencijalno terapijskim genima, takvi bi promijenjeni, utišani virusi teoretski bili idealni za prijenos gena: prenijeli bi korisne, željene gene u stanice, a ne bi uzrokovali bolest.²⁴ Međutim, stabilnost transfekcije, kontrola ekspresije, opasnost razgradnje gena nukleazama, otežani ulaz gena iz citoplazme u jezgru te ugradnja u genom domaćina s mogućnošću uzrokovanja mutacija samo su neke od prepreka na koje nailaze pojedini virusni vektori u praktičnoj primjeni.²⁸ Prva modifikacija virusa u svrhu prenošenja stranih gena u stanicu objavljena je 1968. godine, a kao vektor je korišten virus mozaika duhana TMV (od engl. *tobacco mosaic virus*). Nakon toga je, u svrhu prijenosa gena u stanice sisavaca, konstruiran vektor od papiloma virusa majmuna SV40 u koji je ugrađen gen za globulin zeca te je uspješno unesen u stanice u kulturi.²⁹ Prvi rekombinantni vektor u koji je ugrađen gen čovjeka bio je retrovirusni vektor. U istraživanjima vezanim uz gensko liječenje danas se koristi više od 25 vrsta virusnih vektora, ali najčešće se upotrebljavaju retrovirusi i adenovirusi te adeno-pridruženi i herpes simpleks virusi.²⁵

1.2.3. Adenovirusi i adenovirusni vektori

Adenovirusi su najčešće korišteni vektori u genskoj terapiji raka. Otkriveni su 1953. godine kao uzročnici obične prehlade. Izolirani su iz adenoidnog tkiva po kojem su dobili i ime (od grč. adeno - žlijezda). Pripadaju porodici Adenoviridae. Postoji oko 53 različita serološka tipa adenovirusa. U kliničkoj praksi adenovirus je blagi patogen koji uzrokuje infekciju gornjih dišnih puteva, gastroenteritis i konjunktivitis. Može uzrokovati

encefalitis kod supresije imunološkog sustava, ali kod zdravih ljudi ne može prijeći krvno-moždanu prepreku. Gotovo 99% ljudske populacije razvija antitijela na najraširenije serotipove prije svoje 14.godine.³⁰

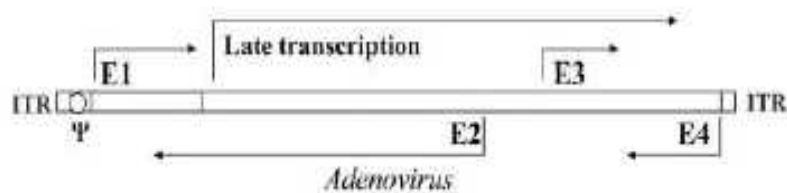
Usporedbom nukleotidne sekvence i hemaglutinacijskih svojstava adenovirusi se mogu podijeliti u 6 grupa serotipova: A,B,C,D,E i F. Adenovirus 5 (Ad5) koji spada u grupu C je korišten u ovom diplomskom radu.

1.2.3.1. Struktura adenovirusa

a) Genom adenovirusa

Genom adenovirusa čini dvolančana linearna DNA dugačka između 36-40 kb. Genom se sastoji od ranih i kasnih gena te gena za RNA-polimerazu III.³¹ Rani geni (E1-E4) su organizirani u 4 različite transkripcijske jedinice i svaki se prepisuje sa svog promotora, dok se ekspresija kasnih gena pokreće sa samo jednog promotora (slika 5).³²

Na svakom kraju genoma nalaze se obrnute ponavljajuće regije (ITR, od engl. *Inverted terminal repeats*) dugačke 103 parova baza unutar kojih su cis-aktivirajući elementi potrebni za replikaciju i pakiranje genoma. Signal za pakiranje dugačak 170 parova baza je smješten susjedno do ITR-regije. Taj signal stimulira oslobađanje virusnog genoma iz kapside uz pomoć virusnih proteina.³¹



Slika 5: Adenovirusni genom, ITR (od engl *inverted terminal repeats* = obrnute ponavljajuće sekvence, koje su nužne za razmnožavanje), ψ - signal za pakiranje; preuzeto iz Lee i sur. (2005)³²

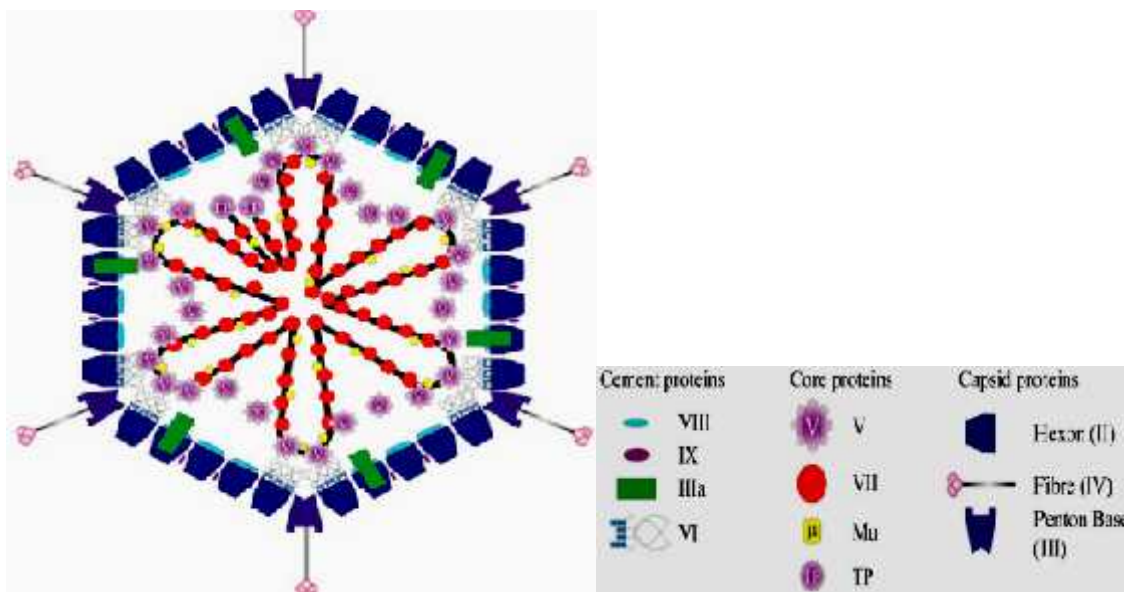
Prvi dio genoma koji se eksprimira je E1A regija (rana regija). Ekspresijom te regije nastaju dva proteina koji su odgovorni za transkripcijsku aktivaciju drugih viralnih promotora pospješujući prijelaz stanice domaćina iz G1 u S fazu staničnog ciklusa. Regija E1 je odgovorna za zloćudnu preobrazbu stanica. E1A protein se veže na tumor supresorski protein Rb i blokira njegovu ulogu u kontroli staničnog ciklusa. E1B genski

produkt od 19 kDa sprečava apoptozu induciranu putem E1A proteina, dok E1B genski produkt od 55 kDa stvara kompleks s genskim produktom E4 regije, Orf6 i s produktom tumor supresor gena *p53*. Slijedi ubikvitinizacija i razgradnja proteina *p53* čime se sprečava stanična smrt. E2A regija kodira DNA vezujući protein, dok E2B kodira DNA polimerazu i pre-terminalni protein. Izrezivanje E2B regije jako reducira sposobnost umnažanja virusne DNA i reducira imunološki odgovor na adenovirus. Produkti E3 regije su uključeni u izbjegavanje imunološkog odgovora. Proteinski produkt od 19 kDa E3 regije veže MHC molekule razreda I unutar lumena endoplazmatske mrežice, sprečavajući njihov prijenos na površinu stanica. E4 regija kodira proteine koji su uključeni u različite procese. Genski produkti Orf3 i Orf6 E4 regije inhibiraju prijenos stanične mRNA iz jezgre u citoplazmu, dok pospješuju izlazak virusne mRNA iz jezgre. Orf6 inhibira apoptozu posredovanu *p53* proteinom. Genski produkti kasnih gena su predominantno strukturni proteini virusa.³³

Proteini V, VII, X (mu) i terminalni protein (TP) su vezani uz adenovirusnu DNA i čine srž adenovirusne čestice. Adenovirusna cisteinska proteaza je također prisutna unutar viriona. Eksperimenti su pokazali da je moguća uloga DNA vezujućih proteina stvaranje strukture slične nukleosomu i zaštita virusne DNA od enzimatske razgradnje (slika 6).³⁴

b) Proteinska ljuska adenovirusa

Genom adenovirusa se nalazi unutar proteinske ljuske (kapside) oblika ikozaedra promjera 70-90nm. Kapsida adenovirusa se sastoji od 3 glavne proteinske komponente: heksona, pentona i vlakna (slika 6).



Slika 6: Struktura adenovirusa; preuzeto iz Campos i sur. (2007)³⁴

Virus sadrži 240 kopija glavnog kapsidnog proteina nazvan hekson. Ti proteini su pseudoheksagonalnog oblika i poslagani su u 20 jednakostraničnih trokuta čineći ikozaedar. U jednom trokutu se nalazi 12 heksona (slika 7).³⁴



Slika 7: A - Adenovirus kao ikozaedar sa jednakostraničnim trokutićima i prikaz komponenti vlakna, B - Razmještaj heksona unutar jednog jednakostraničnog trokuta (označeni žutom točkom), ostali heksoni pripadaju susjednom trokutu, sa slovom P su označene pentonske baze; preuzeto iz Campos i sur (2007)³⁴

Vrhovi 5 trokuta čine proteinski kompleks nazvan penton, koji je sastavljen od 320 kDa teške pentonske baze i 182 kDa teškog vlakna. Pentonska baza se sastoji od 5 identičnih polipeptidnih podjedinica. Hekson nema funkcionalnu ulogu pri ulasku virusa u stanice, dok se pentonska baza i vlakno vežu na receptore na staničnoj površini tijekom infekcije. Vlakno je homotrimerna molekula koja se sastoji od tri domene: repa, drška i

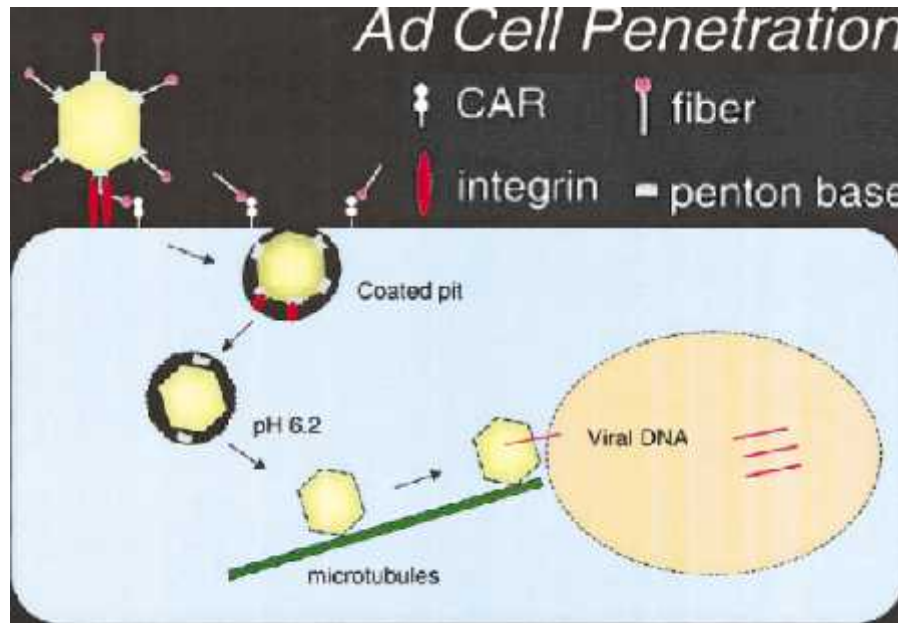
glave (slika 7). Svaka domena ima različite funkcije pri infekciji stanice domaćina. Amino(N)-terminalna domena, odnosno rep, pričvršćuje vlakno uz pentonsku bazu. Držak strši van sa površine virusa olakšavajući interakciju sa stanicom domaćina. Glava se sastoji od tri podjedinice koje izgledaju kao propeler i ona je odgovorna za vezanje na primarni receptor CAR na površini stanice domaćina. Ostale proteinske komponente kapside su mali proteini IIIa, VI, VIII i IX. koje drže heksone i pentone na okupu na specifičnim mjestima na kapsidi (slika 6).^{34,35}

1.2.3.2. Životni ciklus adenovirusa

Životni ciklus Ad5 traje 48-72 sati . U ranoj fazi prilikom infekcije adenovirus se veže glavom vlakna na receptor CAR (od engl.*Coxsackie Adenovirus Receptor*) koji se nalazi na površini stanice domaćina). CAR je membranski glikoprotein od 46 kDa eksprimiran na različitim tkivima *in vivo*.³⁶ Pripada superobitelji imunoglobulina i sastoji se od izvanstanične, transmembranske i citoplazmatske domene.³⁷ Aminokiselinski ostaci na bočnim stranama glave vlakna posreduju u vezivanju i evolucijski su očuvani između različitih adenovirusnih serotipova. Svaka glava potencijalno može vezati 3 molekule CAR, ali to još nije u potpunosti potvrđeno. Vlakno adenovirusa je u kompeticiji s homodimerom CAR-CAR za vezujuće mjesto na CAR molekuli.³⁸ Vezanje glave vlakna na CAR receptor uzrokuje savijanje vlakna što dovodi do približavanja kapside virusa staničnoj površini olakšavajući sljedeću interakciju staničnih receptora integrina $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_5$ s proteinima pentonske baze adenovirusa.³⁶ Integrini su veliki heterodimerni transmembranski proteini sastavljeni od α i β podjedinice. Obitelj integrina obuhvaća preko 20 članova te većina njih prepoznaje slijed RGD (Arg-Gly-Asp) na površini pentonske baze. Prosječno 5 molekula integrina može vezati jedan protein pentonske baze, tako da svaka virusna čestica može vezati oko 60 integrina.³⁹

Nakon tog dvostrukog prepoznavanja dolazi do endocitoze adenovirusa u mjehuriće obložene klatrinom (endosome) (slika 8). Unutar endosoma virusna kapsida se djelomično razgradi, ali virus «pobjegne» iz tog okoliša lizirajući endosomsku membranu.³⁶ Nizak pH unutar endosoma inducira konformacijske promjene proteina pentonske baze što omogućava fizičku interakciju tj. inserciju virusnih proteina u endosomsku membranu i narušavanje njenog integriteta. Za konformacijsku promjenu

ovisnu o kiselosti tijekom boravka unutar endosoma bitna je interakcija pentonske baze i integrina.³⁴ U procesu razgradnje endosomske membrane sudjeluju i integrini koji nakon što se vežu za pentonsku bazu aktiviraju adenovirusni enzim cisteinsku proteazu koja razgrađuje djelomično i virusnu kapsidu.



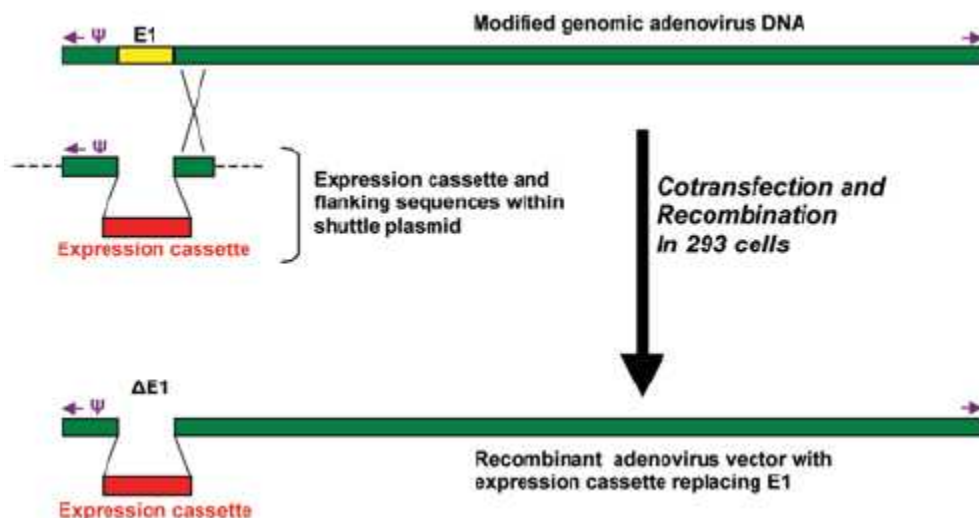
Slika 8: Endocitoza adenovirusne čestice; preuzeto iz Nemerow (2000)³⁶

Nakon lize samog endosoma transportira se virusna DNA u jezgru pomoću mikrotubula i dolazi do ekspresije virusnih gena.³⁶ Ekspresija ranih virusnih gena u jezgri stvara povoljne uvjete za virusnu replikaciju indukcijom S faze i sprečavanjem apoptoze. Rani virusni transkripti stimuliraju replikaciju virusnog genoma. Replikacija virusne DNA zahtijeva virusnu DNA kao kalup, terminalni protein i preterminalni protein, DNA polimerazu kodiranu virusnim genomom, topoizomerazu I te deoksiribonukleotide. U kasnoj fazi se stvaraju virusni strukturni proteini ekspresijom s promotora MLP (od engl. *major late promoter*). Sastavlja se virusna kapsida i oslobađa se virus, lizirajući stanicu domaćina.

1.2.3.3. Konstrukcija rekombinantnih adenovirusnih vektora

Adenovirusni vektori se konstruiraju tako da se željeni gen ugradi na mjesto regije E1 ili E3 u adenovirusnom genomu. Delecijom regije E1 vektor gubi sposobnost replikacije i može primiti 3,2 kb strane DNA, a dodatna delecija regije E3 povećava kapacitet

ugradnje na 8 kb strane DNA.²⁶ Takvi rekombinantni vektori umnožavaju se *in vitro* u komplementirajućim stanicama HEK 293. To su embrionalne stanice bubrega čovjeka immortalizirane transfekcijom fragmentima adenovirusnog genoma koji sadrže gene *E1A* i *E1B*. Komplementacijom *in trans* u stanicama nastaju rekombinantne virusne čestice. (slika 9).³¹



Slika 9: Prikaz konstrukcije adenovirusnih vektora prve generacije s izrezivanjem E1 regije. Stanice koje ekspimiraju E1 gen, kao npr. HEK 293 stanice istovremeno se transfeciraju adenovirusnom DNA i “shuttle” plazmidom koji sadrži ekspresijsku kazetu i bočne sljedove. Ti sljedovi odgovaraju sljedovima koji se nalaze lijevo i desno od E1 regije na adenovirusnom genomu. Adenovirusna DNA je promijenjena te preferira ulaziti u rekombinaciju s “shuttle” vektorom. Homolognom rekombinacijom se izbacuje E1 regija iz adenovirusnog genoma. Obrnute ponavljajuće sekvence (ITR) i signal za pakiranje su prikazani ljubičastom bojom; preuzeto iz Lee i sur. (2005)³³

Tijekom stvaranja rekombinantnih virusnih vektora većina E1 regije se izrezuje kako bi se spriječila replikacija virusa i liza stanice domaćina.³⁴ Adenovirusni vektori prve generacije sadrže ekspresijsku kazetu na mjestu E1 regije (i/ili E3 regije). Vektor bez regije E1 se mora umnažati u komplementirajućoj staničnoj liniji (HEK 293) koja eksprimira genski produkt E1 regije.³²

1.2.3.4. Prednosti i nedostaci adenovirusa:

Adenovirusi su atraktivni vektori za liječenje raka zbog svoje sposobnosti prijenosa velike količine DNA. Oni imaju široki krug domaćina. Mogu inficirati ljudske stanice i stanice drugih sisavaca. Neke stanične linije sa visokom koncentracijom adenovirusnih receptora (CAR i integrina) na svojoj površini kao npr. HeLa i Cos-7 stanice jako dobro

se zaražavaju adenovirusima.⁴⁰ Adenovirusi su stabilni i mogu se umnožiti do visokih koncentracija u odgovarajućim staničnim linijama.³⁹ Adenovirusni genom se ne ugrađuje u genom domaćina pa ne postoji opasnost prijenosa unešenih gena putem zametnih stanica i insercijske mutageneze.⁴¹ Moguć je prijenos gena u stanice koje se dijele kao i u mirujuće stanice. Adenovirusi prilično su bezopasni za ljude zbog toga što nisu onkogeni. Patologija je ograničena samo na infekcije gornjih dišnih puteva.⁴³ Adenovirusi prve generacije su pokazali visoku transdukcijsku sposobnost i dobro antitumorsko djelovanje u animalnim modelima. Genska terapija pomoću adenovirusnih vektora je zanimljiv pristup liječenju određenih vrsta raka rezistentnih na ostale terapije. Ipak, malo je dokaza koji podupiru značajnu kliničku korist replikacijsko defektnih adenovirusnih vektora. Ovi virusi mogu inficirati mnogobrojne različite stanice domaćina što predstavlja problem jer se virusno djelovanje ne ograničava na samo određeno ciljno tkivo. Studije na animalnim modelima su otkrile da se adenovirusi šire po različitim tkivima i organima i izazivaju toksične učinke, naročito na jetru.⁴³ Također, ovi vektori ne uspijevaju uvijek inficirati ciljno tkivo. Činjenica je da prijenos gena adenovirusnim vektorima u stanice domaćina ovisi uvelike o razini ekspresije CAR molekule, a manje o prisustvu integrina. Međutim ekspresija primarnog receptora CAR jako varira na površini različitih tumorskih stanica, rezultirajući rezistencijom pojedinih tumorskih stanica na infekciju adenovirusima. Taj problem se može riješiti u nekim slučajevima povećanjem koncentracije virusa što opet rezultira prevelikim toksičnim djelovanjem adenovirusa na zdravo tkivo. Ekspresija željenog gena s adenovirusnog vektora je prolazna jer se adenovirus ne ugrađuje u genom domaćina stoga je terapijski učinak prolazan.³⁴ Terapijska korist adenovirusa kod ljudi je mala zbog jake imunološke reakcije na kapsidne proteine.³⁵ Adenovirusni proteini su najimunogeničniji tj. izazivaju najjaču imunološku reakciju od svih virusnih vektora koji se trenutno koriste u genskoj terapiji.⁴² Međutim iako infekcija adenovirusom rezultira aktivacijom imunološke reakcije prema vektoru i inficiranim stanicama, ovaj efekt bi mogao biti pozitivan budući da bi mogao aktivirati imunološki sustav na prepoznavanje tumorskih antigena. Ipak visoke koncentracije adenovirusa mogu dovesti do akutne toksičnosti pa čak i smrti organizma ako dođe do jake upalne reakcije.^{42, 44}

1.3. Cilj rada

Osnovni cilj ovog rada bio je istražiti učinak povećane ekspresije gena $p21^{WAF1/CIP1}$ na promjene u staničnom ciklusu stanica karcinoma debelog crijeva SW480 i SW620. Ove stanice potječu od istog pacijenta, ali imaju različit stupanj zloćudne preobrazbe. Željelo se istražiti ulogu gena $p21$ u regulaciji proliferacije stanica te ispitati mogućnosti korištenja u genskom liječenju.

Povećanu ekspresiju gena izazvali smo pomoću replikacijski nesposobnih adenovirusnih vektora s ugrađenim genom $p21^{WAF1/CIP1}$ (Ad5-p21), dok smo za kontrolu koristili vektore s ugrađenim genom dojavljivačem β -galaktozidaza (Ad5- β -gal).

Prvi cilj bio je umnožiti adenovirusne vektore u komplementirajućim stanicama HEK 293 te ih pročititi ultracentrifugiranjem u gradijentu gustoće cezijevog klorida.

Nadalje, vektorima je bilo potrebno odrediti virusni titar, kao i djelotvornost transdukcije modelnih stanica virusom Ad5- β -gal bojenjem na β -galaktozidaznu aktivnost.

Konačno, stanice SW480 i SW620 smo zarazili rastućim koncentracijama obaju vektora te pratili njihov učinak na stanični ciklus tumorskih stanica, tj. pratili smo raspodjelu stanica u pojedinim fazama ciklusa kontrolnih (nezaraženih) stanica, u usporedbi sa zaraženim stanicama.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Uspostavljanje staničnih kultura

2.1.1. Uzgoj stanica

Stanice HEK 293 uzgajali smo u plastičnim bocama za stanične kulture volumena 600 ml u hranjivoj tekućoj podlozi DMEM HG (od engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium, high glucose*, Gibco Invitrogen, SAD) obogaćenoj s 10% seruma fetusa teleta (FCS, od engl. *foetal calf serum*, Gibco Invitrogen), 2 mM L-glutaminom (Sigma, SAD), 100 U/ml penicilina (Eurobio, Francuska) te sa 100 µg/ml streptomicina (Eurobio, Francuska), u *in vitro* uvjetima u inkubatoru (J.P.Selecta, Španjolska), na 37°C, u vlažnoj atmosferi i pri 5% CO₂. Stanice SW620, SW480 i HCT116 uzgajali smo pri istim uvjetima u DMEM-u obogaćenom sa 10% FCS-a.

Stanice smo presađivali kada su dosegle 75% konfluentnosti na slijedeći način: stanicama smo uklonili tekuću podlogu te ih dva puta isprali s 5 ml 0,25%-tnog sterilnog tripsina (Gibco, Invitrogen). Tripsin je proteolitički enzim iz gušterače goveda koji specifično cijepa proteine iza karboksilne skupine arginina ili lizina, a stanice se ispiru tripsinom da bi se odvojile jedne od drugih i od podloge.⁴⁶ Nakon ispiranja tripsinom stanice smo inkubirali 5 minuta na 37°C da se odlijepe od podloge te im zatim dodali 10 ml svježije tekuće podloge. Laganim potresanjem i propuhivanjem, stanice se odvoje od podloge, a proteaze iz seruma inhibiraju djelovanje tripsina. Stanice smo po potrebi razrijedili ili presađili.

2.1.2. Brojanje stanica

Broj živih i mrtvih stanica određivali smo pod svjetlosnim mikroskopom (Olympus CKX41, Japan). Pomoću tripanskog modrila (Sigma), koje specifično boji mrtve stanice jer ga po ulasku u stanice ne izbacuju proteinske pumpe, mogli smo razlikovati žive stanice od mrtvih. Za brojanje stanica pomiješali smo 20 µl stanične suspenzije i 80 µl 0,03%-tnog tripanskog modrila, čime smo stanice razrijedili pet puta. Alikvot takve

suspenzije nanijeli smo u komoricu za brojanje stanica «Neubauer» te izbrojali stanice na 4 x 16 kvadrata pod velikim povećanjem mikroskopa. Broj stanica u 1 ml određuje se prema formuli: Broj stanica / ml = $(n / 4) \times 5 \times 10^4$ st / ml.

2.2. Konstrukcija rekombinantnog adenovirusnog vektora

Rekombinantne vektore koje smo umnažali nismo sami konstruirali, nego smo ih dobili od tvrtke Introgen Therapeutic iz SAD-a. Konstrukcija vektora s ugrađenim genom *p21* izvodi se kotransfekcijom shuttle-vektora pAvCvSv i plazmida pJM17 u stanicama HEK 293. Shuttle-vektor pAvCvSv konstruiran je umetanjem cDNA divljeg tipa gena *p21* pod kontrolu jakog promotora i pojačivača citomegalovirusa čovjeka, malog T introna i poliadenilacijskog signala virusa SV40 u neki manji plazmid (npr. pXCX2 ili pBR322). Plazmid pJM17 sadrži adenovirusni genom tipa 5 (Ad 5).

Kotransfekcijom u stanicama HEK 293 rekombinacijom između shuttle-vektora i plazmida nastaje rekombinatni vektor Ad5-p21, koji umjesto rane E1A regije nužne za replikaciju sadrži ekspresijsku kazetu gena *p21*. Ključni elementi ekspresijske kazete su: lijeva obrnuta ponavljajuća sekvenca ITR, ishodište replikacije ORI (od engl. *origin of replication*), signal za pakiranje rekombinantnog genoma u virione ψ (slika 5), pojačivač E1A, promotor citomegalovirusa čovjeka CMV, gen *p21* i poliadenilacijski signal virusa SV40.⁴⁷

Kontrolni je vektor (Ad5- β -gal) koji nema nikakvu terapijsku vrijednost konstruiran na isti način, tj. u ekspresijskoj kazeti sadrži gen koji kodira za enzim β -galaktozidazu umjesto E1A regije.⁴⁸

Tako konstruirani vektori umnoženi su u komplementirajućim stanicama HEK 293 te im je lančanom reakcijom polimeraze (PCR, od engl. *polymerase chain reaction*) provjerena odsutnost regije E1A i prisutnost željenog gena.

2.3. Umnožavanje adenovirusnih vektora

2.3.1. Zaražavanje stanica HEK 293

Za umnažanje adenovirusnih vektora koristili smo staničnu liniju HEK 293. To je stanična linija embrionalnog bubrega čovjeka imortalizirana ugradnjom adenovirusnih ranih gena *E1A* u stanični genom. Budući da rekombinantnim vektorima manjkaju upravo rani geni *E1A*, odgovorni za replikaciju virusnog genoma, komplementacijom u stanicama HEK 293 stvaraju se virusne čestice.

Stanice HEK 293 uzgajali smo pod prethodno navedenim *in vitro* uvjetima u plastičnim bocama uz dodatak 20 ml hranjive tekuće podloge DMEM HG obogaćene s 10% FCS-a. Kad su dostigle 75% konfluentnosti, uklonili smo tekuću podlogu te im dodali 4 ml infekcijske tekuće podloge. Infekcijska podloga sadrži 2% DMEM HG i alikvot virusa. Nakon 1 do 1,5 sati inkubacije uz povremeno lagano miješanje kako bi se tekuća podloga s virusnim česticama ravnomjerno razlila po cijeloj površini i kako bi se jednoliko zarazile sve stanice, dodali smo 20 ml DMEM-a HG obogaćenog sa 7,5%-tnim FCS-om. Istovremeno smo uzgajali i zaražavali po 20 plastičnih boca sa stanicama. Sljedećih 24-48 sati u stanicama se repliciraju virusi.

2.3.2. Sabiranje zaraženih stanica HEK 293

Stanice zaražene virusima pokazuju vidljive morfološke promjene poznate kao citopatološki učinak, CPE (od engl. *cytopathic effect*). U početnoj fazi zaraze stanice se zaokružuju i lagano odvajaju od podloge stvarajući brojna uzdignuća, dok u kasnijoj fazi liziraju. CPE je vidljiv već i makroskopski: stanice nisu konfluentne nego se između njih uočavaju praznine, no promatranjem stanica pod malim povećanjem mikroskopa mogli smo sa sigurnošću odrediti napredovanje zaraze.⁴⁹ Stanice je potrebno sakupiti prije lize dok su virusi još u njima, jer je važno ostaviti virusima dovoljno vremena za replikaciju, da bi se dobilo što više virusnih čestica. Stanice smo sakupljali na sljedeći način: snažnim

protresanjem ili mlazom iz pipete stanice se skidaju s podloge. Zajedno s tekućom podlogom sakupljali smo i stanice u epruvete od 50 ml. Da bismo pokupili zaostale stanice boce smo ispirali fosfatnim puferom (PBS, od engl. *phosphate buffer saline*, Gibco Invitrogen). Otopina fosfatnog pufera sadržavala je 1,36 M NaCl, 26 mM KCl, 80 mM Na₂HPO₄ i 14 mM KH₂PO₄, a pH je podešen kloridnom kiselinom na vrijednost 7,4 na pH metru (Radiometer, Analytical SAS, Francuska). Alikvot ovakve stanične suspenzije, npr. 1,5 ml, pohrani se na -80° C za sljedeće zaražavanje stanica. Stanice smo zatim istaložili centrifugiranjem (centrifuga Eppendorf, model 5804R, Njemačka) na 3000 rpm, 7 minuta pri temperaturi 4°C. Supernatant smo odlili, a stanice u kojima su virusi pohranili smo na -80° C.

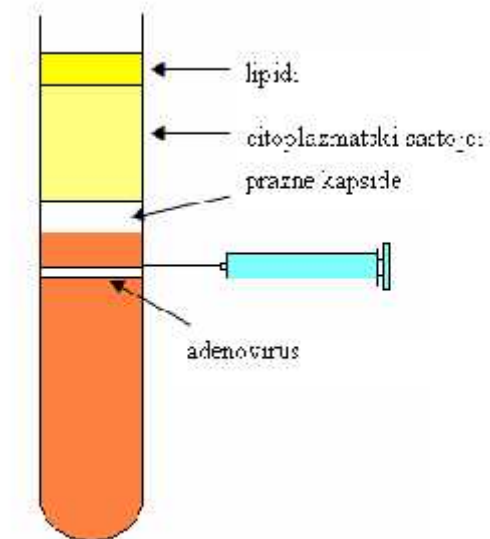
2.4. Pročišćavanje adenovirusnih vektora

Nakon nekoliko ciklusa zaražavanja stanica i prikupljanja staničnih taloga, pet puta smo otapali i ponovo zamrzavali taloge te ih svaki put protresali na tresilici (Tehtnica, Slovenija), kako bi sve stanice lizirale i oslobodile virusne čestice. Sve smo taloge spojili u jedan, centrifugirali ga dva puta na 5000 rpm, 7 minuta pri 4°C te pokupili supernatant s grubim virusnim lizatim (CVL, od engl. *crude viral lysate*).

2.4.1. Ultracentrifugiranje u gradijentu gustoće cezijeveog klorida

U kivetu za ultracentrifugu (Beckman, SAD), prethodno ispranu u 95%-tnom etanolu (Kemika), stavili smo 3 ml otopine CsCl-a gustoće 1,4 g/ml te ga nadsložili s 3 ml otopine gustoće 1,25 g/ml. Na vrh smo dodali 4 ml virusnog lizata te centrifugirali (Beckman ultracentrifuga s rotorom SW41) na 35000 rpm, 1 sat i 15 minuta pri temperaturi 20°C. Nakon prvog ultracentrifugiranja u gradijentu gustoće CsCl-a u kiveti su vidljivi slojevi staničnih lipida, citoplazmatskih proteina, praznih kapsida, a uočava se bijelo-sedefasta

vrpca koju čine virusne čestice. Pomoću šprice i igle (21G, Braun, Njemačka) ubodom malo iznad vrpce sa strane kivete sakupili smo vrpču čistog virusa (slika 10).



Slika 10: Kiveta s gradijentom gustoće CsCl-a nakon prvog ultracentrifugiranja

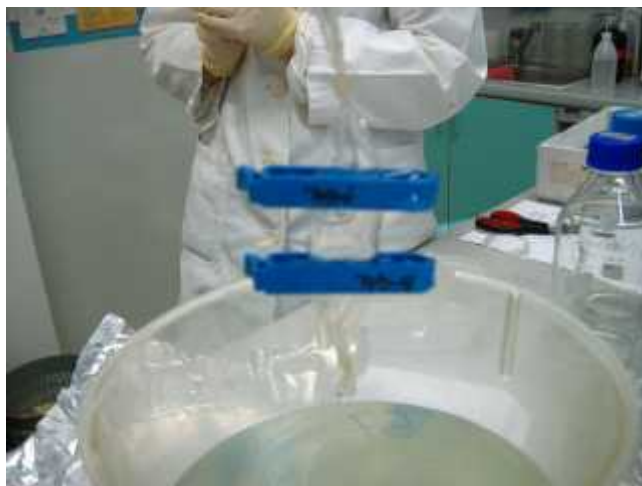
Da bismo potpuno pročistili virus bilo je potrebno još jedno centrifugiranje. Stoga smo u novu kivetu stavili 8 ml otopine CsCl-a gustoće 1,33 g/ml, na nju dodali virus sa CsCl-om (dobivenu vrpču nakon prvog ultracentrifugiranja) te centrifugirali na 35000 rpm, 18 sati pri 20°C. Na isti način, ubodom sa strane, sakupili smo i ovu vrpču (slika 11).



Slika 11: Adenovirusna vrpca nakon drugog ultracentrifugiranja

2.4.2. Dijaliza

Pročišćeni virusi trebaju se očistiti i od CsCl-a. Dobiveni virus u CsCl-u smjestili smo u membranu za dijalizu (Servapor, Njemačka), prethodno prokuhanu i ispranu u destiliranoj vodi te smo membranu uronili u 4 litre pufera za dijalizu (10 mM Tris, 1 mM MgCl_2 i 10% glicerola, pH = 7,4). Nakon dijalize preko noći uz neprekidno miješanje pufera pomoću magnetske miješalice (Tehtnica) pri 4°C alikvotirali smo virus u sterilne epruvete volumena 0,5 ml (Eppendorf) te ih pohranili na -80°C. (slika 12)



Slika 12: Prikaz membrane za dijalizu

2.5. Određivanje virusnog titra

Infektivna snaga umnoženih i pročišćenih virusnih čestica određuje se mogućnošću stvaranja plakova u imobiliziranoj jednoslojnoj kulturi.

Stanice HEK 293 nasadili smo u plastične pločice sa 6 bunarića i to $0,625 \times 10^6$ stanica u 1 ml DMEM-a HG uz 10% FCS-a po bunariću. Kroz 48 sati, kad su stanice dosegle 60-70% konfluentnosti, uklonili smo im tekuću podlogu te dodali po 0,9 ml infekcijskog 2%-tnog DMEM-a u rasponu razrjeđenja virusa 10^{-6} - 10^{-11} . Nakon 1 do 1,5 sati inkubacije odstranili smo infekcijsku tekuću podlogu te svaki bunarić prelili mješavinom koju čini 1,5 ml tekuće podloge i 1,5 ml sterilnog 2%-tnog gela agaroze sljedećeg sastava: tekuća podloga je 2xMEM (od engl. *Modified Eagle's medium*, Gibco) obogaćena s 10%-tnim FCS-om, 10 mM HEPES-om (Gibco), 2 mM L-glutaminom (Gibco), 100 U/ml penicilina te 100 µg/ml streptomicina. Gel je agarosa niskog tališta (Low melting agarose, Sigma). Svaki drugi dan nadslojavali smo stanice s 2 ml svježije mješavine. Kroz sljedećih dvanaest dana mogli smo promatrati nastanak plakova u gelu.

Virusi se umnožavaju u komplementirajućim HEK 293 stanicama i konačno dovode do lize stanice. Oslobođeni virusi napadaju susjedne stanice i taj proces se ponavlja pri čemu nastaju plakovi. Plakovi su čistine unutar konfluentnog sloja stanica oko kojih uočavamo mrtve stanice i stanice na kojima je vidljiv CPE. Nakon zaražavanja stanice smo

nadslojili agarozom kako bismo spriječili difuziju virusnih čestica u druga područja te stvaranje novih plakova. Stanice nadslojavamo svaka dva dana da bismo im dali potrebne hranjive tvari i da bismo fiksirali uginute stanice.

Pri visokim koncentracijama virusa plakovi su se pod malim povećanjem mikroskopa mogli uočiti već drugi dan nakon zaražavanja. Nakon desetak dana kada plakovi prestanu rasti, moguće je odrediti najveće razrjeđenje pri kojem još uvijek postoje virusne čestice koje stvaraju plakove.

Titir ili koncentracija virusa označava broj virusnih čestica u određenom volumenu pufera i iskazuje se izrazom PFU (od engl. *plaque forming units*). PFU predstavlja koncentraciju infektivnih virusnih čestica. Izračunava se prema formuli:

$$\frac{\text{broj plakova} \times \text{razrjeđenje}}{0,9 \text{ ml uzorka}} = \text{PFU/ml}$$

2.6. Određivanje koncentracije adenovirusnih čestica u suspenziji pročišćenih adenovirusa

Određivanje ukupnog broja virusnih čestica je važan podatak u kontroli kvalitete pročišćenih replikacijski nesposobnih adenovirusa. Ova spektrofotometrijska metoda se koristi samo za pročišćeni virus.⁵⁰

Pripremili smo razrijeđenja virusnih pripravaka (Ad5-p21 i Ad5-β-gal) 10x i 20x u otopini PBS-a (sastava: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄ i 1,4 mM KH₂PO₄, pri pH 7,4) i 0,1 %-tnog SDS-a (natrijev dodecilsulfat) te smo ih inkubirali 10 minuta u termobloku pri 56°C. Tijekom inkubacije se oslobađa virusna DNA iz kapsida. Kratko smo centrifugirali virusne pripravke pri 10000g i prelili supernatant u kvarcne kivete za mjerenje u UV području. Izmjerili smo apsorbanciju pri 260 nm prema otopini PBS-a i 0,1%-tnog SDS-a.⁵⁰

Broj virusnih čestica smo izračunali prema formuli:

$$N = A_{260} \times R \times 1,1 \times 10^{12}$$

gdje je:

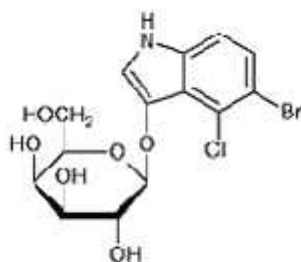
N – broj virusnih čestica

A_{260} – izmjerena apsorbancija pri 260 nm

R – razrjeđenje

2.7. Određivanje broja infektivnih virusnih čestica korištenjem gena dojavljivača β -galaktozidaze

Gen za β -galaktozidazu iz bakterije *E. coli* često se koristi kao gen dojavljivač pri transfekciji eukariotskih stanica plazmidom ili pri infekciji rekombinantnim virusnim vektorima. Enzim β -galaktozidaza razgrađuje laktozu i druge umjetne supstrate kao npr. X-gal (5-brom-4-klor-3-indolil- β -galaktipiranozid) ili o-NPG (2-Nitrofenil- β -D-galaktipiranozid) (slika13). Razgradnjom X-gala nastaje plavo obojeni produkt 5-brom-4-klorindol koji boji stanice u plavo. Tehnika bojenja na β -galaktozidaznu aktivnost u kulturi stanica može se koristiti za određivanje učinkovitosti infekcije rekombinantnim replikacijski sposobnim ili transdukcije replikacijski nesposobnim virusnim vektorima. Naime, nakon završenog postupka bojenja mogu se izbrojati plave stanice pod svjetlosnim mikroskopom i zaključiti o spomenutim učinkovitostima infekcije ili transdukcije.⁵¹



Slika 13: X-gal, preuzeto sa stranice http://www.nugi-zentrum.de/Experimente/Biochemie/beta_Gal.html⁵¹

Za određivanje virusnog titra nasadili smo HEK 293 stanice na pločicu sa 6 bunarića u koncentraciji $0,6 \times 10^6$ stanica/ml u 2 ml DMEM-a HG uz 10% FCS-a po bunariću i inkubirali pri uvjetima 5%-tnog CO₂ i 37°C. Nakon 24 sata stanicama smo odstranili tekuću podlogu te im dodavali 0,9 ml infekcijske otopine 2%-tnog DMEM-a s Ad5-β-gal u rasponu razrjeđenja 10^{-6} - 10^{-11} . Nakon 1 do 1,5 sati inkubacije odstranili smo infekcijsku tekuću podlogu te smo u svaki bunarić dodali po 2 ml DMEM-a HG uz 10% FCS-a.

Sljedeći dan, 24 sata nakon inkubacije smo uklonili hranjivu podlogu i isprali dva puta svaki bunarić sa po 1 ml PBS-a. Nakon toga smo fiksirali stanice 5 minuta dodatkom po 600 μl svježe pripremljene otopine 0,5%-tnog glutaraldehida (Sigma, SAD) u PBS-u pri sobnoj temperaturi. Zatim smo opet 2 puta isprali stanice sa po 1 ml PBS-a i dodali svježe pripremljenu otopinu X-gala. Otopinu X-gala smo pripremili otapanjem 2 mM MgCl₂, 4 mM K₃Fe(CN)₆, 4 mM K₄Fe(CN)₆ te 0,32 M X-gal (Fermentas, SAD) u PBS-u (sastava: 100 mM NaCl, 80 mM Na₂HPO₄ i 20 mM NaH₂PO₄ x H₂O, pri pH 7,4). Inkubirali smo stanice pri 37°C. Tamno plava boja u stanicama se razvija 2-24 sata nakon bojenja (tamnija boja ukazuje na snažniju ekspresiju). Plavo obojene stanice smo brojali pod svjetlosnim mikroskopom. Isti postupak smo ponovili nakon 48 i nakon 72 sata. Odredili smo koncentraciju virusnih čestica brojanjem plavo obojenih stanica u određenom razrjeđenju te izračunali BFU (od engl. *blue forming units*) prema formuli:

$$\frac{\text{broj plavih stanica} \times \text{razrjeđenje}}{0,9 \text{ ml uzorka}} = \text{BFU/ml}$$

2.8. Određivanje djelotvornosti transdukcije bojenjem na β-galaktozidaznu aktivnost

Stanice raka debelog crijeva SW620, SW480 i HCT116 smo nasadili u plastične pločice s 24 bunarića i to 4×10^4 stanica po bunariću. Nakon 24 sata inkubacije pri 5%-tnim CO₂ i 37°C stanicama smo odstranili tekuću podlogu te im dodavali viruse Ad5-β-gal u koncentraciji od 1-80 BFU/stanici u 120 μl 2%-tnog DMEM-a. Nakon 75 minuta

inkubacije s virusima smo dodavali po 1 ml 10%-tnog DMEM-a u svaki bunarić. Po isteku 24 sata inkubacije uklonili smo hranjivu podlogu i isprali stanice dva puta s 300 μ l PBS-a. Nakon toga smo fiksirali stanice 5 minuta dodatkom 150 μ l svježije pripremljene otopine 0,5%-tnog glutaraldehida u PBS-u pri sobnoj temperaturi. Zatim smo opet dva puta isprali stanice s 300 μ l PBS-a i dodali svježije pripremljenu otopinu X-gala. Inkubirali smo stanice pri 37°C. Plavo obojene stanice smo brojali pod svjetlosnim mikroskopom nakon 24, 48 i 72 sata.

2.9. Određivanje staničnog ciklusa protočnom citometrijom

Protočna citometrija je metoda kojom se analizira veći broj fizikalnih značajki pojedinačnih čestica, najčešće stanica, dok prolaze kroz zraku svjetlosti u mlazu tekućine. Karakteristike stanica koje se mjere ovom metodom uključuju relativnu veličinu stanice, relativnu zrnatost ili složenost unutarnje građe i relativni intenzitet fluorescencije. Ove karakteristike određuje optičko-elektronski sustav koji bilježi kako čestica raspršuje lasersko svjetlo i emitira fluorescenciju.

Određivanjem količine DNA u stanici dobiva se važna informacija o staničnom ciklusu te, posljedično, o učinku različitih stimulansa na stanicu, primjerice lijekova ili transfekcije gena. Za analizu staničnog ciklusa potrebno je fiksirati stanice etanolom ili nekim drugim sredstvom koje utječe na propusnost njihove membrane. Potom se stanice boje propidij jodidom, bojom koja se interkalira u njihovu DNA i fluorescira nakon pobuđivanja laserom. Boja se veže u proporcionalnom odnosu na količinu DNA u stanici, tako da više vezane boje znači i više DNA. Ovo pak omogućuje klasificiranje stanica u G1, S i G2/M fazu, sukladno intenzitetu fluorescencije. Mirujuće stanice u G1 fazi sadrže jednu kopiju DNA, pa će intenzitet fluorescencije biti dvostruko manji nego u G2/M fazi u kojoj je replikacija DNA završena i jezgra sadrži dvije kopije DNA. Tijekom S faze se događa replikacija DNA pa će stoga intenzitet fluorescencije biti veći nego u G1 fazi, ali manji nego u G2/M fazi.⁵²

2.9.1. Određivanje utjecaja Ad5-p21 i Ad5-β-gal na stanični ciklus

2.9.1.1. Zaražavanje stanica raka debelog crijeva sa Ad5-p21 i Ad5-β-gal

Stanice SW620 i SW480 smo nasadili u plastične pločice sa 6 bunarića i to 1×10^6 stanica po bunariću. Nakon 24 sata inkubacije pri 5%-tnim CO_2 i 37°C stanicama smo odstranili tekuću podlogu te im dodavali koncentracije virusa od 20, 40, 60, 80 i 100 BFU/stanici u 600 μl 2%-tnog DMEM-a. Stanice smo u jednom slučaju zarazili s Ad5-p21, a u drugom slučaju s Ad5-β-gal. Nakon 75 minuta inkubacije s virusima smo dodavali po 2ml 10%-tnog DMEM-a u svaki bunarić.

2.9.1.2. Priprema za protočni citometar

Sljedeći dan, 24 sata nakon inkubacije, u epruvete smo pokupili medij iz bunarića sa stanicama SW620 i SW480 zaražene s Ad5-p21 odnosno Ad5-β-gal. Stanice smo isprali s 1 ml PBS-a i dodali 300 μl tripsina u svaki bunarić. Inkubirali smo ih 5 minuta dok se stanice ne odlijepe od podloge. Nakon toga smo skidali stanice s podloge ispiranjem sa istim medijem kojeg smo prethodno pokupili te ga ponovno skupili u iste epruvete. Zatim smo centrifugirali stanice na 1200 rpm, 5 minuta, odlili supernatant, dodali po 2,5 ml PBS-a u svaku epruvetu te lagano vorteksirali. Isti postupak smo ponovili još dva puta za redom, međutim, zadnji put nismo dodali 2,5 ml PBS-a već 1,5 ml. Nakon toga smo fiksirali stanice u 70%-tnom etanolu. To smo učinili na taj način da smo uz istovremeno lagano vorteksiranje dodavali 3 ml apsolutnog etanola iz zamrzivača (-20°C) u svaku epruvetu s resuspendiranim stanicama u PBS-u koji razrjeđuje apsolutni etanol. Stanice smo spremili na -20°C do dana analize na protočnom citometru. Isti postupak smo ponovili nakon 48 i 72 sata.

2.9.1.3. Analiza staničnog ciklusa

Za analizu staničnog ciklusa na protočnom citometru smo prvo u zasebnim epruvetama pripremili otopinu *Rnaze A* (Sigma, SAD) koncentracije 0,1 µg/µl te otopinu propidij jodida koncentracije 2,5 µg/ml. Epruvetu s otopinom propidij jodida smo omotali aluminijskom folijom budući da se propidij jodid raspada na svjetlu. Otopine *Rnaze* i propidij jodida smo spremili na +4°C. Budući da određujemo fazu staničnog ciklusa u kojoj se stanica nalazi prema količini nukleinske kiseline, moramo pocijepati RNA putem *Rnaze A*. Na taj način RNA neće utjecati na rezultate jer se propidij jodid neće interkalirati u nju.

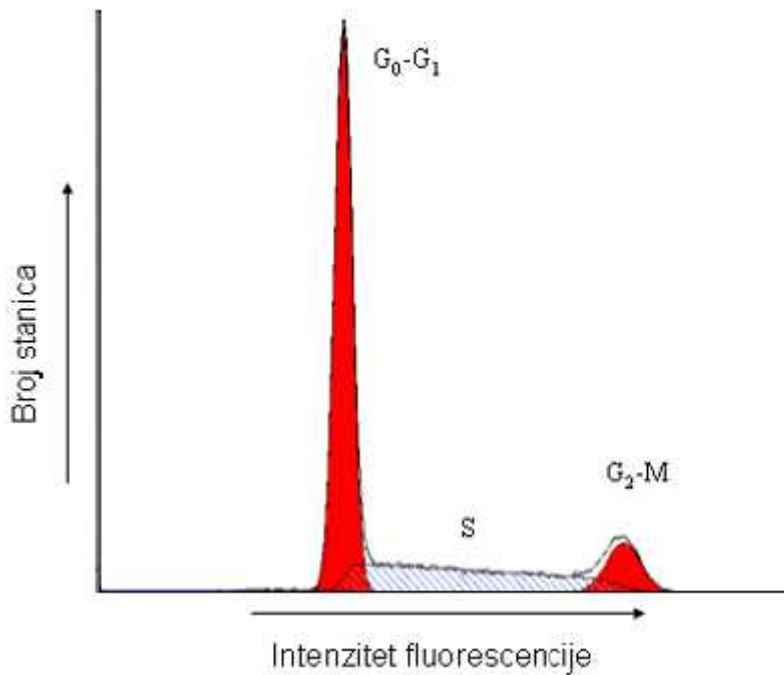
Naše uzorke smo izvadili iz zamrzivača i centrifugirali 5 minuta na 1200 rpm pri 4°C. Pažljivo, bez treskanja epruvete, odlili smo supernatant, budući da se stanice resuspendirane u etanolu labavo vežu uz podlogu. Dodali smo 2ml PBS-a u svaku epruvetu i lagano promiješali. Ovaj isti postupak centrifugiranja i ispiranja PBS-om smo ponovili. Nakon toga smo još jednom centrifugirali stanice na 1200 rpm 5 minuta pri 4°C, odlili supernatant te ovaj put dodali 200 µl otopine *Rnaze A* u svaku epruvetu i resuspendirali. Uzorke smo inkubirali u vodenoj kupelji 15 minuta.

Za vrijeme te inkubacije pripremili smo male epruvete za protočni citometar (Becton Dickinson, Falcon), obilježili ih te u svaku dodali 200 µl otopine propidij jodida. Nakon 15 minuta smo izvadili naše uzorke iz kupelji, resuspendirali ih te prebacili u epruvete za protočni citometar. Lagano smo vorteksirali epruvete za protočni citometar kako bi se otopina propidij jodida pomiješala s otopinom stanica, stavili na led i zamračili. Po isteku nekoliko sati smo analizirali uzorke na protočnom citometru.

2.9.1.4. Obrada rezultata

Uzorke smo analizirali na protočnom citometru FACS Calibur (Becton-Dickinson) uz pomoć računala (Apple MacIntosh) i popratnog upravljačkog programa (CellQuest). Fluorescentnim obilježavanjem putem propidij jodida možemo odrediti u kojoj se fazi staničnog ciklusa nalazi stanica. Rezultirajući DNA histogram se sastoji od 3 populacije: dvije Gausove krivulje, pri čemu prva Gausova krivulja (prvi vršak, gledano s lijeva na

desno) predstavlja populaciju stanica u G1 fazi, a druga Gausova krivulja (drugi vršak) populaciju stanica u G2/M fazi. Područje između tih krivulja predstavlja populaciju stanica u S fazi. Susjedne populacije stanica se međusobno preklapaju (slika 14), pa je stoga potreban program za razdvajanje tih populacija i za određivanje površina ispod krivulja prema kojima se preračunava postotak stanica koje se nalaze u pojedinoj populaciji.⁵²



Slika 14: DNA histogram

Ovako dobiveni DNA histogrami obrađuju se pomoću nekog od postojećih upravljačkih programa za analizu staničnog ciklusa npr. WinMDI softvera pomoću kojeg smo nacrtali 3D histograme.

3. REZULTATI

3.1. Određivanje virusnog titra

3.1.1. Određivanje broja infektivnih čestica

Eksperimentalni dio rada započet je umnožavanjem adenovirusnih vektora u stanicama HEK 293. Nakon izolacije i pročišćavanja virusa odredili smo infektivnu snagu vektora Ad5-p21 i Ad5- β -gal tj. broj infektivnih čestica (PFU, od engl. *plaque forming units*). Nasadili smo 1×10^6 stanica po bunariću te ih nakon 24 sata zarazili virusima u rasponu razrjeđenja $10^6 - 10^{11}$. Virusne su čestice tijekom dvanaest dana postupno stvarale plakove, čistine u imobiliziranoj jednoslojnoj kulturi, a broj nastalih plakova jednak je broju virusnih čestica u određenom razrjeđenju originalnog virusnog alikvota. Nakon deset dana plakovi su se prestali širiti te smo im tada izračunali titar (PFU/ml). U slučaju Ad5- β -gal izbrojili smo 2 plaka na razrjeđenju 10^{-9} , a 23 plaka na razrjeđenju 10^{-8} . Ad5-p21 je stvorio 6 odnosno 4 plaka na razrjeđenju 10^{-10} te 49 plakova na razrjeđenju 10^{-9} . Iz ovih podataka smo odredili:

Titar Ad5- β -gal iznosi 2×10^9 PFU/ml.

Titar Ad5-p21 iznosi 5×10^{10} PFU/ml.

Plakove na razrjeđenjima manjim od 10^{-8} nismo ni uspjeli brojati jer ih je bilo jako mnogo i međusobno su se preklapali.

3.1.2. Određivanje broja infektivnih virusnih čestica korištenjem gena dojavljivača β -galaktozidaze

Stanice SW620, SW480 i HCT116 smo nasadili u plastične pločice s 24 bunarića i to 4×10^4 stanica po bunariću te ih zarazili nakon 24 sata virusima s ugrađenim genom β -gal u rasponu koncentracija 20-100 PFU/stanici. Nakon 24 sata dodali smo otopinu X-gala i promatrali razvoj plavog obojenja nakon 24, 48 i 72 sata te smo plave stanice brojali pod svjetlosnim mikroskopom. Rezultati su ukazali na jako citotoksično djelovanje budući da su stanice ugibale već pri nižim koncentracijama. Toksični učinak je bio toliko jak da su već pri koncentraciji od 20 PFU/stanici uginule sve SW620 stanice promatrane nakon 48

sata. SW480 i HCT116 nisu bile toliko osjetljive, međutim toksično djelovanje se moglo itekako uočiti pri koncentracijama 60-100 PFU/stanici nakon 72 sata.

Mogući uzrok toksičnosti moglo bi biti onečišćenje virusnog pripravka neinfektivnim virusnim česticama ili drugim toksičnim virusnim produktima. Također je moguće da je došlo do ponovne homologne rekombinacije između virusnih dijelova genoma u HEK 293 stanicama i rekombinantnih adenovirusnih vektora čime se virusima vraća sposobnost replikacije i lize stanica ponovnom ugradnjom E1 regije.

Stoga, smo potom odredili na jedan drugi način koncentraciju infektivnih virusnih čestica mjerenjem BFU (od engl. *blue forming units*) odnosno broja virusnih čestica koji omogućava detekciju plavih stanica. Pod svjetlosnim mikroskopom smo brojali HEK 293 stanice koje su postale plavo obojene nakon zaražavanja adenovirusima koje nose gen β -gal. Brojanjem plavo obojenih HEK 293 stanica smo izbrojili prvi put 8, a drugi put 16 plavih stanica u razrjeđenju 10^{-10} . U razrjeđenju 10^{-9} smo izbrojili 90 plavih stanica. Iz tih podataka smo odredili da nam je koncentracija infektivnih virusnih čestica Ad5- β -gal 1×10^{11} BFU/ml.

3.1.3. Određivanje koncentracije adenovirusnih čestica u suspenziji pročišćenih adenovirusa

Spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancije pri 260 nm mjerimo koncentraciju virusne DNA i proteina. Ovo je fizikalna metoda koja ne razlikuje intaktne (infektivne) i oštećene (neinfektivne) čestice. Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije virusnih čestica ne odražava količinu aktivnih infektivnih virusa u preparaciji, budući da omjer neinfektivnih i infektivnih virusnih čestica značajno varira u različito spravljenim virusnim pripravcima.⁵³

Da bismo odredili omjer između ukupnog broja virusnih čestica i broja infektivnih čestica mjerili smo koncentraciju ukupnog broja virusnih čestica u suspenziji pročišćenih adenovirusa. Mjerenjem apsorbancije pri 260 nm u razrjeđenju virusnog pripravka od 10x, odnosno 20x, dobili smo rezultate koji su prikazani u tablici 1.

Virus	A_{260}	Razrjeđenje virusnog pripravka	N
Ad5-β-gal	0,196	10 x	$2,156 \times 10^{12}$
Ad5-β-gal	0,080	20 x	$1,76 \times 10^{12}$
Ad5-p21	0,391	10 x	$4,301 \times 10^{12}$
Ad5-p21	0,185	20 x	$4,07 \times 10^{12}$

Tablica 1: Ukupan broj virusnih čestica u ml (**N**) dobiven mjerenjem apsorbancije pri 260 nm pri različitim razrjeđenjima virusnih pripravaka

Iz ovih rezultata možemo izračunati srednju vrijednost koncentracije virusnih čestica.

$$N [\text{Ad5-}\beta\text{-gal}]: (2,156 \times 10^{12}/\text{ml} + 1,76 \times 10^{12}/\text{ml}) / 2 = 1,958 \times 10^{12}/\text{ml}$$

$$N [\text{Ad5-p21}]: (4,301 \times 10^{12}/\text{ml} + 4,07 \times 10^{12}/\text{ml}) / 2 = 4,185 \times 10^{12}/\text{ml}$$

Nakon toga smo iz ovih vrijednosti odredili omjer ukupnog broja virusnih čestica (infektivnih i neinfektivnih = **N**) i infektivnih virusnih čestica (**PFU**). Za većinu virusa ovaj omjer (**N** : **PFU**) je u rasponu od 20:1 do 50:1.⁵³

$$\text{Za Ad5-}\beta\text{-gal omjer } N : PFU \text{ iznosi } 1,958 \times 10^{12}/\text{ml} : 2 \times 10^9 \text{ PFU/ml} = 979 : 1$$

$$\text{Za Ad5-p21 omjer } N : PFU \text{ iznosi } 4,185 \times 10^{12}/\text{ml} : 5 \times 10^{10} \text{ PFU/ml} = 83,7 : 1$$

Odmah možemo vidjeti iz ovih rezultata da virusni pripravak adenovirusa Ad5-β-gal sadrži jako puno neinfektivnih čestica, dok Ad5-p21 malo odstupa od standardnog omjera. Upotrebom koncentracije virusnih čestica dobivenu spektrofotometrijskim mjerenjem kao jedinicu za zaražavanje stanica dobit ćemo loše rezultate zbog značajnih razlika u količini infektivnih virusnih čestica koje bismo koristili pri zaražavanju. Korištenjem PFU ili BFU kao jedinicu za zaražavanje ćemo dobiti dosljedne rezultate.⁵³

U tablici broj 2 su prikazani sumirano svi rezultati koji su dobiveni određivanjem virusnog titra različitim metodama. Možemo uočiti kako se vrijednosti međusobno razlikuju za jedan red veličine pri čemu je $PFU < BFU < N$.

Adenovirusni vektor	PFU (koncentracija infektivnih virusnih čestica)	BFU (koncentracija infektivnih virusnih čestica)	N (ukupan broj virusnih čestica, infektivnih + neinfektivnih)
Ad5- β -gal	2×10^9 PFU/ml	1×10^{11} BFU/ml	$1,958 \times 10^{12}$ /ml
Ad5-p21	5×10^{10} PFU/ml	/	$4,185 \times 10^{12}$ /ml

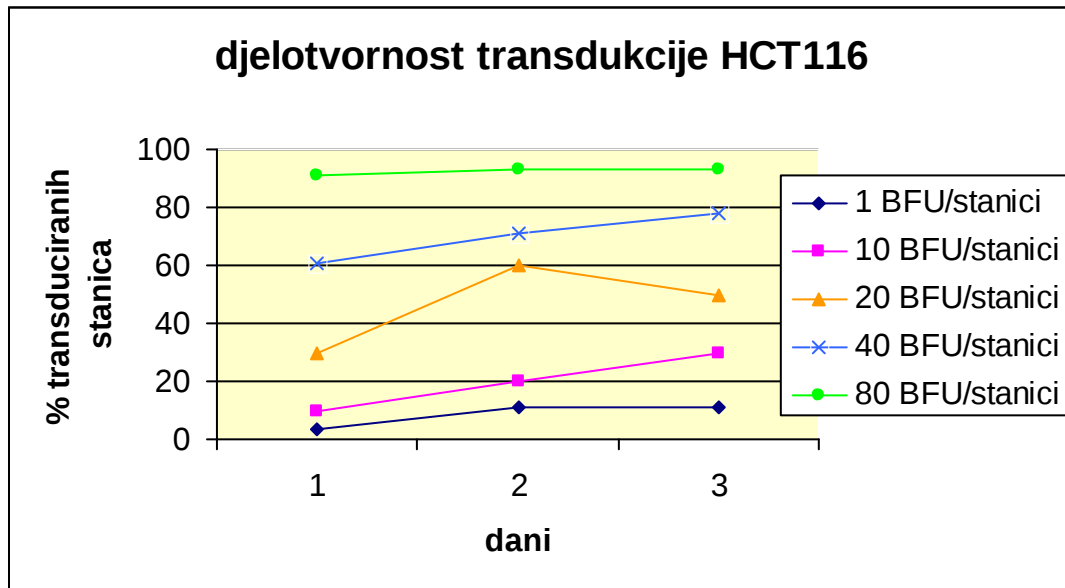
Tablica 2: Rezultati mjerenja virusnog titra različitim metodama

3.2. Određivanje djelotvornosti transdukcije bojenjem na β -galaktozidaznu aktivnost u kulturi stanica

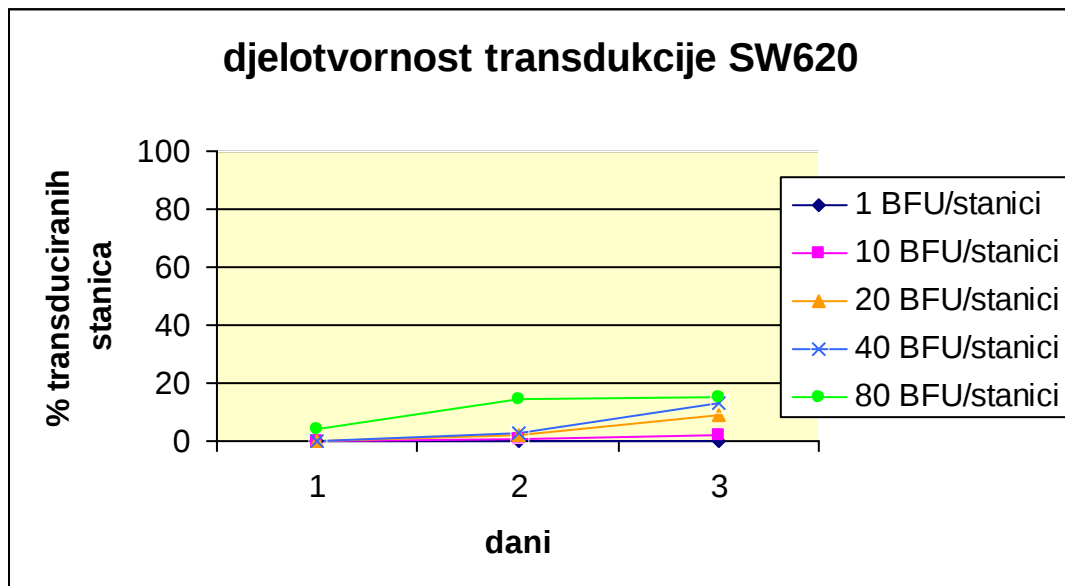
Stanice SW620, SW480 i HCT116 ponovno smo nasadili u plastične pločice s 24 bunarića te ih zarazili nakon 24 sata virusima s ugrađenim genom β -gal u rasponu koncentracija 1-80 BFU/stanici. Nakon 24 sata smo dodali otopinu X-gala i promatrali razvoj plavog obojenja nakon 24, 48 i 72 sata te smo plave stanice brojali pod svjetlosnim mikroskopom.

Odmah smo primijetili da je broj plavih SW620 stanica znatno manji od broja plavih SW480 i HCT116 stanica (slike 15-17). Dok se kod SW480 i HCT116 već pri koncentraciji od 1 BFU/stanici može primijetiti mali broj obojenih stanica, kod SW620 se tek pri koncentraciji od 10-20 BFU/stanici mogu uočiti plava obojenja. Iz ovih rezultata možemo zaključiti da se puno lakše zaražavaju SW480 i HCT116 od SW620 stanica. Sljedeće što možemo primjetiti je porast broja obojanih stanica u vremenu, no različito kod pojedine stanične linije na primjer kod HCT116 stanica pri 80 BFU/stanici gotovo nema porasta u odnosu na prvi dan, jer su skoro sve stanice bile plavo obojene već prvi dan (slika 15). Budući da se u HCT116 stanici nalazi velik broj kopija gena β -gal njihovom ekspresijom nastaje puno preteinskog produkta i javlja se jače plavo obojenje koje je odmah uočljivo pod mikroskopom. SW620 stanica, međutim, možda sadrži tek jednu virusnu česticu koja ju je uspjela zaraziti i ekspresija gena β -gal je slaba te je i

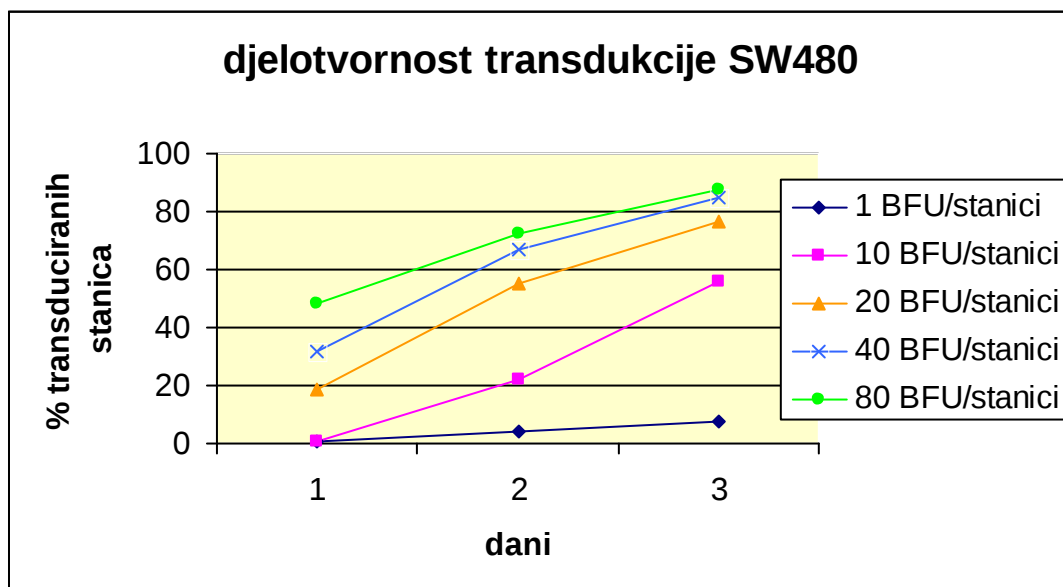
plavo obojenje slabo. Tijekom vremena se ipak javlja sve više proteinskog produkta u SW620 stanici pa nakon 72 sata uočavamo i one stanice koje prije nismo mogli uočiti (slika 16).



Slika 15: Djelotvornost transdukcije HCT116 stanica

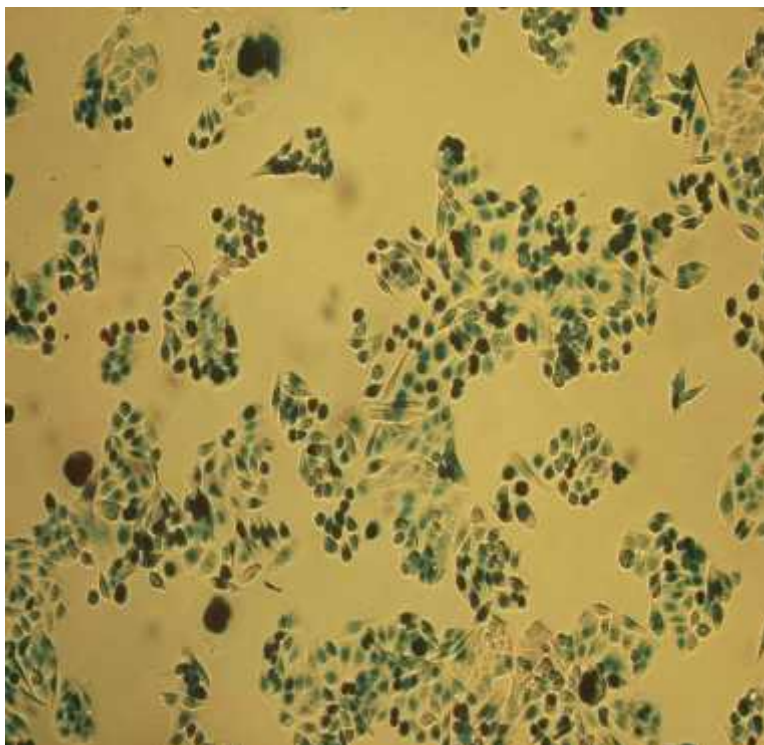


Slika 16: Djelotvornost transdukcije SW620 stanica

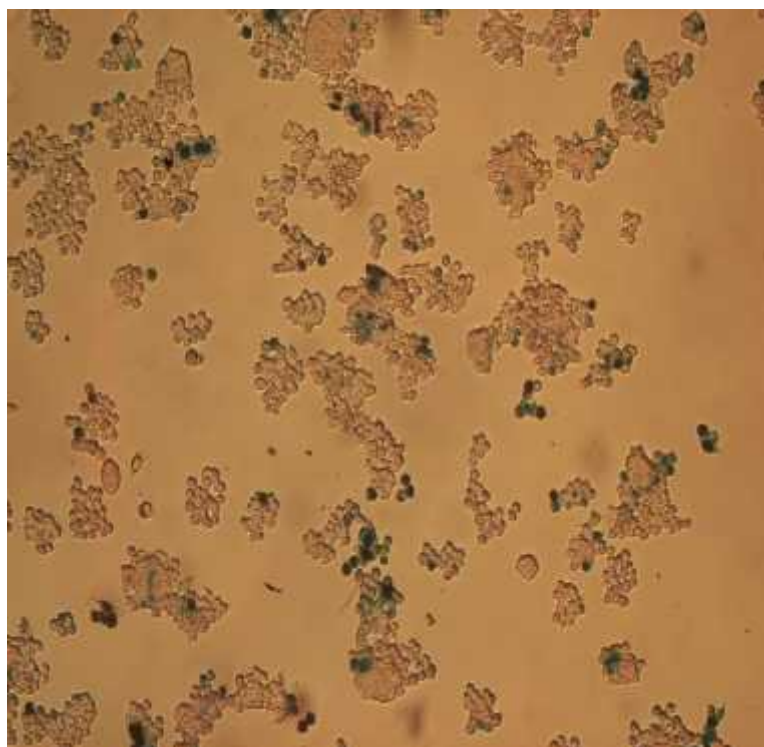


Slika 17: Djelotvornost transdukcije SW480 stanica

Stanice SW480 zaražene koncentracijom od 80 BFU/stanici promatrane pod svjetlosnim mikroskopom nakon 72 sata su prikazane na slici 18. Odmah možemo uočiti značajnu razliku broja plavih stanica u odnosu na SW620 stanice također zaražene sa 80 BFU/stanici i promatrane nakon 72 sata (slika 19).



Slika 18: SW480 zaražene sa 80 BFU/stanici promatrane nakon 72h



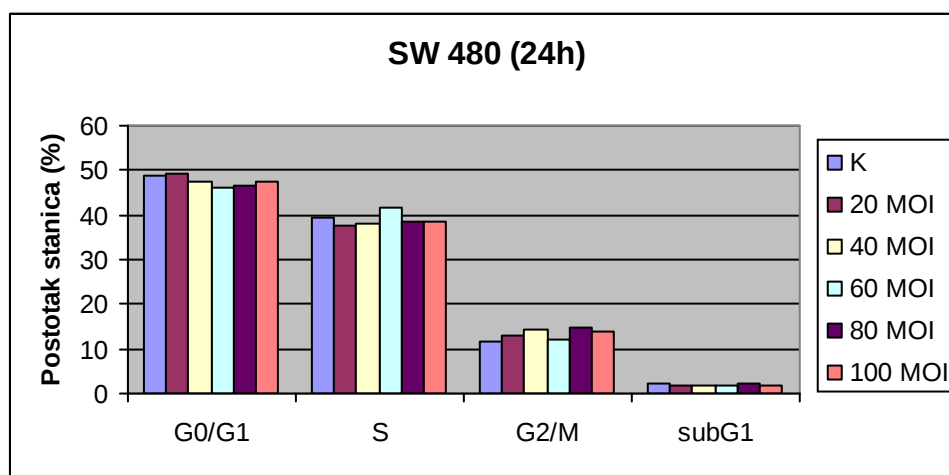
Slika19: SW620 zaražene sa 80 BFU/stanici promatrane nakon 72h

3.3. Analiza utjecaja Ad5-p21 i Ad5- β -gal na stanični ciklus

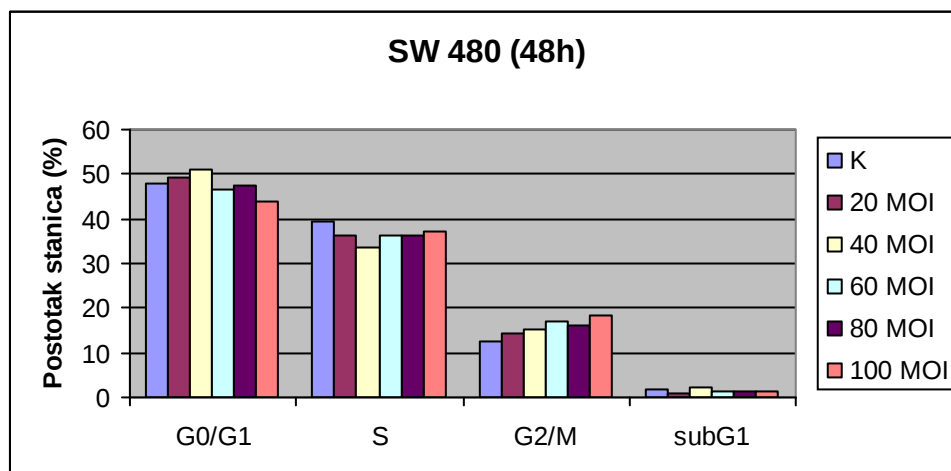
Stanice SW620 i SW480 smo zarazili vektorom Ad5-p21 u različitim koncentracijama, izračunatim prema broju virusnih čestica, a normaliziranim prema broju BFU za vektor Ad5- β -gal. Raspon koncentracija je bio 20 - 100 MOI, pri čemu MOI označava broj BFU/stanici za Ad5- β -gal, odnosno ukupni broj virusnih čestica po stanici za oba virusa pri čemu 10 MOI odgovara 9790 virusa/stanici. Paralelno smo testirali učinak kontrolnog vektora Ad5- β -gal, kako bismo isključili učinak tog vektora na stanični ciklus.

Rezultati analize staničnog ciklusa pokazali su da stanice SW480 zaražene sa Ad5- β -gal pokazuju blagi ali statistički zanemariv porast stanica u G2 fazi sa povećanjem MOI (slike 20-22; slika 32). Nasuprot tome kod SW620 stanica značajno se povećao broj stanica naročito nakon 48 sata u G2 fazi staničnog ciklusa.

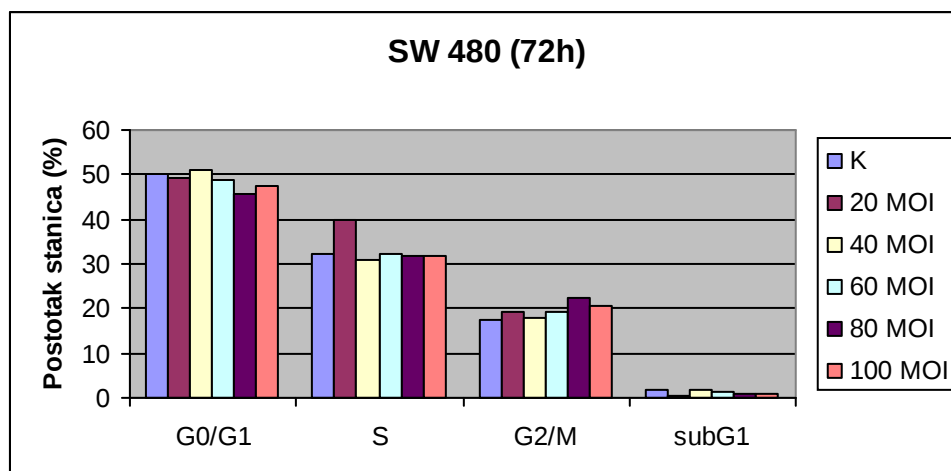
Dakle iz ovih rezultata zaključujemo da adenovirusni vektor sam uzrokuje zastoj ciklusa u G2 fazi u staničnoj liniji SW620 (slike 23-25; slika 33). Na sljedećim slikama je oznakom subG1 označena populacija stanica u apoptozi.



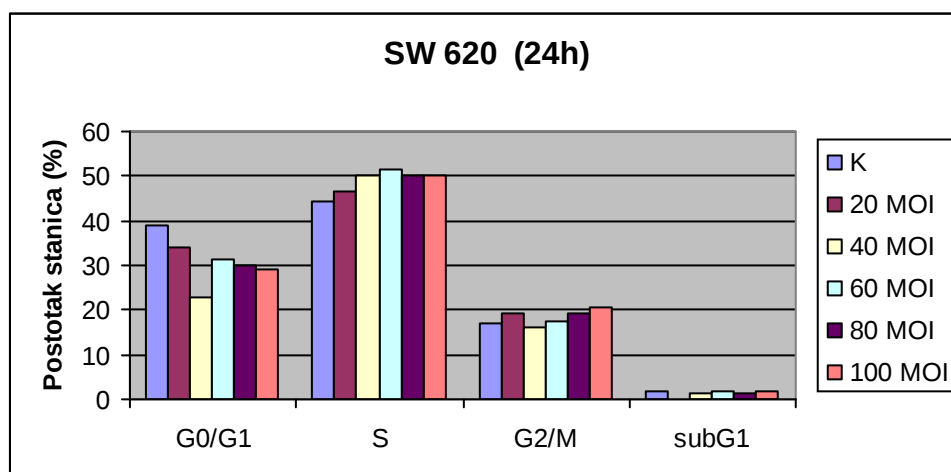
Slika 20: Utjecaj Ad5- β -gal na SW480 zaražene sa 20-100 MOI nakon 24 sata



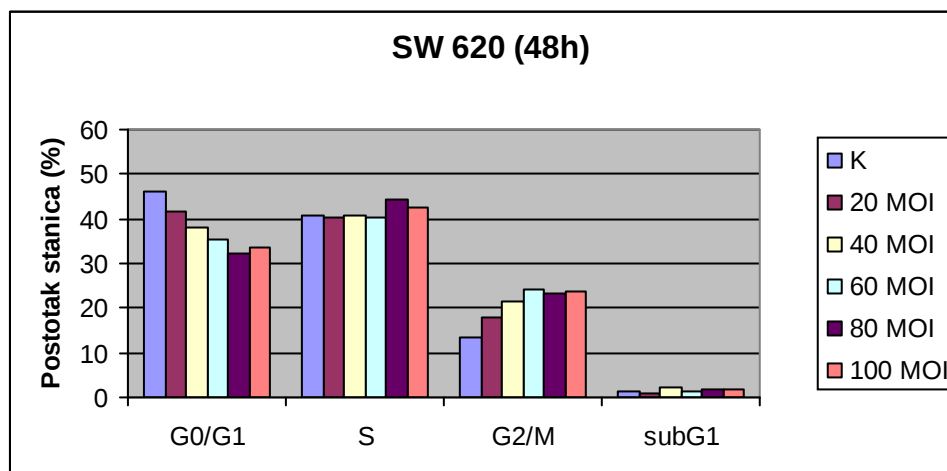
Slika 21: Utjecaj Ad5-β-gal na SW480 zaražene sa 20-100 MOI nakon 48 sata



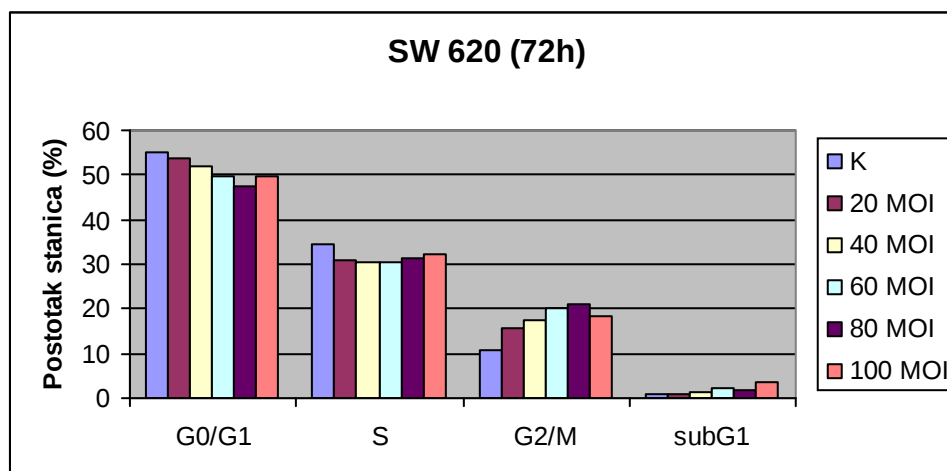
Slika 22: Utjecaj Ad5-β-gal na SW480 zaražene sa 20-100 MOI nakon 72 sata



Slika 23: Utjecaj Ad5-β-gal na SW620 zaražene sa 20-100 MOI nakon 24 sata

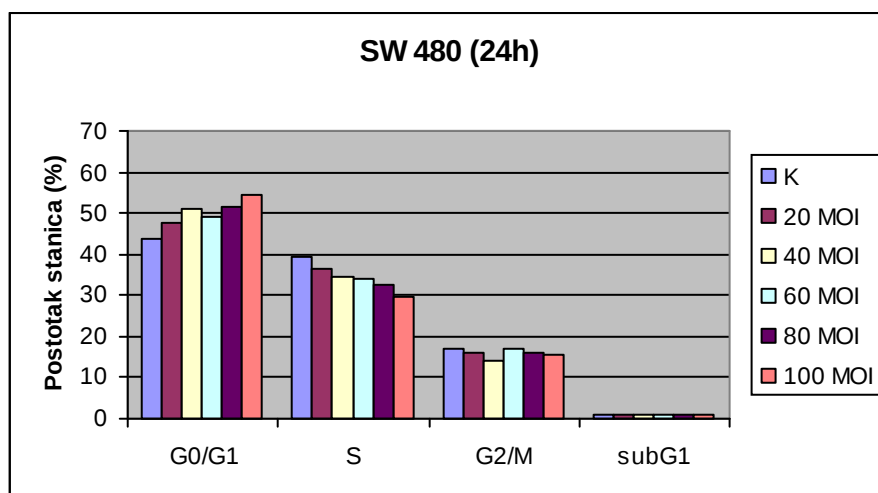


Slika 24: Utjecaj Ad5-β-gal na SW620 zaražene sa 20-100 MOI nakon 48 sata

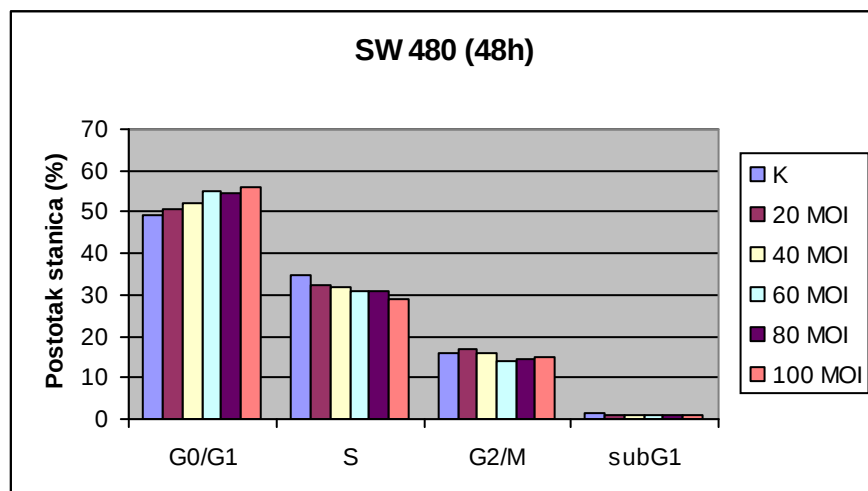


Slika 25: Utjecaj Ad5-β-gal na SW620 zaražene sa 20-100 MOI nakon 72 sata

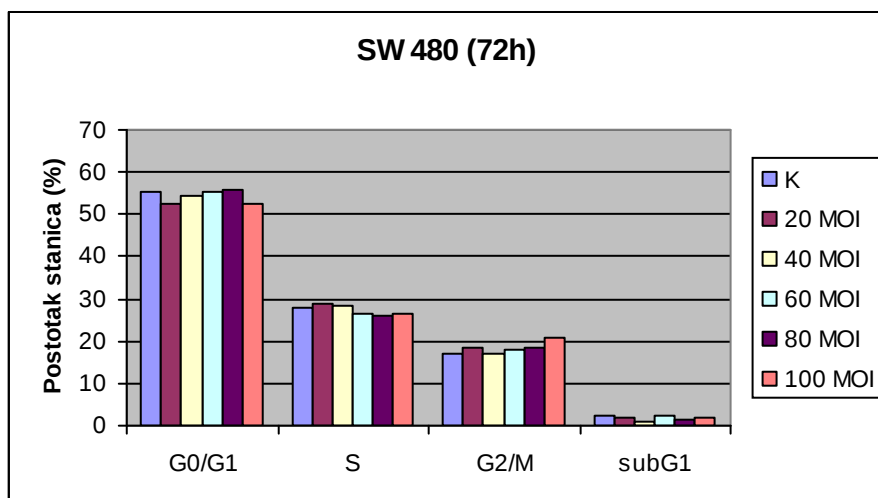
Stanice SW480 zaražene sa Ad5-p21 zaustavljene su u G1 fazi staničnog ciklusa (slike 26-28; slika 34). Učinak je bio jači s povećanjem koncentracije virusa. Međutim, SW620 stanice pokazale su mali porast broja stanica u G2 fazi staničnog ciklusa nakon zaražavanja sa Ad5-p21, slično kao i nakon zaražavanja s Ad5-β-gal (slike 29-31; slika 35). Dakle iz ovih rezultata vidimo da p21 protein ne djeluje na SW620 stanice, a adenovirusni vektor sam uzrokuje blagi zastoj staničnog ciklusa u G2 fazi pri većim koncentracijama kao i pri infekciji sa Ad5-β-gal.



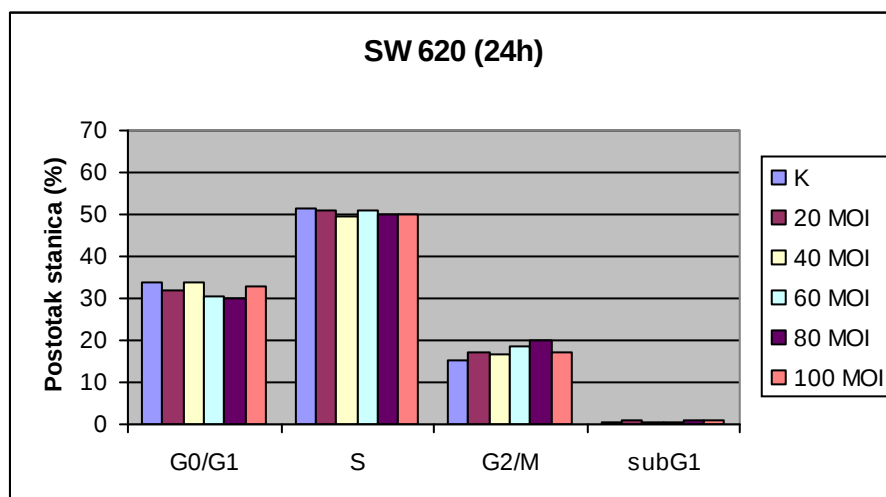
Slika 26: Utjecaj Ad5-p21 na SW480 zaražene sa 20-100 MOI nakon 24 sata



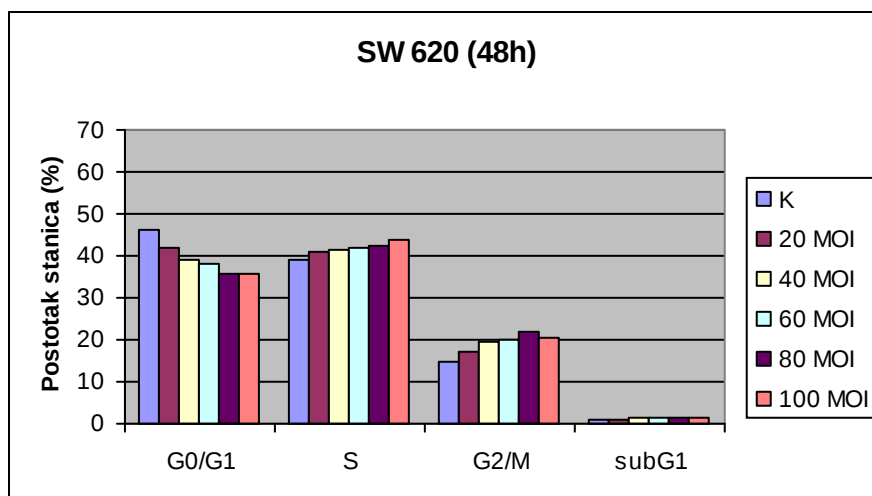
Slika 27: Utjecaj Ad5-p21 na SW480 zaražene sa 20-100 MOI nakon 48 sata



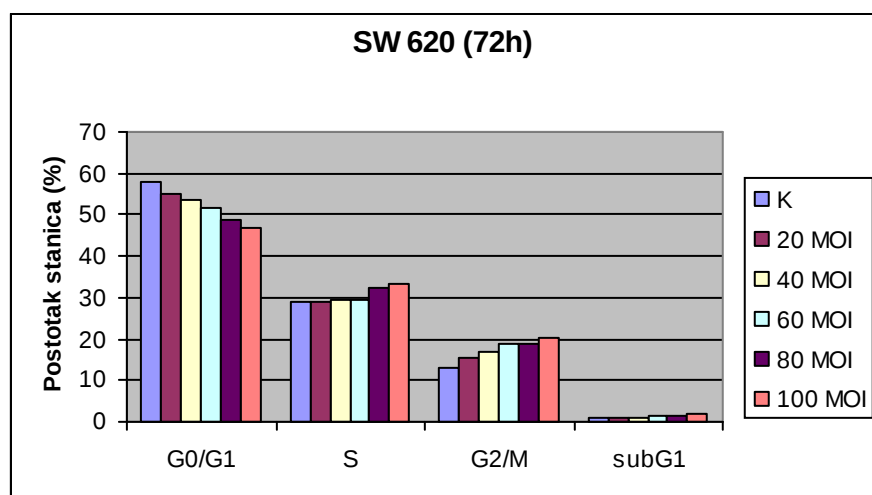
Slika 28: Utjecaj Ad5-p21 na SW480 zaražene sa 20-100 MOI nakon 72 sata



Slika 29: Utjecaj Ad5-p21 na SW620 zaražene sa 20-100 MOI nakon 24 sata



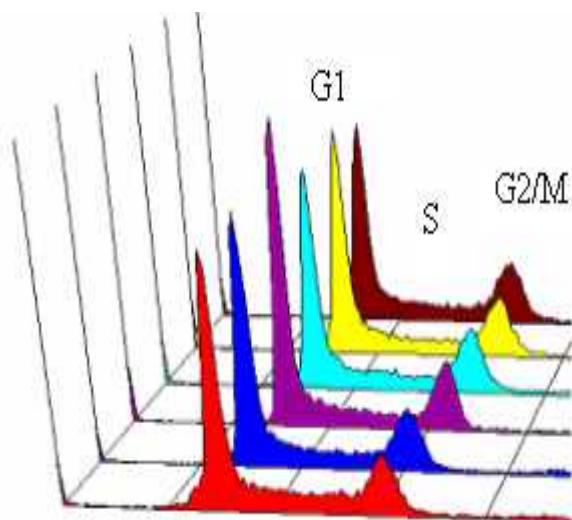
Slika 30: Utjecaj Ad5-p21 na SW620 zaražene sa 20-100 MOI nakon 48 sata



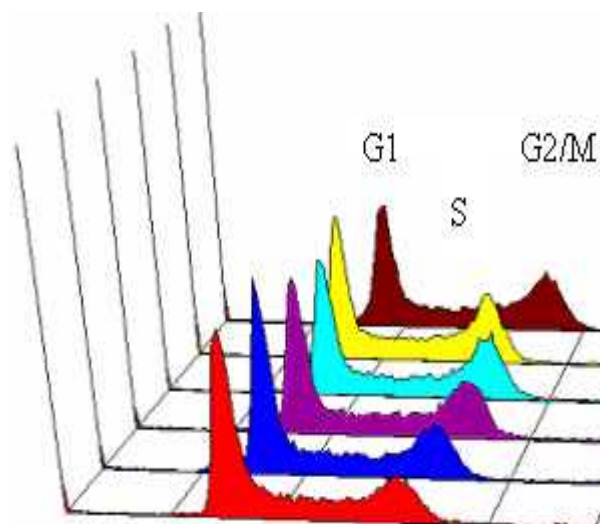
Slika 31: Utjecaj Ad5-p21 na SW620 zaražene sa 20-100 MOI nakon 72 sata

Rezultate dobivene zaražavanjem sa Ad5-p21 te Ad5- β -gal možemo prikazati i pomoću DNA histograma, vidi slike 32-35. Prikazan je utjecaj Ad5-p21 i Ad5- β -gal na SW480 i SW620 stanice zaražene rastućim koncentracijama rekombinantnog vektora nakon 48 sati i možemo odmah uočiti već prije opisane pojave. Površina ispod pojedinih dijelova krivulja predstavlja postotak stanica koje se nalaze u pojedinoj fazi staničnog ciklusa.

Ad5- β -gal

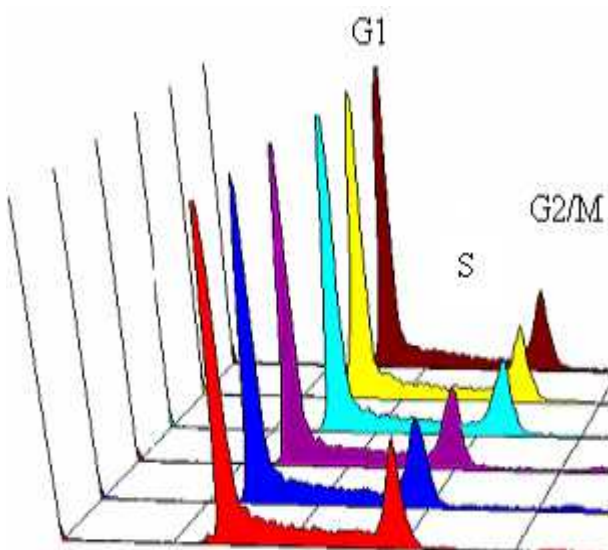


Slika 32: SW480 zaražene sa Ad5- β -gal u koncentracijama od 0, 20, 40, 60, 80, 100 MOI nakon 48 sata

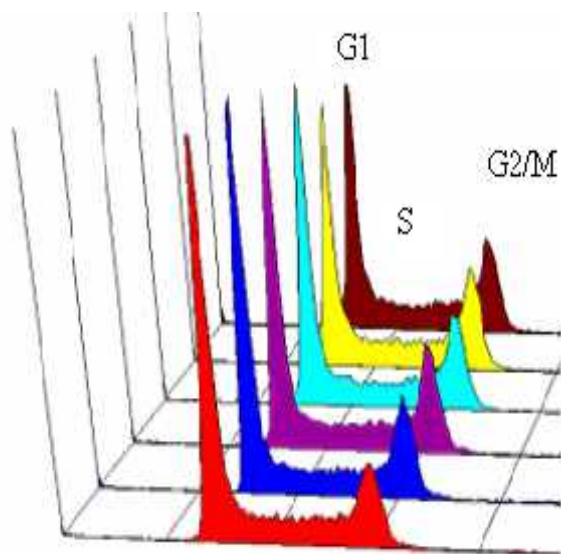


Slika 33: SW620 zaražene sa Ad5- β -gal u koncentracijama od 0, 20, 40, 60, 80, 100 MOI nakon 48 sata

Ad5-p21



Slika 34: SW480 zaražene sa Ad5-p21 u koncentracijama od 0, 20, 40, 60, 80, 100 MOI nakon 48 sata



Slika 35: SW620 zaražene sa Ad5-p21 u koncentracijama od 0, 20, 40, 60, 80, 100 MOI nakon 48 sata

4. RASPRAVA

Rak je još uvijek jedna od najvećih zagonetaka medicine i znanosti uopće. Klinički primjenjivane kirurške metode liječenja, kemoterapije i radioterapije u većini slučajeva ne daju željene rezultate.²⁵ Nova saznanja genetske osnove bolesti su dovele do razvoja novih metoda liječenja na molekularnoj razini. Jedna od metoda je gensko liječenje, koja uključuje prijenos genetskog materijala u stanice sa ulogom izazivanja terapijskog učinka. Ideja genske terapije je prijenos terapijskog gena kako bi se selektivno liječilo bolesno tkivo ne oštećujući normalno zdravo tkivo.⁴⁵

Najveći još uvijek neriješen problem genskog liječenja je konstruiranje odgovarajućeg prijenosnika. Prijenosnik genetskog materijala, vektor, koristi se za prijenos terapijskog gena. Virusni su vektori znatno pogodniji za gensko liječenje od nevirusnih, ipak i njih je potrebno usavršiti kako bi zadovoljavali barem tri osnovna zahtjeva: visoku učinkovitost prijenosa gena, specifičnost zaražavanja i kontroliranu ekspresiju gena.²⁶ Danas se u istraživanjima, ali i u klinički odobrenim protokolima genskog liječenja, poglavito tumora, koriste uglavnom retrovirusni i adenovirusni vektori. Obje vrste vektora imaju brojne prednosti, ali i nedostatke. Retrovirusni vektori pogodniji su za prijenos gena kod nasljednih bolesti. Ugradnjom u genom domaćina te niskim stupnjem imunogeničnosti, omogućuju trajnu stabilnu ekspresiju zdravog gena u ciljnim stanicama. Za razliku od njih, adenovirusni vektori omogućuju samo prolaznu ekspresiju, ne ugrađuju se u genom, a uz to su i jako imunogenični.^{54,55} Ciljne stanice retrovirusima su isključivo stanice koje se dijele. Potencijalna insercijska mutageneza ipak je najveća prepreka primjeni retrovirusnih vektora u genskom liječenju *in vitro*, jer može trajno promijeniti kako tumorske tako i normalne stanice.⁵⁶

Adenovirusne vektore je moguće dobiti u većem titru u odnosu na retrovirusne, zaražavaju širok spektar različitih tipova stanica neovisno o tome dijele li se stanice ili ne te ne izazivaju insercijsku mutagenezu. Korištenje adenovirusnih vektora za kliničko gensko liječenje je široko rasprostranjeno. Od 1192 provedenih kliničkih pokusa iz područja genske terapije u cijelom svijetu u lipnju 2006. godine adenovirusni vektori su se koristili u čak 26 % slučajeva.³⁴ Prema mnogim autorima jeftina i brza proizvodnja vektora visokog titra veliki je korak prema ostvarivanju genskog liječenja.

U ovom smo radu umnožili i pročistili adenovirusne vektore s ugrađenim genom *p21* (Ad5-p21) te genom *β-gal* (Ad5-β-gal) u komplementirajućim stanicama HEK 293.

Metoda pročišćavanja rekombinantnih vektora u gradijentu gustoće cezijeovog klorida najčešće je korištena metoda, iako se danas pokušava primijeniti metoda afinitetne kromatografije kojom se pročišćavaju proteini. Primjena ove metode bi trebala osigurati još viši stupanj čistoće.²⁷

Da bismo odredili koncentraciju, kao i infektivnu snagu umnoženih i pročišćenih vektora, odredili smo im titar, tj. broj aktivnih virusnih čestica u određenom volumenu. Aktivna virusna čestica je ona koja stvara plak u gelu agaroze niskog tališta (PFU, od engl. *plaque forming units*). Titar vektora Ad5-p21 iznosio je 5×10^{10} PFU/ml, a titar Ad5- β -gal 2×10^9 PFU/ml. Dobivene vrijednosti su u skladu s literaturnim podacima.⁵⁷

Međutim, pri prvom pokušaju zaražavanja stanica SW620 i SW480 adenovirusima koji nose gen β -gal, radi određivanja efikasnosti transdukcije gena bojanjem na β -galaktozidaznu aktivnost, pokazalo se da su stanice ugibale čak pri niskim PFU/stanici suprotno dotadašnjem iskustvu. Ti su rezultati ukazali na činjenicu da je virusni pripravak s pročišćenim Ad5- β -gal ipak bio donekle onečišćen neinfektivnim virusnim česticama, tj. dijelovima «prazne» virusne kapside i ostatka virusne čestice. Također je moguće da je došlo do ponovne homologne rekombinacije između virusnih dijelova genoma u HEK 293 stanicama i rekombinantnih adenovirusnih vektora što virusima vraća sposobnost replikacije i lize stanica ponovnom ugradnjom E1 regije.

Stoga smo, potom, odredili ukupni broj virusnih čestica spektrofotometrijskom metodom te smo infektivnu snagu vektora Ad5- β -gal odredili koristeći gen dojavljivač β -gal, bojanjem tzv. «plavih» HEK 293 stanica, tj. stanica koje su eksprimirale enzim β -galaktozidazu (BFU, od engl. *blue forming units*), a koji je iznosio 1×10^{11} BFU/ml.

Naime, virusni titar se može izraziti pomoću PFU i BFU. Da bi se stvorio plak za određivanje PFU, moraju biti zadovoljena dva uvjeta, tj. stanica mora:

- a) sadržavati adenovirusni vektor
- b) eksprimirati E1 regiju kako bi se virus replicirao, lizirao stanice i stvorio plak.

Međutim, neće svi adenovirusi stvoriti plak, jer svaka HEK 293 stanica neće zadovoljavati oba uvjeta, adenovirus se neće moći replicirati pa ga nećemo detektirati iako je uspješno zarazio stanicu. Pri određivanju BFU, treba biti zadovoljen samo prvi uvjet. Čim adenovirus zarazi stanicu transkripcijska mašinerija stanice domaćina će eksprimirati strani gen β -gal. Proteinski produkt tog gena lako možemo uočiti jer enzim

β -galaktozidaza daje cijepanjem supstrata X-gal karakteristično plavo obojenje. Na ovaj način ćemo moći detektirati i one viruse koje računanjem PFU nismo mogli detektirati, pa je BFU uvijek veći od PFU.

S druge strane, omjer broja ukupnih virusnih čestica (N ili v.p.; od engl. *viral particle* ili p.p.: od engl. *physical particle*) i broja PFU ukazuje na kvalitetu virusnog izolata, tj. na omjer infektivnih čestica u odnosu na njihov ukupan broj. Literaturno je poznato da je optimalan omjer v.p./PFU oko 20-50 puta.⁵³ Naši su pokusi pokazali da je izolat virusa Ad5-p21 bio dovoljno kvalitetan (omjer 83,7:1), dok je izolat virusa Ad5- β -gal pokazivao izrazito loš omjer (979:1), upućujući na prevelik broj neučinkovitih virusnih čestica. Upravo je to bio razlog velike toksičnosti tog vektora na sve testirane stanične linije. Iz ovih je rezultata vidljivo da, iako su oba virusa umnožena i pročišćena na isti način te da tijekom ultracentrifugiranja u gradijentu cezijevog klorida ništa nije upućivalo na smanjenu kvalitetu izolata, virusni pripravak vektora Ad5- β -gal nije pokazao zadovoljavajuću kvalitetu.

Jasno je da će uspješnost pokusa u kojima se takvi virusni prijenosnici koriste za transdukciju gena, a u svrhu istraživanja njihove uloge u stanicama, uvelike ovisiti o kvaliteti virusnog izolata upravo stoga što će manji broj virusnih čestica biti potreban za postizanje dovoljno visoke ekspresije željenog gena. U protivnom, visoka koncentracija neinfektivnih čestica ili dijelova kapside, može izazvati toksični učinak na stanice te onemogućiti ekspresiju željenog gena.

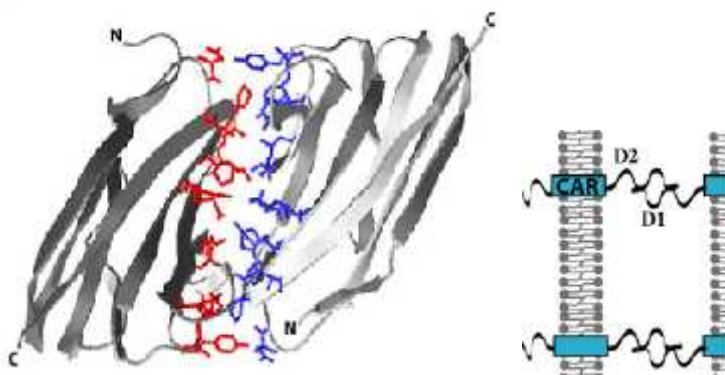
Ipak, sposobnost transdukcije virusa Ad5- β -gal određena iz broja BFU/stanici upućivala je na znatno veći broj virusnih čestica koje mogu uspješno prenijeti željeni gen u stanice pa smo prilagodili koncentraciju virusa prema broju BFU/ml te ponovno zarazili stanice SW620, SW480 i HCT116. Rezultati nakon takvog zaražavanja su bili u skladu s očekivanjima.

Međutim, primjetili smo da je transdukcija različito učinkovita u ove tri stanične linije. Pri tome je stanična linija SW620 pokazivala značajno slabiju ekspresiju gena β -gal od linija SW480 i HCT116. Iako je nakon trećeg dana zamijećen nagli porast plavo obojenih SW620 stanica, nije ni približno postignuta tolika učinkovitost prijenosa gena kao kod SW480 i HCT116 stanica. Dodatno smo na velikim povećanjima svjetlosnog mikroskopa mogli uočiti kako su SW480 i HCT116 stanice žarko obojane cijelom njihovom

površinom, dok se u SW620 nakon 24 sata javlja pri visokim BFU/stanici tek svjetlo plavo obojenje koje ne ispunjava ni cijelu površinu stanice. Tijekom vremena se ipak javlja sve više proteinskog produkta u SW620 stanici pa nakon 72 sata uočavamo i one stanice koje prije nismo mogli uočiti. Iako nas je najviše zanimala mogućnost transdukcije gena u stanice SW480 i SW620 iz razloga što su to stanične linije karcinoma debelog crijeva dobivene iz istog pacijenta, ali s različitim stupnjem zloćudne preobrazbe, dodatno smo koristili i liniju HCT 116, kao još jednu liniju karcinoma debelog crijeva, a kako bismo usporedili sposobnost transdukcije svih triju staničnih linija.

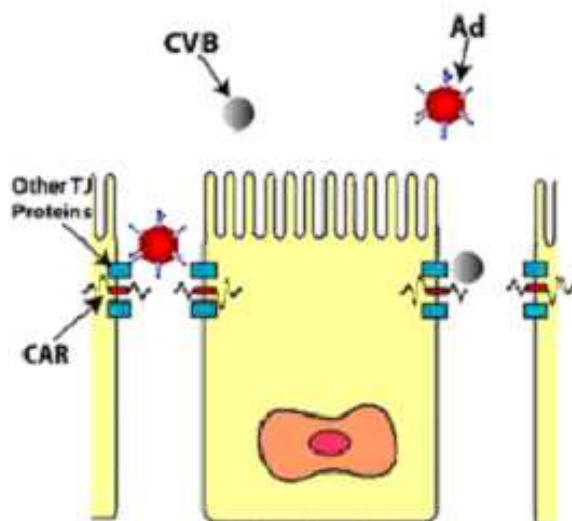
Mogući razlog različite efikasnosti infekcije SW620 i HCT116/SW480 stanica je različita ekspresija primarnog receptora CAR na površini ovih staničnih linija, budući da ekspresija i lokalizacija molekula CAR na staničnoj površini uvjetuje mogućnost infekcije stanice adenovirusom.³⁷ Ekspresija CAR na stanicama primarnih tumora jako varira, dok je gubitak njegove ekspresije povezan s progresijom maligne preobrazbe i agresivnošću tumorskih stanica.⁴⁵ Uočeno je da prekomjerna ekspresija CAR proteina smanjuje proliferaciju tumorskih stanica *in vitro* i *in vivo*, te ukazuje na ulogu CAR proteina kao tumor supresora.³⁸ Smanjena adhezivnost je jedna od mnogobrojnih karakteristika tumorskih stanica. Budući da se izražaj CAR molekula smanjuje tijekom maligne transformacije stanica to može poslužiti kao dobar indikator sposobnosti metastaziranja raka. Na osnovi ovih istraživanja možemo povući poveznicu s našim dobivenim rezultatima. Naime, stanična linija SW620, kako je već rečeno, izolirana iz metastaze primarnog tumora iz kojeg je izolirana linija SW480, dakle ima viši stupanj zloćudne preobrazbe. Dakle, stanice SW620 bi trebale imati manji broj CAR receptora na svojoj površini od SW480 što bi objašnjavalo slabiju infektivnost adenovirusnih vektora dobivenih u našim rezultatima. Osim toga, uočena je obrnuta korelacija između razvojnog stadija tumora i aktivacije signalnog puta RAS-MAPK i između ekspresije primarnog receptora CAR.⁴¹ Uloga primarnog receptora CAR nije još u potpunosti razjašnjena. CAR je lokaliziran na kontaktnim površinama između dviju stanica i čini se da ima ulogu u staničnoj adheziji i međustaničnom prepoznavanju. Na epitelnim stanicama CAR se nalazi ispod čvrstih veza (od engl. *tight junction*, TJ) dok je na drugim stanicama izražen po cijeloj staničnoj površini, ali preferencijalno na mjestima

međustaničnog kontakta. CAR se ponaša tipično kao i svaka adhezijska molekula pospješujući agregaciju stanica.³⁸ U tome sudjeluje IgV (D1) domena CAR receptora koja je evolucijski očuvana i dimerizira sa IgV (D2) domenom CAR receptora susjedne stanice (slika 36).⁵⁸



Slika 36: D1/D2 dimer; preuzeto iz Coyne i sur. (2005)⁵⁸

Međutim interakcija vlakna adenovirusa s CAR receptorom na staničnoj površini narušava integritet dimera i time uzrokuje odvajanje stanica (slika 37).



Slika 37: Napad adenovirusa (Ad) i narušavanje CAR-CAR interakcije; preuzeto iz Coyne i sur.(2005)⁵⁸

Kako, međutim, objasniti toksični učinak adenovirusa kojeg smo primjetili djelovanjem adenovirusa s ugrađenim genom β -gal na stanice SW620, ukoliko je broj CAR receptora smanjen? Odgovor se možda krije u različitom broju i/ili vrsti sekundarnih receptora za adenoviruse - integrina - na površini SW620 stanica. Naime, iako se mislilo da je

pentonska baza adenovirusne kapside toksična i uzrokuje odvajanje stanica od izvanstaničnog okoliša u kulturi, danas se zna da pentonska baza nije toksična, ali ometa interakciju integrina s izvanstaničnim okolišem dovodeći do odvajanja stanica *in vitro*. Osim toga, vezanje adenovirusa na integrine okida niz specifičnih signalnih događaja u stanicama koji značajno utječu naročito na promjene u citoskeletu. Stoga, bi ipak toksičnost vektora na SW620 stanice mogla imati podlogu u njihovom vezanju na integrine.³⁹ Smatra se također da je citotoksičnost i poticaj apoptoze putem adenovirusa djelomično rezultat interakcije vektora s metabolizmom stanice domaćina i regulacijom staničnog ciklusa.⁵⁹ Uočena je npr. indukcija apoptoze putem gena regije E4 koji je prisutan u replikacijski defektnim adenovirusnim vektorima što ukazuje na to da bi taj gen mogao biti odgovoran za indukciju stanične smrti u stanicama raka.⁶⁰

Kako bismo nastavili s pokusima u kojima želimo istražiti učinak povećane ekspresije gena *p21* na stanični ciklus stanica karcinoma debelog crijeva, a da pri tom isključimo mogući učinak samog vektora, koristili smo isti broj virusnih čestica (v.p.) oba virusna vektora, na način da smo ih normalizirali prema broju BFU/stanici za vektor Ad5- β -gal koji je bio dovoljan za transdukciju svih, pa tako i linije SW620. Pokusi s virusom Ad5-*p21* dali su izrazito zanimljiv podatak koji je upućivao da učinak povećane ekspresije gena *p21* izaziva zaustavljanje staničnog ciklusa u G1 fazi stanica SW480, a u G2 fazi stanica SW620. No, koristeći kontrolni virus (Ad5- β -gal) pokazalo se da je učinak na ciklus stanica SW620 bio rezultat isključivo samog vektora, koji je također zaustavio ciklus ovih stanica u G2 fazi. Drugim riječima, toksični učinak samog vektora bio je vidljiv i kroz njegovo djelovanje na stanični ciklus. Taj učinak je bio statistički zanemariv kod stanica SW480.

Genski produkti rekombinantnih replikacijski defektnih adenovirusa prve generacije mogu inducirati poremećaj u regulaciji staničnog ciklusa. Adenovirus koristi transkripcijsku mašineriju stanice domaćina za ekspresiju vlastitih gena aktivirajući progresiju staničnog ciklusa i inhibirajući G1 kontrolnu točku. Analiza staničnog ciklusa je pokazala smanjenje broja stanica u G1 a povećanje broja stanica u G2 fazi staničnog ciklusa djelovanjem adenovirusnih vektora.⁶¹ Ovaj podatak točno potvrđuje naše rezultate dobivene analizom staničnog ciklusa stanica SW480 i SW620 putem protočnog citometra. Naši rezultati ukazuju na blagi (SW480), odnosno znatni (SW620) porast

stanica u G2 fazi staničnog ciklusa stanica tretiranih s Ad- β -gal. Osim toga, adenovirusna rana regija 4 kodira *orf 4* (od engl. *open reading frame 4* = otvoreni okvir čitanja 4) koji se veže s protein fosfatazom 2A (PP2A) i na taj način inducira nepovratno zaustavljanje staničnog ciklusa u G2 fazi. Inducira i apoptozu.⁵⁹ Apoptozi se suprotstavljaju genski produkti E1 regije koje sadrži adenovirusni genom. Kako rekombinantnom adenovirusnom vektoru nedostaje ta regija moguće je izazvati apoptozu. Adenovirusni genski produkt *orf6/7* također regije E4 se veže na p53 i time inaktivira kontrolnu točku G1. Smanjenje razine pRb proteina interakcijom s virusnim produktima je također uočeno. Poznato je da veliki T antigen SV40 virusa i E7 genski produkt HPV16 virusa veže pRb protein. Kako dolazi do gubitka glavnog supstrata pRb, sistem p53/p21 je nedovoljan za zaustavljanje ciklusa u G1 fazi. pRb također igra ulogu u prijelazu iz G2 faze u mitozu.⁶¹ Sad se postavlja pitanje zašto adenovirus izaziva zastoj u G2 fazi? Koje koristi ima od toga? Zaustavljanje staničnog ciklusa je bitno jer nakon replikacije virusne DNA u jezgri moraju 36 kb veliki virusni genomi izaći iz jezgre. Narušava se integritet stanične membrane kako bi virusna DNA izašla u citoplazmu i kako bi se sastavljale virusne čestice.⁶³ Dakle, zaustavljanje u G2 fazi, inducirano virusnim proteinima, predstavlja mehanizam za odstranjenje prepreke jezgrine membrane u ono vrijeme tijekom virusne replikacije koje najbolje odgovara virusu.^{62,63} Analiza staničnog ciklusa stanica inficiranih s ozračenim adenovirusima nije pokazala zastoj ciklusa u G2 fazi.²¹

Rezultati dobiveni analizom staničnog ciklusa SW480 stanica tretiranih s Ad-p21 uglavnom su u skladu s literaturnim podacima vezanim za ulogu gena *p21* u inhibiciji staničnog ciklusa. Naime, p21 je nuklearni protein koji je uključen u mehanizam nastanka zastoja staničnog ciklusa, a koji omogućuje stanici popravak oštećenja DNA, diferencijaciju i dovodi do apoptoze.¹⁵ Kao odgovor na oštećenje DNA aktivira se tumor supresor p53 koji je negativni regulator staničnog rasta. Tumor supresori sudjeluju u normalnom funkcioniranju staničnog ciklusa, sprečavajući nekontrolirano dijeljenje stanica odnosno pojavu tumora. Aktivacija p53 rezultira transkripcijom niza gena među kojima je i gen *p21*.¹⁶ Aktivacija p21^{WAF1/CIP1} proteina uzrokuje zastoj u G1 fazi staničnog ciklusa. p21^{WAF1/CIP1} inhibira specifične kinaze ovisne o ciklinu koje su odgovorne za prijelaz iz G1 u S fazu staničnog ciklusa. Naši rezultati su potvrdili ovakav slijed događaja. Analizom pomoću protočnog citometra vidjelo se da Ad5-p21 uzrokuje

zaustavljanje staničnog ciklusa u G1 fazi ali samo u SW480 staničnoj liniji. U SW620 stanicama Ad5-p21 je izazvao zastoj staničnog ciklusa u G2 fazi, kako je prethodno objašnjeno. Slične rezultate su dobili i drugi istraživači, naime inficirajući stanice adenovirusnim vektorom s ugrađenim genom *p53* su inducirali ekspresiju gena *p21* u SW620 stanicama, ali nije uočen zastoj staničnog ciklusa u G1 fazi. To je možda rezultat drugih mutacija u toj staničnoj liniji.¹⁶ Meta *p21* proteina je regulatorni sistem retinoblastoma proteina i djelovanjem *p21* na njega posredstvom inhibicije kompleksa ciklina/CDK, inducira se zastoj staničnog ciklusa u G1 fazi i sprečava se replikacija DNA. Međutim poznato je da je pRb često inaktiviran u tumorima kod ljudi rezultirajući promjenama regulacije ciklusa, nedjelovanjem *p21* proteina i održavanjem transformiranog stanja.²² Poznato je da su mutacije gena *p21* iznimno rijetke te je inhibicijski efekt vjerojatno uzrokovan mutacijama nizvodno u signalnom putu kao u slučaju pRb.⁶⁴ Također su biokemijske razlike signalnih puteva između staničnih linija mogući uzrok različitog djelovanja istog rekombinantnog adenovirusnog vektora. Tako npr. biokemijske razlike između SUDHL-1 i L428 stanica su povezane s različitim odgovorima na citotoksičan efekt inhibitora ciklin ovisnih kinaza rekombinantnih virusa.¹ Možemo pretpostaviti da u slučaju SW620 stanica *p21* protein ne djeluje na stanični ciklus zbog određenih mutacija nizvodno u signalnom putu ili zbog biokemijskih razlika signalnih puteva između staničnih linija. Ipak rezultati su pokazali zaustavljanje ciklusa u G2 fazi kod SW620 stanica, što, kako je već navedeno, možemo pripisati samom adenovirusnom vektoru, njegovoj sposobnosti zaustavljanja ciklusa u G2 fazi i izazivanja apoptoze. Zanimljiv je podatak da kombinirano zaražavanje stanica istovremeno sa Ad5- β -gal i sa Ad5-p21 štiti stanice od apoptoze i toksičnosti uzrokovane putem adenovirusnog vektora.⁵⁹ Budući da *p21* djeluje na način da zaustavlja ciklus u G1 fazi kako bi se popravilo oštećenje, time sprečava apoptozu i na taj način se suprotstavlja adenovirusnom vektoru.

Ukratko, možemo zaključiti da korištenje adenovirusnih vektora u istraživanju uloge gena *p21* (a vjerojatno i drugih gena uključenih u regulaciju staničnog ciklusa) nije sasvim prikladno, odnosno, izrazito je ovisno o vrsti (tipu) stanica koje se koriste, kako zbog mogućeg utjecaja samih vektora na ciklus, tako i zbog mogućih razlika u genetskom kontekstu pojedinih stanica.⁵⁹

5. ZAKLJUČAK

1. Adenovirusne vektore moguće je relativno jednostavno umnožiti u visokom titru.
2. Iako se titar virusnih vektora najčešće određuje putem broja aktivnih virusnih čestica (PFU, od engl. *plaque forming units*), takav način određivanja koncentracije virusa nije uvijek zadovoljavajući jer postoji mogućnost «zagađenja» virusnog pripravka neinfektivnim virusnim česticama koje mogu pokazivati toksični učinak na stanice.
3. Stoga je najbolje nakon pročišćavanja virusa, odrediti ukupan broj virusnih čestica (infektivnih i neinfektivnih) te odrediti omjer ukupnog broja čestica i aktivnih čestica koje mogu stvarati plakove. Također, ukoliko vektor u sebi ima ugrađen gen dojavljivač β -gal, potrebno je odrediti i broj virusnih čestica koje bojaju stanice u plavo (BFU, od eng. *blue forming units*) kao idealnu mjeru transdukcije stanica.
4. Različite tumorske stanične linije pokazuju različitu moć transdukcije putem adenovirusnih vektora, najvjerojatnije zbog različite ekspresije receptora CAR i/ili integrina na membranama.
5. Kako i sami adenovirusni vektori mogu utjecati na stanični ciklus, potreban je izuzetan oprez kod njihovog korištenja u istraživanju gena koji reguliraju stanični ciklus, zbog mogućeg lažnog rezultata.
6. Povećana ekspresija gena *p21* izaziva zastoj u G1 fazi staničnog ciklusa stanica SW480, dok je njegova uloga u stanicama SW620 upitna zbog snažnog utjecaja samog adenovirusnog vektora na stanični ciklus (zaustavljanje u G2 fazi).

6. LITERATURA

1. Turturro F. Recombinant adenovirus-mediated cytotoxic gene therapy of lymphoproliferative disorders: is CAR important for the vector to ride. *Gene Ther.* 2003; 10: 100–104.
2. Vile RG, Russell SJ. Gene transfer technologies for gene therapy of cancer. *Gene Ther.* 1994; 1: 88-98.
3. Kralj M, Husnjak K, Körbler T, Pavelić J. Endogenous p21^{WAF1/CIP1} status predicts the response of human tumor cells to wild-type p53 and p21^{WAF1/CIP1} overexpression. *Cancer Gene Ther.* 2003; 10: 457-467.
4. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science.* 1994; 266: 1821-1828.
5. Pucci B, Kasten M, Giordano A. Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia.* 2000; 2: 291-299.
6. Paulovich AG, Toczyski DP, Hartwell LH. When checkpoints fail. *Cell.* 1997; 88: 315-321.
7. Fischer PM, Lane DP. Inhibitors of cyclin-dependent kinases as anti-cancer therapeutics. *Curr Med Chem.* 2000; 7: 1213:1245
8. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science.* 1996; 274: 1672-1676
9. Cooper GM. *The Cell*, 2nd ed. ASM Press, The American Society for Microbiology, Washington DC, 2000 :14.
10. <http://www-rcf.usc.edu/~forsburg/images/CDKcyclins.jpg>
11. Harper JW, Elledge SJ. Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 1996; 6: 56-64.
12. Subbareddy M, Sudharsana RA, Soumya P, Paranjothy T, Weglarczyk K, Zuse A, Eshraghi M, Manda KD, Wiechec E, Los M. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: Implications for cancer therapy. *Drug Resist Update.* 2007; 10: 13-29.
13. Child ES, Mann DJ. The intricacies of p21 phosphorylation, protein/protein interactions, subcellular localization and stability. *Cell Cycle.* 2006; 5: 1313-1319.
14. Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart MJ. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Ann Oncol.* 2005; 16: 1723-1739.
15. Draus JM, Elliott MJ, Atienza C, Stilwell A, Wong SL, Dong Y, Yang H, McMasters KM. p53 gene transfer does not enhance E2F-1-mediated apoptosis in human colon cancer cells. *Exp Mol Med.* 2001; 4: 209-219.
16. Singhal S, Vachani A, Antin-Ozerkis D, Kaiser LR, Albelda SM. Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis, biomarkers in non-small cell lung cancer: a review. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 3974- 3986.
17. Alban RS, Pardee AB. p21^{WAF1/CIP1/SDI1} is elevated through a p53-independent pathway by mimosine. *Cell Growth Differ.* 1996; 7: 893-901.
18. Elliott MJ, Stilwell A, Dong YB, Yang HL, Wong SL, Wrightson WR, Martin RCG, McMasters KM. C-terminal deletion mutant p21^{WAF1/CIP1} enhances E2F-1-mediated apoptosis in colon adenocarcinoma cells. *Cancer Gene Ther.* 2002; 9: 453 – 463.

19. Weinberg WC, Denning MF. P21^{WAF1} control of epithelial cell cycle and cell fate. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002; 13: 453-464.
20. Hershenson MB. p21^{WAF1/CIP1} and the prevention of oxidative stress. *Am J Physiol Lung C.* 2004; 286: 502-505.
21. Swanton C. Cell-cycle targeted therapies. *Oncology.* 2004; 5: 27-36.
22. Liu S, Bishop WR, Liu M. Differential effects of cell cycle regulatory protein p21^{WAF1/CIP1} on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy. *Drug Resist Update.* 2003; 6: 183-195.
23. Liu G, Lozano G. p21 stability: linking chaperons to a cell cycle checkpoint. *Cancer Cell.* 2005; 7: 113-114.
24. Friedmann T. Overcoming the obstacles to gene therapy. *Sci Am.* 1997; 80-85.
25. Kralj M. Vrste genskog liječenja. U: Polšek D, Pavelić K(ur). Društveni značaj genske tehnologije. Institut društvenih znanosti Ivo Pilar, Zagreb. 1999; 115-120.
26. Prince HM. Gene transfer: a review of methods and applications. *Pathology.* 1998; 30: 335-347.
27. Wu N, Atsai MM. Production of viral vectors for gene therapy applications. *Curr Opin Biotech.* 2000; 11: 205-208
28. Gutierrez AA, Lemoine NR, Sikora K. Gene therapy for cancer. *Lancet.* 1992. 339: 715-721.
29. <http://www.mc.vanderbilt.edu>
30. <http://fiona.umsmed.edu>
31. Zhang WW. Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther.* 1999; 6: 113-118.
32. Józkowicz A, Dulak J. Helper-dependent adenoviral vectors in experimental gene therapy. *Acta Biochim Pol.* 2005; 52: 589-599.
33. Lee TWR, Matthews DA, Blair GE. Novel molecular approaches to cystic fibrosis gene therapy. *Biochem J.* 2005; 387: 1-15.
34. Campos SK, Barry MA. Current advances and future challenges in adenoviral vector biology and targeting. *Curr Gene Ther.* 2007; 7: 189-204.
35. Fabry CMS, Manuel Rosa-Calatrava M, Conway JF, Zubieta C, Cusack S, Ruigrok RWH, Schoehn G. A quasi-atomic model of human adenovirus type 5 capsid. *EMBO J.* 2005; 24: 1645-1654.
36. Nemerow GR. Cell receptors involved in adenovirus entry. *Virology.* 2000; 274: 1-4.
37. Kirby I, Davison E, Bevil AJ, Soh CPC, Wickham TJ, Roelvink PW, Kovesdi I, Sutton BJ, Santis G. Identification of contact residues and definition of the CAR-binding site of adenovirus type 5 fiber protein. *J Virol.* 2000; 74: 2804-2813.
38. Hauwel M, Furon E, Gasque P. Molecular and cellular insights into the coxsackie-adenovirus receptor: role in cellular interactions in the stem cell niche. *Brain Res Rev.* 2005; 48: 265– 272.

39. Nemerow GR, Stewart PL. Role of α_v integrins in adenovirus cell entry and gene delivery. *Microbiol Mol Biol R.* 1999; 63: 725-734.
40. <http://www.qbiogene.com/technical/faq/faq-adenoexpress.shtml>
41. Kanerva A, Hemminki A. Modified adenoviruses for cancer gene therapy. *Int J Cancer.* 2004; 110: 475-480.
42. Relph K, Harrington K, Pandha H. Recent developments and current status of gene therapy using viral vectors in the United Kingdom. *BMJ.* 2004; 329: 839-42.
43. Palmer D, Philip NG. Helper-dependent adenoviral vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther.* 2005; 16: 1-16.
44. Barnett GB, Crews CJ, Douglas JT. Targeted adenoviral vectors. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1-14.
45. Rein DT, Breidenbach M, Curiel DT. Current developments in adenovirus-based cancer gene therapy. *Future Oncol.* 2006; 2(1): 137-143.
46. Stryer L. *Biochemistry*, 4th ed. W.H. Freeman and company, New York. 2003: 56.
47. Katayose D, Gudas J, Nguyen H, Srivastava S, Cowan KH, Seth P. Cytotoxic effects of adenovirus-mediated wild-type p53 protein expression in normal and tumor mammary epithelial cells. *Clin Cancer Res.* 1995; 1: 889-897.
48. Eastham JA, Hall SJ, Sehgal I, Whang J, Timme TL, Yang G, Connel-Crowley L, Elledge SJ, Zhang W, Harper JW, Thompson TC. In vivo gene therapy with p53 or p21 adenovirus for prostate cancer. *Cancer Res.* 1995; 55: 5151-5155.
49. Atlas RM. Poglavlje, U : Smith JM, Callanan RJ, Laulainen DL (ur). *Principles of microbiology.* Mosby, St. Louis. 1994; 315-317.
50. Mitterender N, March KL, Trapnell BC. Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J Virol.* 1996; 70: 7498-7508.
51. http://www.nugi-zentrum.de/Experimente/Biochemie/beta_Gal.html
52. <http://www.cyto.purdue.edu/>
53. <http://www.vectorbiolabs.com/vbs/faq-product.html>
54. Romano G, Pacilio C, Giordano A. Gene transfer technology in therapy: current applications and future goals. *Stem Cells.* 1999; 17: 191-202.
55. Romano G, Micheli P, Pacilio C, Giordano A. Latest developments in gene transfer technology: achievements, perspectives and controversies over therapeutic applications. *Stem Cells.* 2000; 18: 19-39.
56. Nielsen LL, Maneval DC. p53 tumor suppressor gene therapy for cancer. *Cancer Gene Ther.* 1998; 5: 52-63.
57. Kamen A, Henry O. Development and optimization of an adenovirus production process. *J Gene Med.* 2004; 6: 184-192.

58. Coyne CB, Jeffrey M, Bergelson T. CAR: A virus receptor within the tight junction. *Adv Drug Delivery Rev.* 2005; 57: 869-882.
59. Wolff G, Schumacher A, Nuessler AK, Ruppert AP, Karawajew L, Wehnes E, Neuhaus P. Coexpression of p21^{WAF1/CIP1} in adenovirus vector transfected human primary hepatocytes prevents apoptosis resulting in improved transgene expression. *Gene Ther.* 2003; 10: 668-677.
60. Teramoto S, Matsuse T, Matsui H, Ohga E, Ishii T, Ouchi Y. Recombinant E1-deleted adenovirus vector induces apoptosis in two lung cancer cell lines. *Eur Respir J* 1999; 13: 1125-1132.
61. Kuhn H, Liebers U, Gessner C, Karawajew L, Ruppert V, Schumacher A, Witt C, Wol G. Infection of cells with replication deficient adenovirus induces cell cycle alterations and leads to downregulation of E2F-1. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 106-115.
62. Weiss RH. p21^{WAF1/CIP1} as a therapeutic target in breast and other cancers. *Cancer Cell.* 2003; 4: 425-429.
63. Heilman DW, Green MR, Teodoro JG. The anaphase promoting complex. A critical target for viral proteins and anti-cancer drugs. *Cell Cycle.* 2005; 4: 560-563.
64. Backert S, Gelos M, Kobalz U, Hanski ML, Bovin C. Differential gene expression in colon carcinoma cells and tissues detected with a cDNA array. *Int J Cancer.* 1999; 82: 868-874.