

# In vitro testiranje združenog djelovanja kemoterapeutika i sintetskih liganada za receptor TLR7 u staničnoj liniji H1299

---

Vukić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:798897>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-01**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Ana Vukić

***In vitro* testiranje združenog djelovanja kemoterapeutika i sintetskih  
liganada za receptor TLR7 u staničnoj liniji H1299**

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za naprednu genomiku na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom dr. sc. Jelene Knežević, više znanstvene suradnice. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

## **Zahvale**

Zahvaljujem se prvenstveno mentorici dr. sc. Jeleni Knežević, kao i suvoditeljici prof. dr. sc. Nadi Oršolić na strpljenju, pomoći i susretljivosti pri izradi ovog diplomskog rada.

Hvala doktorandici Maji Šutić na vodstvu kroz eksperimentalni dio rada, kao i savjetima prilikom pisanja.

Također, hvala i doktorandu Jurici Baranašiću na pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada u laboratoriju.

Veliko hvala, naročito mojim roditeljima i sestri, a zatim i prijateljima: Moniki, Ledi, Martini, Ani, Lani, Barbari, Bojanu i Luki na svojoj ljubavi i podršci koju su mi pružili.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### ***In vitro* testiranje združenog djelovanja kemoterapeutika i sintetskih liganada za receptor TLR7 u staničnoj liniji H1299**

Ana Vukić

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Karcinom pluća drugi je najčešće dijagnosticirani maligni tumor i najčešći uzrok smrti kod muškaraca i žena u svijetu kada su u pitanju zloćudne bolesti. Pušenje predstavlja najveći rizik za njegov razvoj, ali nastanak tumora se može potaknuti i respiratornim bolestima te virusnim i bakterijskim infekcijama koje dovode do upalnih procesa koji mogu pogodovati razvoju tumora. Urođeni imunostani sustav važan je za prvi odgovor organizma na infekciju patogenima, a u njegovoj aktivaciji ključnu ulogu imaju Toll-like receptori (TLR) koji prepoznaju patogenu pridružene molekularne sljedove i potiču signalizaciju koja će dovesti do imunostnog odgovora. Endosomski receptor TLR7 aktiviraju jednonlančane virusne RNA, ali i sintetski ligandi. Ekspresiran je u stanicama imunostnog sustava, ali i epitelnim te tumorskim stanicama. Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti kako u *in vitro* uvjetima stanice metastatskog tumora pluća (H1299) odgovaraju na terapiju citostaticima (cisplatina, karboplatina i paklitaksel) i sintetskim ligandima za receptor TLR7 (resiquimod i imiquimod). Dokazana je ekspresija receptora TLR7 na razini mRNA i proteina u staničnoj liniji H1299 lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu i westernskom metodom detekcije proteina. Pokazali smo da imiquimod u kombinaciji s cisplatinom i paklitakselom značajno smanjuje vijabilnost stanica, dok je utjecaj resiquimoda na citotoksičnost vrlo slab.

(56 stranica, 11 slika, 3 tablice, 96 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: tumor pluća, TLR7, resiquimod, imiquimod, kemoterapeutici, citotoksičnost

Voditelj: Dr. sc. Jelena Knežević, viša znanstvena suradnica, Institut Ruđer Bošković

Suvoditelj: Dr. sc. Nada Oršolić, red. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Nada Oršolić, red. prof.

Dr. sc. Inga Marijanović, izv. prof.

Dr. sc. Martina Šeruga Musić, izv. prof.

Rad prihvaćen: 6. veljače 2020.

## BASIC DOCUMENT CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

### ***In vitro* testing of the chemotherapeutic activity in the presence of TLR7 receptor ligands in H1299 lineage**

Ana Vukić

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Lung cancer is the leading cause of cancer deaths and second most common diagnosed malignant tumor in both men and women. Smoking is the number one risk factor for lung cancer, but environmental and genetic factors and respiratory diseases increase the chance of developing it as well. Bacterial and viral infections can lead to frequent inflammations linked to tumor progression. Innate immune system can be activated immediately after pathogen invasion. Activation of Toll-like receptors (TLRs) that recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) causes the initial immune response. TLR7 is an endosomal receptor activated by viral ssRNAs and synthetic ligands. It is expressed in different types of immune cells, as well as epithelial and tumor cells. The aim of this research was to determine the effects of TLR7 ligand (resiquimod and imiquimod) and cytostatic (cisplatin, carboplatin, paclitaxel) combined therapy on H1299 human metastatic cell lineage. We have shown the presence of TLR7 mRNA and proteins expression in H1299 cells using RT-qPCR and Western blot. We have shown that imiquimod in combination with cisplatin and paclitaxel significantly reduces H1299 cell viability, while combined treatment with resiquimod had low cytotoxic effect.

(56 pages, 11 figures, 3 tables, 96 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: lung cancer, TLR7, resiquimod, imiquimod, chemotherapeutics, cytotoxicity

Supervisor: Dr. sc. Jelena Knežević, Senior Research Associate, Ruđer Bošković Institute

Co-supervisor: Dr. sc. Nada Oršolić, Prof.

Reviewers: Dr. sc. Nada Oršolić, Prof.

Dr. sc. Inga Marijanović, Assoc. Prof.

Dr. sc. Martina Šeruga Musić, Assoc. Prof.

Thesis accepted: February 6th, 2020

# Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Maligni tumor pluća.....	1
1.1.1. Pušenje kao rizični faktor.....	3
1.1.2. Ostali faktori .....	4
1.1.3. Genske promjene.....	5
1.1.4. Dijagnosticiranje i liječenje .....	6
1.2. Imunosni sustav .....	7
1.2.1. Toll-like receptori (TLR) .....	7
1.3. Receptor TLR7.....	9
1.3.1. Sinteza i prijenos u endosome.....	9
1.3.2. Signalni put receptora TLR7.....	11
1.3.3. Utjecaj receptora TLR7 na tumorigenezu .....	12
1.3.4. Sintetski ligandi receptora TLR7 .....	14
2. CILJ.....	16
3. Materijali i metode.....	17
3.1. Materijali.....	17
3.1.1. Rad sa staničnom kulturom.....	17
3.1.2. Određivanje IC50 vrijednosti i tretmani .....	17
3.1.3. Izolacija RNA .....	17
3.1.4. Komercijalni kit-ovi za tretman DNazom i reverznu transkripciju.....	18
3.1.5. Predamplifikacija i RT-qPCR .....	18
3.1.6. Westernska metoda detekcije proteina.....	18
3.1.7. Popis korištenih uređaja .....	19
3.2. Metode .....	20
3.2.1. Rad sa staničnom kulturom.....	20
3.2.2. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-qPCR).....	21
3.2.3. Izolacija ukupnih proteina iz staničnih lizata, elektroforeza u poliakrilamidnom gelu uz prisutnost SDS-a i westernska metoda detekcije proteina .....	23
3.2.4. MTT test.....	25
3.2.5. Statistička analiza.....	27
4. Rezultati .....	28
4.1. Ekspresija receptora TLR7 na razini mRNA .....	29

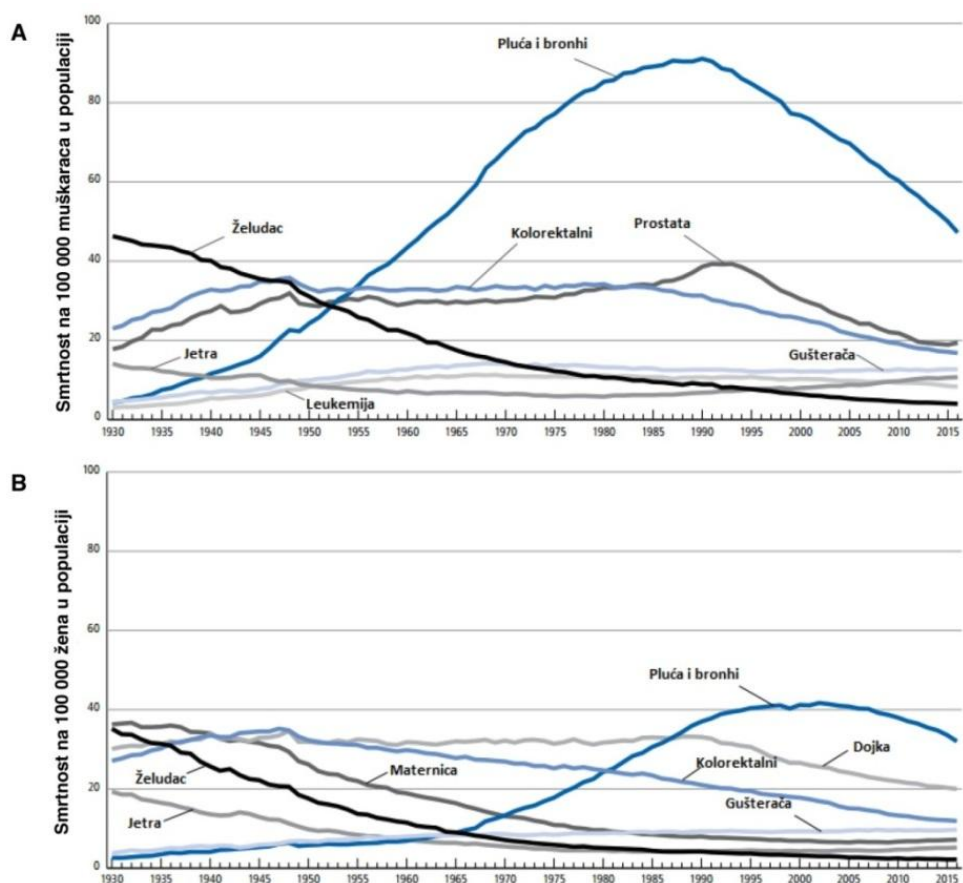
4.2.	Ekspresija receptora TLR7 na razini proteina.....	31
4.3.	Određivanje IC50 vrijednosti citostatika .....	32
4.4.	Utjecaj terapije ligandima za receptor TLR7 i citostaticima na stanice.....	35
5.	Rasprava.....	39
6.	Zaključak.....	43
7.	Literatura.....	44
8.	Životopis .....	55



# 1. UVOD

## 1.1. Maligni tumor pluća

Maligni tumor pluća je drugi najčešće dijagnosticirani tumor i najčešći uzrok smrti kod muškaraca i žena u svijetu kada su u pitanju zloćudne bolesti (Dela Cruz, Tanoue and Matthay, 2011). Prema predviđanjima Američke udruge za rak, u 2019. godini u Sjedinjenim Američkim Državama će se dijagnosticirati 228 150 novih slučajeva malignog tumora pluća, a od njega će umrijeti 142 670 pacijenata. Pojavnost se kod muškaraca smanjuje od osamdesetih godina prošlog stoljeća, a kod žena od dvije tisućitih jer prati trendove zabrane konzumacije duhana sa zaostatkom od dvadeset godina. Smrtnost kod muškaraca se od 1990. smanjila za 48 % te za 23 % kod žena od 2002. (Slika 1.). Petogodišnje preživljenje u SAD-u iznosi 19 % (American Cancer Society, 2019).



Slika 1. Smrtnost uzrokovana malignim tumorima pojedinih organa na 100 000 muškaraca (A) i žena (B) u populaciji SAD-a u periodu 1930.-2015. Preuzeto i prilagođeno (American Cancer Society, 2019)

U Republici Hrvatskoj se godišnje dijagnosticira oko 3 000 novih slučajeva malignog tumora pluća, a gotovo jednako toliko ljudi i umre. Kako petogodišnje preživljenje u Hrvatskoj iznosi samo 10 %, donesen je Nacionalni program za probir i rano otkrivanje raka pluća u razdoblju 2019.-2023. (<https://zdravstvo.gov.hr/izvjesce-o-provedenom-savjetovanju-o-nacrtu-nacionalnog-programa-za-probir-i-rano-otkrivanje-raka-pluca-2019-2023/3579>).

Dijeli se na dva tipa: maligni tumor pluća ne-malih stanica (engl. *non-small cell lung cancer*) i malih stanica (engl. *small cell lung cancer*). Na maligni tumor pluća ne-malih stanica otpada 80 – 85 % dijagnosticiranih zloćudnih bolesti pluća (Dela Cruz, Tanoue i Matthay, 2011), a dijeli se na pet podtipova: adenokarcinom, karcinom skvamoznih (pločastih) stanica, karcinom velikih stanica (nediferencirani karcinom pluća), adenoskvamozni i karcinoidni tumor (Barta i Wisnivesky, 2019). Adenokarcinom je danas najčešći maligni tumor pluća (Dela Cruz, Tanoue i Matthay, 2011). Učestaliji je kod žena, nego kod muškaraca i češće se, u odnosu na ostale tumore pluća, javlja u mlađoj populaciji te kod nepušača (Toh *i sur.*, 2006). Razvija se iz žljezdanih stanica koje proizvode mukus i nastaje u perifernom dijelu pluća (Zappa i Mousa, 2016). Česti histokemijski biljezi adenokarcinoma su nepsin A i tiroidni transkripcijski faktor 1 (TTF1) (Ye *i sur.*, 2011). Karcinom pločastih (skvamoznih) stanica je nekoć bio najučestaliji tip karcinoma pluća, a danas čini oko 20% dijagnosticiranih slučajeva u SAD-u. Uglavnom su lokalizirani u središnjem području, tj. u bronhima. Karakterizira ga keratinizacija (Barta i Wisnivesky, 2019). Češće se javlja kod pušača. Starija istraživanja pokazuju da ima veću učestalost kod muškaraca, a prema novijim istraživanjima kod žena, što je vjerojatno posljedica promjene trendova pušenja u prošlom stoljeću (Khuder, 2001). Karcinom pluća velikih stanica karakteriziraju slabo diferencirane stanice te se često naziva i nediferenciranim karcinomom pluća (Pelosi *i sur.*, 2015). Adenoskvamozni karcinomi imaju više od 10 % miješanih žljezdanih i pločastih komponenti (Travis *i sur.*, 2015) i lošiju petogodišnju prognozu od skvamoznih i adenokarcinoma (Maeda *i sur.*, 2012). Karcinom pluća malih stanica obuhvaća 15 % dijagnosticiranih slučajeva, a karakteriziraju ga sitne stanice s malo citoplazme i neizraženim jezgicama. Dijeli se na tri podtipa: karcinom zobnih stanica (engl. *oat cell*), intermedijarnih stanica i kombinirani tip kod kojeg se javljaju komponente karcinoma ne-malih stanica. Razvija se iz stanica koje imaju neuroendokrine karakteristike i jako brzo se širi i metastazira. Najčešći biljezi za ove podtipove tumora su TTF1, CD56, i kromogranin (Kalemkerian *i sur.*, 2013).

Simptomi se javljaju uslijed lokalnog djelovanja tumora i najčešće tek u uznapredovalom stadiju. Kašalj se javlja u do 75 % slučajeva kao posljedica pritiska tumora na bronhe. Uz

kašalj, kod 3 - 60 % pacijenta javlja se i dispneja, tj. otežano disanje, i hemoptiza, odnosno iskašljavanje krvi, u 6 - 35 % slučajeva. U ostale simptome mogu se ubrojiti stridor, bol u prsima, promuklost, gubitak tjelesne težine, umor, noćno znojenje i vrućica. Kao posljedica metastaziranja mogu se javiti simptomi slični moždanom udaru, paraneoplastični sindromi, bol u kostima, hepatomegalija i paraplegija (Hammerschmidt i Wirtz, 2009).

### **1.1.1. Pušenje kao rizični faktor**

Četrdesetih godina prošlog stoljeća u Sjedinjenim Američkim Državama se ozbiljno počinje razmatrati povezanost pušenja s razvojem tumora dišnog sustava, a 1964. u izvještaju „*Surgeon General on smoking and its effects on health*“ se ono navodi kao glavni uzrok nastanka malignih tumora pluća (Dela Cruz, Tanoue i Matthay, 2011). Prema procjenama, kod jednog od devet pušača dolazi do razvoja karcinoma pluća, a 20 % smrti uzrokovanih svim vrstama malignih tumora moglo bi se spriječiti prestankom pušenja (Dela Cruz, Tanoue i Matthay, 2011). Vjerojatnost razvoja tumora pluća kao posljedice pušenja ovisi o dobi početka pušenja, broju konzumiranih kutija cigareta dnevno, intezitetu inhalacije, količini katrana i nikotina u cigaretama, prisutnosti filtera i slično (Harris *i sur.*, 2004) (Dela Cruz, Tanoue and Matthay, 2011).

Duhanski dim dijelimo na glavni, onaj koji uvlačimo iz cigarete, i sporedni (iz druge ruke), onaj koji se otpušta u okoliš gorenjem cigarete, a sastoji se od plinova i čestica. Na pakiranjima cigareta se najčešće navode vrijednosti nikotina koji je odgovoran za stvaranje ovisnosti i jako kancerogene tvari katrana, ali u dimu se nalaze još mnogi toksični i kancerogeni spojevi i elementi poput policikličnih aromatskih ugljikovodika, aromatskih amina, N-nitrozamina, benzena, arsena, radona, bizmuta, polonija i drugih (Dela Cruz, Tanoue i Matthay, 2011). Najveću opasnost predstavljaju N-nitrozamini specifični za duhan (engl. *tobacco-specific N-nitrosamines*) koji nastaju uslijed nitrozacije nikotina prilikom proizvodnje duhana i pušenja i mogu se vezati za DNA te stvarati DNA adukte (Akopyan i Bonavida, 2006) (Dela Cruz, Tanoue and Matthay, 2011). Takve greške u DNA se najčešće popravljaju mehanizmom izrezivanja nukleotida pri čemu se uz pomoć endonukleaza izreže mjesto oštećenja i nekoliko okolnih nukleotida, a polimeraza  $\delta/\epsilon$  popunjava prazninu koristeći drugi lanac kao kalup. Ukoliko stanični mehanizmi popravka ne isprave oštećenje, stanica odlazi u apoptozu ili ponekad zadržava mutaciju i prenosi ju dalje. Ovakve promjene u onkogenima, tumor supresorima ili genima za mehanizme popravka DNA dovode do tumorogeneze (Pecorino, 2012). Kemijska karcinogeneza često dovodi do mutacije onkogen

*K-ras* koja je prisutna u 30 % adenokarcinoma kod trenutnih i bivših pušača (Rodenhuis i Slebos, 1992). Policiklični ugljikovodici poput benzopirena i benzantracena također mogu stvarati adukte s purinskim bazama DNA i dovesti do G→T transverzija. Oni se najprije moraju metabolički aktivirati pomoću citokrom P450 enzima CYP1A1 (Pecorino, 2012), a njihovi metaboliti mogu potaknuti mutacije na lokusu za tumor supresorski gen *p53* koje su prisutne u 60 % slučajeva malignih tumora pluća (Denissenko *i sur.*, 1996).

Nepušači su također izloženi utjecajima sporednog dima, a samim time i karcinogenima. Jedno istraživanje je pokazalo da se u 88 % nepušača u serumu može detektirati metabolit nikotina kotinin uslijed posljedica pasivnog pušenja (Pirkle *i sur.*, 1996). Također, u urinu nepušača dokazana je prisutnost karcinogena i kotinina (Hecht *i sur.*, 1993). Barem 17 % malignih tumora pluća kod nepušača uzrokovano je pasivnim pušenjem u djetinjstvu i tijekom odrastanja (Janerich *i sur.*, 1990).

### **1.1.2. Ostali faktori**

Istraživanja su pokazala da su žene osjetljivije na karcinogene iz duhanskog dima od muškaraca. Primijećeno je da žene s karcinomom pluća imaju više DNA adukata od muškaraca (Ryberg *i sur.*, 1994). Također, čini se i da su hormoni važni za sklonost nastanka tumora jer su istraživanja pokazala da su žene koje su ranije ulazile u menopauzu imale manji rizik za razvoj adenokarcinoma (Taioli i Wynder, 1994), dok se terapijom estrogenom i progesteronom povećavao rizik nastanka karcinoma pluća (Slatore *i sur.*, 2010).

Pripadnici određenih profesija imaju veći rizik za razvoj tumora pluća. To su ljudi koji su na radnom mjestu izloženi: azbestu, arsenu, beriliju, kadmiju, kromu, niklu, siliciju i dizelskim ispušnim plinovima (Driscoll *i sur.*, 2005). Istraživanja su pokazala da izlaganje dizelskim ispušnim plinovima povećava relativni rizik za razvoj tumora pluća za 30 - 50% (Lipsett i Campleman, 1999) (Bhatia, Lopipero i Smith, 1998).

Određene nemaligne bolesti poput kronične opstruktivne bolesti pluća kod koje dolazi do suženja dišnih putova također povećavaju rizik za razvoj malignih tumora pluća. Kroničnu opstruktivnu bolest pluća karakterizira i kronična upala koja pogoduje razvoju tumora (Skillrud, Offord i Miller, 1986). Postoje i istraživanja koja povezuju infekciju bakterijom *Chlamydia pneumoniae* s nastankom tumora pluća. Iako *Chlamydia* nije onkogeni patogen, pretpostavlja se da infekcijom uzrokovana upala dovodi do stvaranja reaktivnih oblika kisika koji mogu potaknuti nastanak mutacija (Littman, Jackson i Vaughan, 2005).

### 1.1.3. Genske promjene

Kromosomske promjene detektirane kod tumora pluća uključuju gubitak alela, izokromosome, gubitak heterozigotnosti i nebalansirane translokacije. Najčešća kromosomska promjena kod pacijenata s tumorima ne-malih stanica je aneusomija (Kanwal, Ding and Cao, 2017). Zabilježene su i polisomije dijelova kromosoma 5, 6, 7 i 8 (Kettunen *i sur.*, 2006) (Kang *i sur.*, 2007), delecije na dijelovima kromosoma 3 i amplifikacije na kromosomima 1 i 3q (Lu *i sur.*, 1999).

Česte su i mutacije u onkogenima K-RAS (engl. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene*), EGFR (engl. *epidermal growth factor receptor*), B-RAF (engl. *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*), HER2 (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*), EML4 (engl. *echinoderm microtubule-associated protein-like 4*), ALK (engl. *anaplastic lymphoma kinase*), ROS1 (engl. *c-ros oncogene 1*) i RET (engl. *rearranged during transfection*). Gen *K-RAS* kodira za G protein uključen u regulaciju stanične proliferacije, preživljenja i diferencijacije (Kanwal, Ding i Cao, 2017) čije su promjene zabilježene u oko 25 % adenokarcinoma u zapadnjačkim populacijama (Riely *i sur.*, 2008). Tirozin kinazni receptor EGFR uključen je u stanični rast (Kanwal, Ding i Cao, 2017). Povećana ekspresija gena *EGFR* zabilježena je u 43 – 89 % slučajeva tumora pluća ne-malih stanica (Kanwal, Ding i Cao, 2017) najčešće kod žena nepušača u Istočnoj Aziji (Sun, Schiller i Gazdar, 2007). Mutacije u genu *B-RAF* koji kodira za serin treoninsku kinazu se pojavljuju u 6 – 8 % tumora pluća ne-malih stanica i to najčešće kod žena s dijagnosticiranim adenokarcinomom (Kanwal, Ding i Cao, 2017). Promjene u genu *HER2* su zabilježene u 2 - 4% slučajeva tumora ne-malih stanica tumora pluća, najčešće kod žena nepušača u Aziji. Fuzijski protein EML4-ALK je detektiran u 3 – 7 % tumora ne-malih stanica, posebice kod mlađih pacijenata s dijagnozom adenokarcinoma neovisno o njihovoj nacionalnosti ili izloženosti duhanskom dimu (Kanwal, Ding i Cao, 2017). Fuzije *ROS1* zabilježene su kod nepušača s adenokarcinomom (Cai *i sur.*, 2013). Tirozinska kinaza RET uključena je u procese proliferacije i diferencijacije stanica. Fuzije gena *RET* ne dolaze u kombinaciji s mutacijama u drugim onkogenima kao što su *EGFR*, *K-RAS* i *ALK* (Wang *i sur.*, 2012) (Kanwal, Ding i Cao, 2017).

Kao i kod većine drugih tumora, u velikom broju slučajeva tumora ne-malih stanica pluća zabilježene su mutacije tumor supresorskog gena *TP53*, pogotovo kod pušača. Protein p53 sudjeluje u regulaciji stanične diobe, rasta i apoptoze (Bodner *i sur.*, 1992).

Pretpostavlja se da se 8 % tumora pluća javlja uslijed genetskih predispozicija, ali utjecaj genetskih faktora na nastanak i razvoj tumora nije još uvijek razjašnjen jer ga je teško u potpunosti odvojiti od utjecaja okolišnih faktora (Kanwal, Ding i Cao, 2017) (Jonsson i Gulcher, 2004).

#### **1.1.4. Dijagnosticiranje i liječenje**

Prilikom dijagnosticiranja tumora pluća najčešće se najprije rade snimanja CT (engl. *computerized tomography*) i PET (engl. *positron emission tomography*). Snimke CT pružaju informaciju o anatomiji tumora te su korisne pri određivanju najboljeg mjesta za biopsiju, a snimke PET daju informacije o metaboličkoj aktivnosti primarnog tumora, zahvaćenosti medijastinalnih čvorova i metastazama (Anand, Singh i Dash, 2009) (Hammerschmidt i Wirtz, 2009). Zatim je potrebno napraviti biopsiju tkiva kako bi se potvrdila malignost, odredio stadij i histološka diferencijacija tumora pri čemu se mogu koristiti različite metode, a neke od njih su bronhoskopija, medijastinoskopija, endobronhalni ultrazvuk i sl. (McLean, Barnes i Troy, 2018). Tumori ne-malih stanica se najčešće klasificiraju prema sustavu TNM gdje T označava veličinu tumora, N zahvaćenost limfnih čvorova, a M prisustvo metastaza (Feng i Yang, 2019). Tumori malih stanica se prilikom klasifikacije uglavnom grupiraju u dvije skupine: limitirane (engl. *limited-stage – LS-SCLC*) i ekstenzivne (engl. *extensive stage – ES-SCLC*) (Micke *i sur.*, 2002).

Liječenje ovisi o stadiju karcinoma. Najčešće uključuje kombinaciju operacije i adjuvantne kemoterapije. U liječenju se često koriste kemoterapeutici na bazi platine (Hammerschmidt i Wirtz, 2009). Pacijentima s prisutnim mutacijama receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR) se pri liječenju mogu davati inhibitori receptora kao što su erlotinib, gefitinib i afatinib (Krawczyk *i sur.*, 2017). Crizotinib, certinib i alectinib su inhibitori koji se daju pacijentima s utvrđenim mutacijama gena *ALK* (engl. *anaplastic lymphoma kinase*) (Fan *i sur.*, 2018). Pri liječenju se mogu koristiti i različiti tipovi imunoterapije. Jedan od načina na koji tumori izbjegavaju imunosni odgovor organizma jeste reakcija receptora programirane smrti 1 (engl. *programmed-death receptor 1 – PD-1*) s proteinima PD-L1 i PD-L2 koja će dovesti do inaktivacije T-limfocita. Ove reakcije se mogu spriječiti tretmanom antitijelima Nivolumab i Pembrolizumab koji se vežu na PD-1 ili antitijelom Atezolizumab koje se veže na PD-L1 (Yu *i sur.*, 2016).

## 1.2. Imunosni sustav

Organizmi su svakodnevno izloženi različitim bakterijama, virusima, gljivicama i parazitima od kojih mnogi mogu narušiti fiziološku homeostazu domaćina. Imunosni sustav služi za obranu organizma od patogena. Razlikujemo stečenu imunost koja se javlja tek nakon što je organizam već došao u kontakt s patogenom i urođenu imunost uključenu u prvi nespecifični odgovor na infekciju. Stečena imunost zaslužna je za stvaranje imunosne memorije (Hall i Guyton, 2006).

Stanice urođenog imunosnog sustava sposobne su razlikovati patogene od vlastitih stanica uz pomoć receptora urođene imunosti. Kako patogeni često mutiraju, motivi koje prepoznaju receptori moraju biti visokokonzervirani (Aderem i Ulevitch, 2000). Ti motivi se nazivaju patogenima pridruženi molekularni sljedovi (engl. *pathogen associated molecular patterns - PAMPs*), a receptori koji ih prepoznaju receptori za prepoznavanje sljedova (engl. *pattern recognition receptors - PRRs*). Receptori često prepoznaju komponente koje nisu prisutne u stanicama viših eukariota poput nemetiliranih CpG motiva u DNA, jednolančanih RNA ili lipopolisaharida karakterističnih za bakterije te je to jedan od načina na temelju kojih se razlikuju komponente patogena od vlastitih (Medzhitov i Janeway, 1997).

Kod sisavaca pronalazimo različite PRR receptore: Toll-like receptore (TLRs), RIG-I-like receptore (RLRs), Nod-like receptore (NLRs), AIM-2-like receptore (ALRs), C-type lectin receptore (CLRs) i unutarstanične DNA senzore – cGAS (Kawasaki i Kawai, 2014).

Aktivacija receptora PRR dovodi do otpuštanja signala upalnog odgovora poput IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, interferona tipa 1 (INFs), kemokina, efektorskih interleukina i kostimulatora T-stanica (Medzhitov i Janeway, 1997).

### 1.2.1. Toll-like receptori (TLR)

Receptori TLR se većinski eksprimiraju na stanicama imunosnog sustava gdje su uključeni u prepoznavanje liganada specifičnih za viruse, bakterije, gljive i protozoe. Mogu biti površinski (TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6 i TLR10) i unutarstanični, smješteni na stijenkama endoplazmatskog retikuluma (TLR7, TLR8 i TLR9) (Kobold *i sur.*, 2014). Dije se na temelju tipova liganada koje prepoznaju pa tako razlikujemo one koji prepoznaju lipide, one koji prepoznaju bakterijske ili virusne nukleinske kiseline i one koji prepoznaju proteine pojedinih patogena. Receptor TLR2 u kombinaciji s receptorima TLR1 ili TLR6 zaslužan je

za prepoznavanje bakterijskih ili mikobakterijskih lipopeptida, glicerofosfatidilinozitolnih sidara različitih patogena, a receptor TLR4 prepoznaje bakterijske lipopolisaharide. Dvolančane virusne i bakterijske RNA prepoznaje receptor TLR3, CpG motive u DNA receptor TLR9. Receptor TLR5 prepoznaje flagelin (O'Neill, 2006).

Ekspresija receptora TLR zabilježena je i u stanicama različitih tumora. U tumorskim stanicama pluća, debelog crijeva, prostate i melanoma miša ekspimiraju se receptori TLR1-TLR6 (Huang *i sur.*, 2005). Ljudske stanice karcinoma dojke ekspimiraju receptor TLR3 (Salaun *i sur.*, 2006), a karcinoma pluća receptor TLR9 (Droemann *i sur.*, 2005) i receptor TLR4 (He *i sur.*, 2007). Receptori TLR7 i TLR8 su također ekspimirani u stanicama karcinoma pluća, konkretno adenokarcinoma i karcinoma skvamoznih stanica pri čemu je ekspresija receptora TLR7 pretežito perinuklearna, a receptora TLR8 difuzna u citoplazmi (Cherfils-Vicini *i sur.*, 2010). Ova dva receptora su i jako ekspimirana u epitelnim stanicama bronha, dok u alveolarnim epitelnim stanicama ekspresija nije zabilježena (Cherfils-Vicini *i sur.*, 2010). Kada su u pitanju stanice imunskog sustava, receptor TLR7 je ekspimiran u plazmocitoidnim dendritičkim stanicama, mijeloidnim dendritičkim stanicama te B-limfocitima (Kobold *i sur.*, 2014). T-limfociti (Applequist, 2002) i prirodne stanice ubojice (Kobold *i sur.*, 2014) ne ekspimiraju receptor TLR7. Osim stanica imunskog sustava, receptor TLR7 je ekspimiran i u epitelnim stanicama (Tengroth *i sur.*, 2014), hepatocitima (Lee *i sur.*, 2006) i keratinocitima (Li *i sur.*, 2013). Njegovu ekspresiju stimuliraju citokini poput interferona  $\gamma$  (IFN) (Gantier *i sur.*, 2008). Povećana ekspresija receptora TLR7 zabilježena je i u slučajevima infekcije virusima poput virusa hepatitisa C (HCV) (Lee *i sur.*, 2006), virusa ljudske imunodeficijencije (HIV) (Lester *i sur.*, 2008) i virusa gripe tipa A (IAV) (Petes, Odoardi i Gee, 2017). Receptor TLR8 ekspimiran je u monocitima, mijeloidnim dendritičkim stanicama i neutrofilima, ali ne i u plazmocitoidnim dendritičkim stanicama (Kobold *i sur.*, 2014). Zdrave stanice prostate ekspimiraju receptor TLR7 (Han, Park, *i sur.*, 2013), ali je u većini nemalignih tkiva njegova ekspresija mala ili nepostojeća (Kobold *i sur.*, 2014). Također, receptore TLR1-TLR10 ekspimiraju i ljudske stanične linije karcinoma pluća A549, H1355 i SCC (SK-MES), kao i linija epitelnih stanica bronha BEAS-2B (Cherfils-Vicini *i sur.*, 2010).

Receptori TLR mogu utjecati na karcinogenezu stvaranjem proupalnog okoliša. Stimulacija receptora TLR aktivirat će transkripcijski faktor NF- $\kappa$ B koji će potaknuti transkripciju gena proupalnih citokina poput IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i IL-6. Također, preko istog transkripcijskog faktora receptori mogu potaknuti transkripciju gena antiapoptotskih molekula. Uočeno je i da



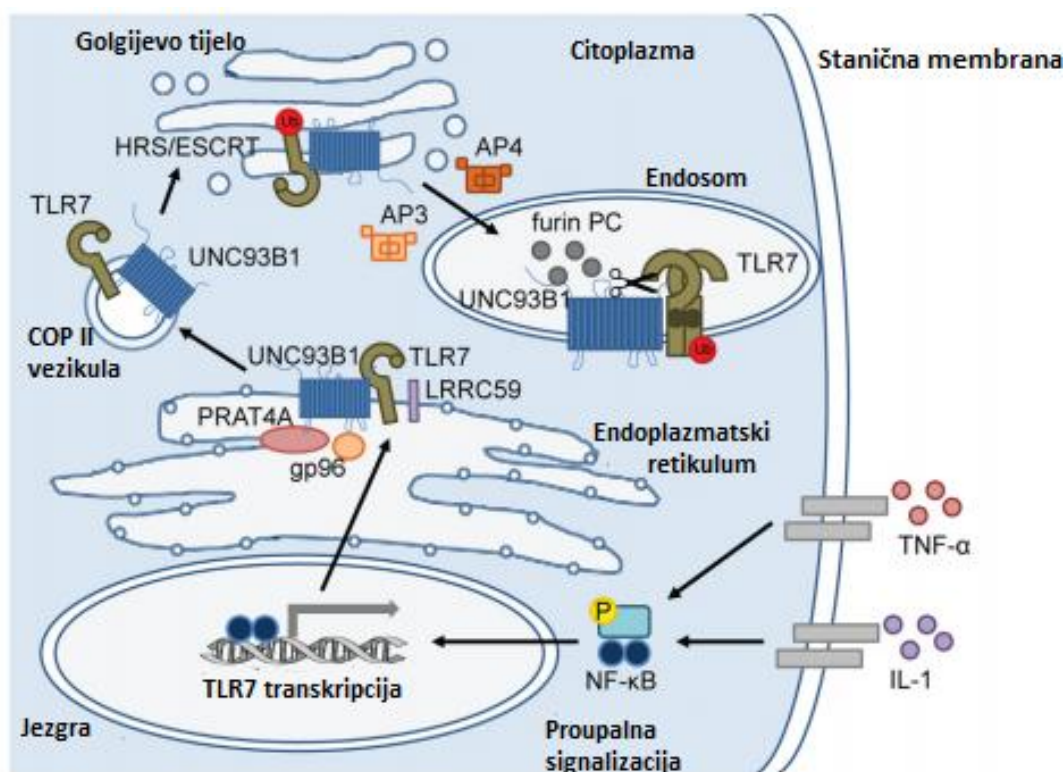
uklanjanje proteina uključenih u signalni put ovih receptora sprječava epitelnu regeneraciju i aktivaciju miofibroblasta. Ipak, aktivacija receptora TLR može imati i antitumorski učinak. Aktivacija receptora TLR5 potiče antitumorsko djelovanje dendritičkih stanica. Za takvo djelovanje dendritičkih stanica potreban je interferon tipa I čija je proizvodnja ovisna o signalnom putu receptora TLR. Pokazano je da agonisti receptora TLR9 potiču sekreciju interferona tipa I koji dovode do aktivacije citotoksičnih dendritičkih stanica, stanica NK i citotoksičnih T-limfocita koji sudjeluju u antitumorskom odgovoru. Na žalost, u trećoj fazi kliničkih ispitivanja ligand CGP 7909 za receptor TLR9 pokazao se neuspješnim u liječenju tumora pluća ne-malih stanica. Dodatak poly I:C, liganda za receptor TLR3, pokazao je tumor supresorski učinak u mišjim modelima i provjerava se njegova uspješnost i sigurnost u kliničkim ispitivanjima kod ljudi. Ligand za receptor TLR7 imiquimod odobren je za liječenje aktiničke keratoze (Pradere, Dapito i Schwabe, 2014).

### **1.3. Receptor TLR7**

#### **1.3.1. Sinteza i prijenos u endosome**

Receptor TLR7 nastaje u endoplazmatskom retikulumu kao nefunkcionalan. Prije izlaska iz endoplazmatskog retikuluma najprije mora zauzeti ispravnu konfiguraciju u čemu sudjeluju dva šaperonska proteina – *heat shock* protein g96 (Yang *i sur.*, 2007) i protein povezan s receptorom TLR4 PRAT4A (engl. *protein associated with TLR4*) (Takahashi *i sur.*, 2007). U slučaju da ovi proteini nisu funkcionalni, makrofagi postaju neosjetljivi na stimulaciju ligandom. Šaperonski protein LRRC59 (engl. *leucine-rich repeat containing protein 59*) važan je za pravilno smatanje receptora TLR3, TLR8 i TLR9, ali još uvijek se ne zna je li potreban za pravilno smatanje receptora TLR7 (Tatematsu *i sur.*, 2015). Za prijenos receptora TLR7 u Golgijevo tijelo i endosome važan je protein UNC93B1 (engl. *uncoordinated 93 homolog B1*). Mutacije u ovom genu utječu na lokalizaciju receptora kod miševa, a samim tim i na signalizaciju i odgovor organizma na infekcije. Primjerice mutacija H412R povećat će osjetljivost organizma na infekcije virusima, dok će mutacija D34A dovesti do povećanog stvaranja citokina u makrofagima, plazmocitoidnim dendritičkim stanicama i B-limfocitima nakon stimulacije receptora TLR7 (Petes, Odoardi i Gee, 2017). Protein UNC93B1 omogućava pakiranje receptora TLR7 u vezikule COPII (engl. *coat protein complex II*) i vjerojatno sudjeluje u ubikvitinaciji receptora, a specifičan je i po tome što, za razliku od ostalih šaperonskih proteina, zajedno s TLR7 napušta endoplazmatski retikulum u procesu njegovog prijenosa u endosome (Kim *i sur.*, 2008). Vezikulama se receptor TLR7 prenosi u

Golgijevo tijelo gdje se uz pomoć kompleksa HRS/ESCRT (engl. *endosomal sorting complex required for transport*) ubikvitinirani receptor TLR7 sortira za prijenos u endosome (Petes, Odoardi i Gee, 2017). Za prijenos u endosome važna je i porodica adaptorskih proteina (AP 1-4) koji stupaju u kompleksne međureakcije kako s receptorom TLR7, tako i s proteinom UNC93B1. Da bi receptor TLR7 bio u stanju prepoznati i vezivati nukleinske kiseline, mora se najprije pocijepati. Očuvanje nefunkcionalnosti receptora, do njegovog smještanja u endosome, je važno kako bi se spriječila njegova prijevremena aktivacija uslijed vezivanja nukleinskih kiselina samog domaćina. Istraživanja na miševima su pokazala da se cijepanje receptora odvija uz pomoć dvije skupine proteina: asparaginskih endopeptidaza i katepsina (Ewald *i sur.*, 2011) (Petes, Odoardi i Gee, 2017). Za njihovu enzimatsku aktivnost važne su niže vrijednosti pH u endosomima. Proteoliza se odvija između dviju domena bogatih leucinom na poziciji 478 gdje se nalazi asparagin. Mutacija asparagina u glutamin na toj poziciji (N478Q) neće utjecati na lokalizaciju receptora, ali će spriječiti njegovu aktivaciju imiquimodom i prijenos signala (Maschalidi *i sur.*, 2012). Iako cijepanjem dolazi do razdvajanja N-terminusa od C-terminusa, pretpostavlja se da N-terminus ostaje vezan za C-terminus disulfidnim vezama i da je važan za uspješno vezanje liganda za receptor (Kanno *i sur.*, 2013) (Hipp *i sur.*, 2015) (Slika 2.).



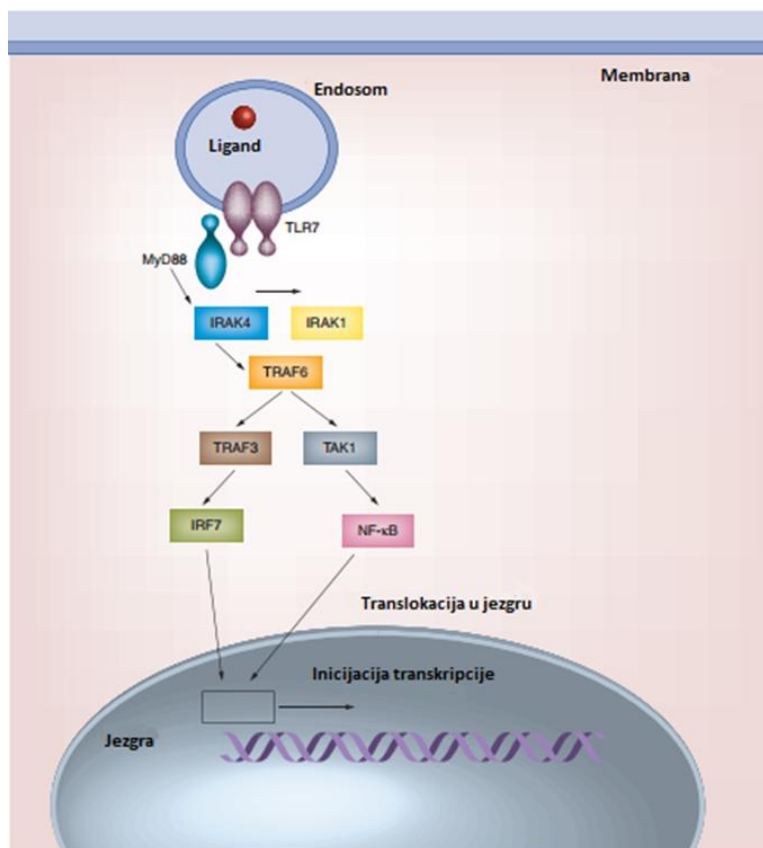
Slika 2. Prijenos receptora TLR7 u endosome. Transkripcija receptora TLR7 potaknuta je citokinskom signalizacijom preko transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B. Receptor TLR7 se sintetizira u endoplazmatskom retikulumu i slaže uz pomoć proteina gp96 i PRAT4A (engl. *protein associated with TLR4*). Stanična stimulacija (npr. imiquimodom) ili infekcija aktivira protein LRRC59 (engl. *leucine-rich repeat containig protein 59*) koji potiče pakiranje receptora TLR7 u vezikule COPII (engl. *coat protein complex II*) pomoću proteina UNC93B1 (engl. *uncoordinated 93 homolog B1*) i prijenos u Golgijevo tijelo gdje će se ubikvitinirati. Kompleks HRS/ESCRT razvrstava ubikvitinirane receptore koji se pomoću proteina AP3 i AP4 (engl. *adapter protein*) prenose u endosome. U endosomu receptor postaje funkcionalan nakon cijepanja furinskim konvertazama (engl. *furin proprotein convertases - PC*). Preuzeto i prilagođeno (Petes, Odoardi i Gee, 2017).

### 1.3.2. Signalni put receptora TLR7

Strukturno, receptor TLR7 ima domenu bogatu leucinom na koju se veže ligand, transmembransku domenu i domenu homolognu receptoru Toll-IL-1 koja sudjeluje u prijenosu signala stupajući u međureakciju s proteinom MyD88. Virusne RNA ili sintetski ligandi dolaze u kontakt s receptorom procesima endocitoze i autofagije (Petes, Odoardi i

Gee, 2017). Način unosa liganda ovisi o replikacijskim strategijama virusa te prisutnosti virusnih inhibitora, ali i samim receptorima (Shi i Kehrl, 2008) (Petes, Odoardi i Gee, 2017).

Prijenos signala preko receptora TLR7 je ovisan o proteinu MyD88 (Kawasaki and Kawai, 2014). Vežanjem liganda na funkcionalni dimer receptora dolazi do konformacijskih promjena unutarstanične domene receptora što omogućava vežanje adaptorne molekule MyD88. Protein MyD88 preko domene smrti aktivira protein IRAK4 koji zatim fosforilira protein IRAK1. Kompleks IRAK4-IRAK1 će aktivirati protein TRAF6 koji će pak dovesti do aktivacije signalnog puta NF- $\kappa$ B/MAPK preko proteina TAK1 ili će preko proteina TRAP3 dovesti do aktivacije transkripcijskog faktora IRF7 (Slika 3.) (Kobold *i sur.*, 2014).



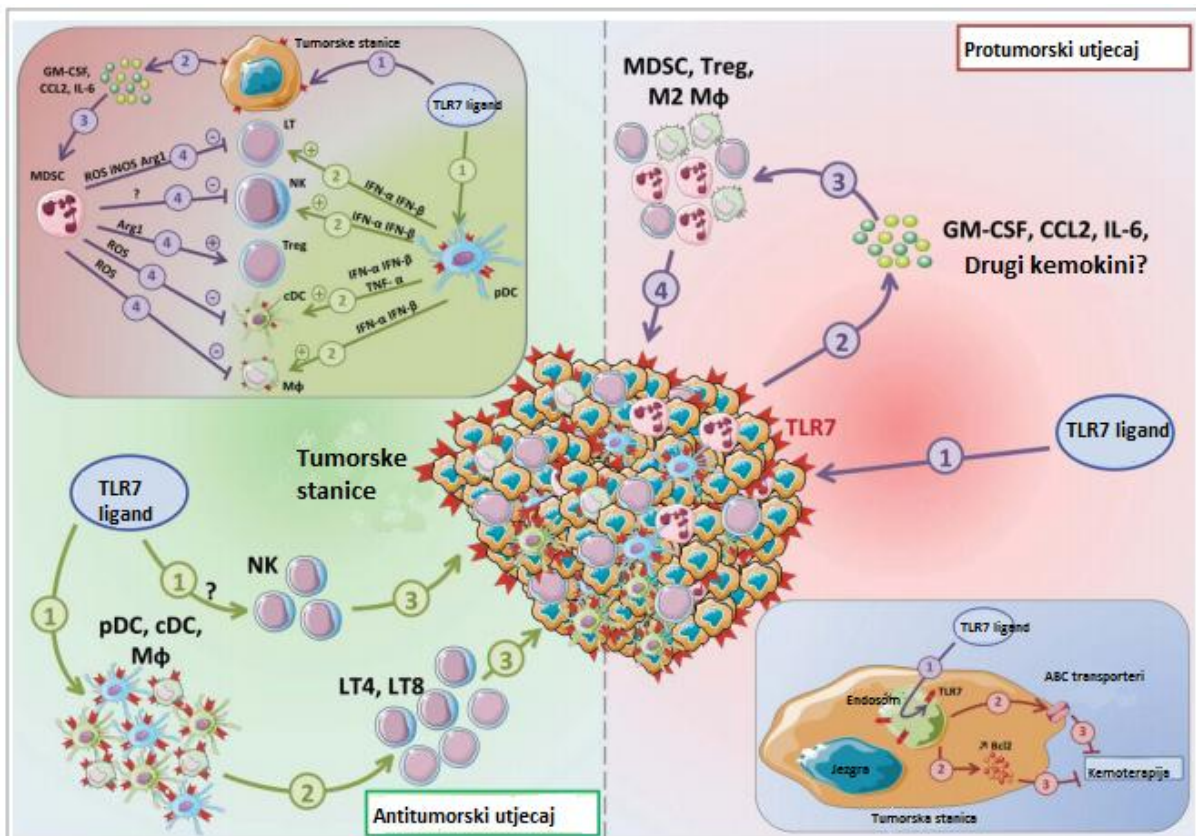
Slika 3. Signalni put receptora TLR7. Preuzeto i prilagođeno (Kobold *i sur.*, 2014)

### 1.3.3. Utjecaj receptora TLR7 na tumorigenezu

Pokazano je da dodatak liganada za receptor TLR7 poput loksoribina, CL264, ssRNA40, R848 i SM-276001 može smanjiti progresiju karcinoma dojke, debelog crijeva i bubrega povećanjem broja stanica NK, NKT, T-limfocita, efektorskih stanica koje proizvode antigen

specifičan interferon  $\gamma$  i aktivacijom te maturacijom plazmocitoidnih dendritičkih stanica koje potiču antitumorski odgovor (Dajon, Iribarren i Cremer, 2015).

Ipak, neka istraživanja pokazuju da aktivacija receptora TLR7 može pogodovati progresiji tumora. Dodatak liganada C2264, loksoribina i imiquimoda doveo je do povećanja kemirezistencije na citostatike stanica tumora pluća u *in vitro* uvjetima (Cherfils-Vicini *i sur.*, 2010), kao i povećanja volumena tumora pluća *in vivo* u mišjim modelima (Chatterjee *i sur.*, 2014). Taj protumorski utjecaj može biti posljedica ili direktno stimulacije receptora TLR7 na temelju rezultata *in vitro* istraživanja ili povećanog broja i diferencijacije imunosupresivnih stanica u tumorskom okolišu. Kod miševa s tumorima pluća ne-malih stanica tretiranim ligandima za receptor TLR7 uočen je veći broj supresorskih stanica mijeloidnog podrijetla (engl. *myeloid-derived suppressor cells - MDSCs*) i smanjenja broja stanica CD8<sup>+</sup> T (Chatterjee *i sur.*, 2014). Nakon stimulacije receptora TLR7 eksprimiranih na stanicama tumora gušterače došlo je do ubrzanog rasta tumora i smanjene ekspresije antitumorskih molekula kao što su PTEN, p16, p27, p53, c-Myc i ciklina B1 (Ochi *i sur.*, 2012). Stimulacija receptora TLR7 na stanicama hepatocelularnog karcinoma povećava proliferaciju malignih stanica. Pretpostavlja se da receptor TLR7 povećava ekspresiju antiapoptotskih molekula, smanjuje ekspresiju faktora koji potiču apoptozu i sudjeluje u regulaciji transportera ABC važnih za prijenos i djelovanje lijekova (Dajon, Iribarren i Cremer, 2015) (Slika 4.).



Slika 4. Dihotomni učinak stimulacije receptora TLR7 na tumorske stanice. 1 – stimulacija urođenog imunskog sustava, 2 – aktivacija antitumorskog imunskog sustava, 3 – uništavanje tumorskih stanica, 1 – stimulacija tumorskih stanica, 2 – proizvodnja immunosupresivnih i protumorskih molekula, 3 – privlačenje immunosupresivnih stanica, 4 – indukcija immunosupresivnog mikrookoliša, 2 – proizvodnja spojeva koji štite od kemoterapije 3 – rezistencija na lijekove. Preuzeto i prilagođeno (Dajon, Iribarren i Cremer, 2015)

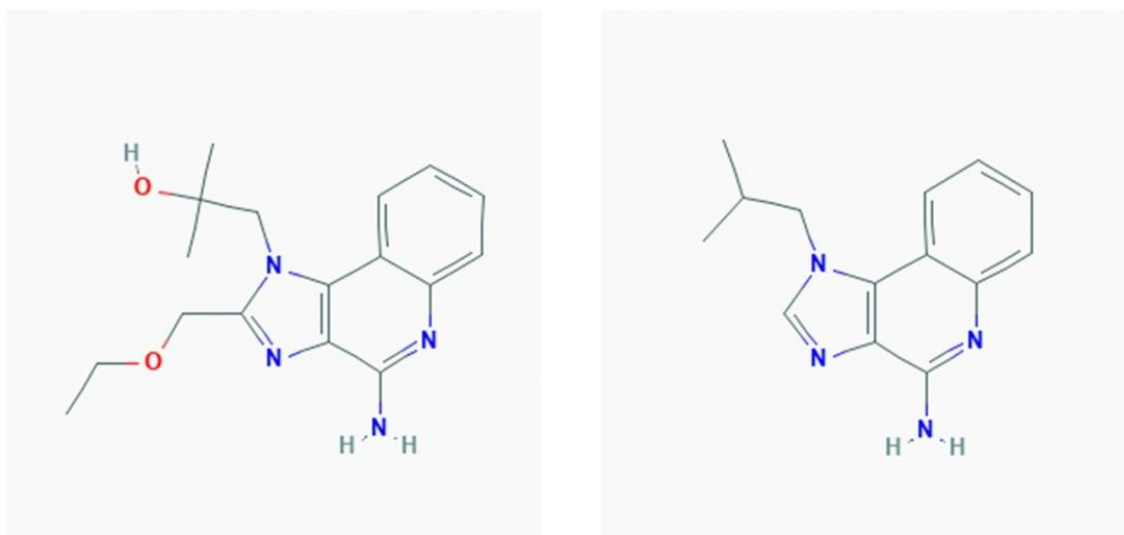
### 1.3.4. Sintetski ligandi receptora TLR7

Postoji puno sintetskih liganada koji aktiviraju receptor TLR7, a neki uz receptor TLR7 aktiviraju i receptor TLR8. U specifične spadaju imidazokvinolni spojevi imiquimod (R837) i gardiquimod, analog gvanizina loksoribin, analog adenina CL264 i analog baza CL307. Imidazokvinolni spojevi resiquimod (R848) i CL097 i polidT uz receptor TLR7 mogu aktivirati i receptor TLR8 (<https://www.invivogen.com/tlr7-8-base-analog>).

Resiquimod (R848) je sintetski ligand male molekularne mase koji potiče immunosni odgovor organizma aktivacijom receptora TLR7 i TLR8. Koristio se pri liječenju kožnih lezija

(Szeimies *i sur.*, 2008) uzrokovanih genitalnim *herpes simplex* virusom (Wu, Huang i Tying, 2004), ali i kao adjuvans za povećanje učinkovitosti cjepiva (Tomai *i sur.*, 2007).

Imiquimod je sintetski ligand receptora TLR7 koji spada u skupinu imidazokvinolina čija je uporaba odobrena u liječenju genitalnih bradavica (Moore *i sur.*, 2001), aktiničke keratoze (Rosso, 2008), ali i metastatskih melanoma (Wolf *i sur.*, 2003). Krema Aldera s 5% imiquimoda koristi se za liječenje karcinoma bazalnih stanica, skvamoznih stanica i aktiničke keratoze (Drobits *i sur.*, 2012). Može inducirati apoptozu tumorskih stanica aktivacijom kaspaza preko proteina Bcl-2 (Schön i Schön, 2007), ali i narušavanjem strukture mikrotubula u *in vitro* uvjetima što dovodi do blokiranja staničnog ciklusa u G2/M fazi (Courbet *i sur.*, 2017). Strukturne formule liganada prikazane su na Slici 5.



Slika 5. Strukturna formula resiquimoda (lijevo) i imiquimoda (desno). Preuzeto s <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Resiquimod#section=Structures> i <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Imiquimod>

## 2. CILJ

Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazali su da je ekspresija gena *TLR7* povezana s preživljenjem i odgovorom na kemoterapiju kod osoba s karcinomom pluća. Istraživanje na Institutu Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Jelene Knežević, pokazalo je da polimorfni biljeg, smješten u promotorskoj regiji gena *TLR7*, predstavlja čimbenik rizika za razvoj tumora pluća i da je povezan sa značajno smanjenom ekspresijom gena *TLR7* (neobjavljeni rezultati). Pretpostavka ovih istraživanja je da bi promjena ekspresije gena *TLR7* mogla biti povezana s odgovorom na kemoterapiju u kontekstu združenog djelovanja kemoterapeutika i sintetskih liganada. Hipoteza ovog istraživanja (diplomskog rada) je da stanice metastatskog tumora pluća (H1299) eksprimiraju funkcionalni protein TLR7 i da bi njegova kostimulacija s poznatim kemoterapeuticima, u uvjetima bazalne ekspresije, mijenjala preživljenje testiranih stanica. Cilj ovog diplomskog rada je:

- 1) Ispitati razinu ekspresije gena i proteina TLR7 metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu i westernskom metodom detekcije proteina
- 2) Istražiti MTT testom kako u *in vitro* uvjetima stanice H1299 odgovaraju na združenu terapiju citostaticima (cisplatina, karboplatina i paklitaksel) i sintetskim ligandima za TLR7 (resiquimod i imiquimod), u uvjetima bazalne ekspresije gena *TLR7*



### **3. Materijali i metode**

#### **3.1. Materijali**

##### **3.1.1. Rad sa staničnom kulturom**

H1299 stanična je linija metastatskog tumora pluća ne-malih stanica dobivena iz uzorka biopsije limfnog čvora 43-godišnjeg muškarca. Stanice imaju homozigotnu parcijalnu deleciju gena za *p53* te zbog toga lako proliferiraju (Lin i Chang, 1996). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich, SAD) s L-glutaminom, natrijevim hidrogenkarbonatom i 4500 mg/L koncentracijom glukoze korišten je za uzgoj stanica H1299. Fetalni goveđi serum (FBS) dodaje se originalnom pakiranju DMEM-a do konačne koncentracije 10 % (Capricorn Scientific, Njemačka). Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1x (DPBS, Lonza, Švicarska) korišten je za ispiranje stanica. Tripsin (Sigma-Aldrich, SAD) je korišten za odvajanje stanica od podloge. Assay Diluent korišten je za razrjeđivanje alikvota stanica prilikom brojanja.

Plastične boce za uzgoj stanica, petrijevke, tubice za centrifugiranje, pločice sa 6 i 96 bunarčića (TPP, Švicarska)

##### **3.1.2. Određivanje IC50 vrijednosti i tretmani**

Resiquimod i imiquimod (Invivogen, SAD)

MTT (Sigma-Aldrich, SAD)

Dimetil sulfoksid (DMSO, Kemika, Hrvatska)

##### **3.1.3. Izolacija RNA**

Trizol Reagens (Ambion, SAD)

Kloroform (Kemika, Hrvatska)

Izopropanol (GRAM-MOL, Hrvatska)

Etanol (Kemika, Hrvatska)

### **3.1.4. Komercijalni kit-ovi za tretman DNazom i reverznu transkripciju**

TURBO DNA-free kit (Invitrogen, SAD)

High capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, SAD)

### **3.1.5. Predamplifikacija i RT-qPCR**

TaqMan ekspresijske probe za *TLR7* i  $\beta$ -*aktin* (Applied Biosystems, SAD)

2x TaqMan Universal Master Mix (Thermo Fisher Scientific, SAD)

Pločice s 96 jažica MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems, SAD)

Optička adhezivna folija MicroAmp™ Optical Adhesive Film (Applied Biosystems, SAD)

### **3.1.6. Westernska metoda detekcije proteina**

6x Hot Lysis Laemmli pufer pripremljen otapanjem 1,2 g SDS-a u 2 mL H<sub>2</sub>O te se zatim u tu otopinu dodaje 2,5 mL Tris-HCl (pH = 6,8) i 20 mg bromfenol plavo nakon čijeg se otapanja doda 3 mL glicerola i 1,2 mL merkaptoetanol

1 M Tris-HCl (pH 8,8)

1 M Tris-HCl (pH 6,8)

10 % natrij dodecil sulfat (SDS)

30 % akrilamid dobiva se otapanjem akrilamida i N,N'-metilen-bis-akrilamida u omjeru 29:1 u vodi te se zatim filtrira (Eurobio Scientific, Francuska)

10 % amonijev persulfat (APS) (Eurobio Scientific, Francuska)

Tetrametiletilendiamin (TEMED) (Eurobio Scientific, Francuska)

Izopropanol (GRAM-MOL, Hrvatska)

1x pufer za elektroforezu dobiven miješanjem 890 mL mqH<sub>2</sub>O, 100 mL 10x pufera za elektroforezu i 10 mL 10 % SDS-a, a 10x pufer se priprema otapanjem 30 g Tris-a i 144 g glicina u 1 L vode

Marker molekularnih masa PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, SAD)

Stakalca, česljići, nosači (Bio-Rad, SAD)

Membrana PVDF Western Blotting Membranes (Roche Diagnostics, UK)

Transfer pufer (5,82 g TRIZMA BASE, 2,93 g glicin, 200 mL metanol, 3,75 mL 10 % SDS)

Metanol (GRAM-MOL, Hrvatska)

Ponceau S

1x PBS-T pripremljen miješanjem 899 mL mqH<sub>2</sub>O, 100 mL 10x PBS-a i 1 mL Tween-a, a 10x PBS je pripremljen otapanjem 11,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 80 g NaCl i 2 g KCl u litru H<sub>2</sub>O (pH podešen na 7,4)

Monoklonsko antitijelo za TLR7 (Abcam, UK) 4F4 ab28048

Monoklonsko antitijelo za β-aktin (Santa Cruz Biotechnology, SAD) sc-47778

Sekundarno anti-mouse antitijelo (Santa Cruz Biotechnology, SAD) sc51602

Clarity ECL Western Blotting Substrate (Bio-Rad, SAD)

SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher, SAD)

### **3.1.7. Popis korištenih uređaja**

Inkubator Thermo Scientific HERACELL vios 160i (Thermo Fisher, SAD)

Invertni mikroskop

Centrifuga Eppendorf Centrifuge 5810 (Eppendorf, Njemačka)

Brojač stanica Beckman Coulter Z2 Counter & Analyzer (Beckman Coulter, SAD)

Vorteks IKA(R) GENIUS 3 (IKA, Japan)

Tresilica (Roth, UK)

Mikrotitarski čitač pločica Thermo Labsystem Multiskan EX (Thermo Fisher, SAD)

Spektrofotometar BioSpec Nano VIS (Shimadzu, Japan)

Termoblok Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf, Njemačka)

Centrifuga Thermo Scientific Heraeus Pico 21 Centrifuge (Thermo Fisher, SAD)

Uređaj za PCR TProfessional Thermocycler (Biometra, Njemačka)

Centrifuga Thermo Scientific Sorvall Lynx 4000 Centrifuge (Thermo Fisher, SAD)

7300 RT-PCR System (Applied Biosystems, SAD)

Sonifikator Microson™ Ultrasonic Cell Disruptor XL2000 (Misonix, SAD)

Vaga (Mettler Toledo, SAD)

Magnetska mješalica Tehnica Rotamix 550MMH (Tehco, Slovenija)

Uređaj za elektroforezu (Bio-Rad, SAD)

Uvitec Alliance Q9 Mini (Uvitec, UK)

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Rad sa staničnom kulturom**

Odmrzavanje stanica H1299, prethodno zamrznutih u mediju s 5 % DMSO-a je rađeno prema standardnom protokolu. U kriogenutubu sa stanicama je dodan 1 mL DMEM medija s 10 % FBS-a sobne temperature. Stanice su resuspendirane u mediju i prebačene u plastičnu tubicu za centrifugiranje s dodatnih 8 mL DMEM-a te centrifugirane 5 min pri brzini 300 x g. Nakon uklanjanja supernatanta, talog je resuspendiran u 10 mL DMEM-a s 10 % FBS-om te je sadržaj tubice prebačen u plastičnu bocu za uzgoj stanica T75. Stanice su uzgajane u inkubatoru na 37 °C s 5 % CO<sub>2</sub>. Konfluentnost i morfologija stanica provjeravani su svakodnevno pomoću invertnog mikroskopa.

Stanice su, u svrhu očuvanja konfluentnosti, presađivane svaka tri dana. Prilikom presađivanja stanicama je uklonjen medij, isprane su u 3 mL DPBS-a i dodan im je 1 mL tripsina kako bi se odvojile od površine. Tripsin je enzim koji cijepa peptidnu vezu nakon lizina i arginina na C terminusu te na taj način narušava izvanstanični matriks stanica i omogućava njihovo odvajanje od podloge. Stanice su inkubirane u tripsinu 4 min u inkubatoru. Potom je stanicama dodano 9 mL kompletiranog medija kako bi se inaktiviralo

djelovanje tripsina. Stanice su resuspendirane i 1 mL suspenzije prebačen je u novu plastičnu bocu za uzgoj stanica u koju je prethodno dodano 9 mL DMEM-a s 10 % FBS-a.

Nasađivanje točno određenog broja stanica, za potrebe pokusa, rađeno je tako što su nakon inaktivacije tripsina stanice prebačene u platičnu tubu od 15 mL. Alikvot od 100 µL stanične suspenzije pomiješan je s 9,9 mL Assay Diluent-a u plastičnoj kivetu te su zatim stanice izbrojane pomoću uređaja Beckman Coulter Z2 Counter & Analyzer.

### **3.2.2. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-qPCR)**

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-qPCR) rađena je u svrhu određivanja bazalne ekspresije gena *TLR7* u staničnom modelu H1299. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom je metoda koja se koristi za apsolutnu i relativnu kvantifikaciju nukleinskih kiselina. Za razliku od apsolutne kvantifikacije, pri relativnoj kvantifikaciji nije potrebno poznavati točnu količinu kalupa s kojim se ulazi u reakciju, nego se rezultati za analizirane gene normaliziraju u odnosu na endogenu kontrolu u istom uzorku – konstitutivno eksprimiran gen važan za bazalne funkcije organizma. Ta normalizacija se najčešće prikazuje kao razlika *Ct* (engl. *Cycle Threshold*) vrijednosti promatranog gena i gena koji služi kao kontrola pri čemu *Ct* vrijednost označava trenutak kada fluorescencijski signal postane jači od pozadinskog signala, odnosno trenutak kad je reakcija ušla u eksponencijalnu fazu. Što je gen više eksprimiran u stanici, njegova *Ct* vrijednost će biti niža jer će mu biti potrebno manje vremena za ulazak u eksponencijalnu fazu. TaqMan ekspresijske probe na 5' kraju imaju boju (FAM), a na 3' kraju nefluorescentni utišavač (engl. *quencher*) koji sprječava da proba daje fluorescentni signal. Tek u trenutku umnažanja polimeraza cijepa probu, boja i utišavač se razdvajaju i uređaj bilježi signal što omogućava kvantifikaciju reakcije u stvarnom vremenu.

#### **3.2.2.1. Izolacija RNA**

RNA iz kultiviranih stanica izolirana je prema uputama proizvođača. Stanice su isprane DPBS-om i inkubirane 5 min u Trizolu (1 mL) na sobnoj temperaturi. Trizol dovodi do razaranja stanične stijenke i staničnih komponenti pri čemu RNA ostaje sačuvana. Ukupni volumen je prebačen u 1,5 mL plastičnu tubicu i pomiješan s 200 µL kloroforma što će potaknuti razdvajanje vodene i organske faze. Tubice su energično miješane približno 15 sekundi i inkubirane 3 min na sobnoj temperaturi. Uzorci su zatim centrifugirani 15 min pri

brzini 12 000 x g na 4 °C. Gornji vodeni sloj je prebačen u novu 1,5 mL plastičnu tubicu i pomiješan s 500 µL izopropanola. Uzorci su inkubirani 10 min na 4 °C i potom centrifugirani 10 min pri brzini 12 000 x g na 4 °C. Supernatant je uklonjen, a talogu je dodan 1 mL 75 % etanola. Etanol uklanja zaostale proteine i ugljikohidrate iz taloga RNA. Uzorci su zatim centrifugirani 5 min pri brzini 7 500 x g na 4 °C. Postupak ispiranja s etanolom ponovljen je još dva puta nakon čega je etanol uklonjen, a uzorci ostavljeni da se suše na zraku približno 10 minuta. Talog je otopljen u 50 µL mqH<sub>2</sub>O. Koncentracija i čistoća izolirane RNA određena je pomoću uređaja BioSpec Nano VIS. Za mjerenje koncentracije nanesen je 1 µL RNA svakog uzorka, a kao prazna kontrola korištena je mqH<sub>2</sub>O. Uzorci su pohranjeni na -80 °C do korištenja.

#### **3.2.2.2. *Tretman DNazom***

DNazni tretman rađen je pomoću TURBO DNA-free kit-a. Za potrebe tretmana korišteno je 10 µg izolirane RNA. Volumen reakcijske smjese iznosio je 50 µL. Volumeni RNA za svaku reakcijsku smjesu su izračunati pomoću formule  $\gamma = m / V$  pri čemu je  $m = 10 \mu\text{g}$ , a vrijednosti  $\gamma$  se mogu naći u Tablici 1. Izračunatom volumenu RNA svakog uzorka dodano je još 5 µL pufera (10x TURBO DNase Buffer), 1 µL enzima (TURBO DNase Enzyme) i voda (Nuclease Free Water) do ukupnog volumena smjese. Uzorci su zatim inkubirani 30 min na temperaturi od 37 °C na uređaju Eppendorf Thermomixer Comfort nakon čega im je dodano 5 µL inaktivatora DNaze (DNase Inactivation Reagent). Uslijedila je petominutna inkubacija uzoraka na sobnoj temperaturi uz povremeno miješanje nakon koje su uzorci centrifugirani 1,5 min pri brzini 10 000 x g na sobnoj temperaturi. Supernatant je prebačen u novooznačene tubice. Određena je koncentracija i čistoća RNA pomoću uređaja BioSpec Nano VIS. Za mjerenje koncentracije nanesen je 1 µL RNA svakog uzorka, a kao prazna kontrola korištena je mqH<sub>2</sub>O. Uzorci su pohranjeni na -80 °C do ponovnog korištenja.

#### **3.2.2.3. *Reverzna transkripcija i amplifikacija u stvarnom vremenu***

Reverzna transkripcija rađena je pomoću High capacity cDNA Reverse Transcription kit-a. Za potrebe reverzne transkripcije korišten je 1 µg RNA očišćene od DNA. Volumeni RNA su izračunati pomoću formule  $\gamma = m / V$  pri čemu je  $m = 1 \mu\text{g}$ , a vrijednosti  $\gamma$  se mogu naći u Tablici 2. Izračunatom volumenu RNA svakog uzorka dodano je još: 2 µL pufera (10x RT Buffer), 0,8 µL miksa nukleozid trifosfata (25x dNTP mix), 2 µL nasumičnih početnica (10x

RT Random Primers), 1  $\mu\text{L}$  reverzne transkriptaze (MultiScribe Reverse Transcriptase) i  $\text{mqH}_2\text{O}$  do konačnog volumena reakcijske smjese koji je iznosio 20  $\mu\text{L}$ . Korišten je sljedeći program na uređaju TProfessional Thermocycler: 25 °C – 10 min, 37°C – 120 min, 85 °C – 5 min. Tubice s cDNA pohranjene su na -20 °C do korištenja.

Reakcijska smjesa za svaki uzorak pripremljena za RT-qPCR analizu sastojala se od 7,5  $\mu\text{L}$  2x TaqMan Universal Master Mix-a, 5,75  $\mu\text{L}$   $\text{mqH}_2\text{O}$  i 0,75  $\mu\text{L}$  TaqMan ekspresijske probe za gen *TLR7* ili  *$\beta$ -aktin* i 1  $\mu\text{L}$  predamplificirane cDNA. Za svaki uzorak su rađeni triplikati za svaku probu. Reakcijske smjese su ispipetirane na optičku pločicu s 96 jažica koja je zatim prekrivena optičkom adhezivnom folijom. Uzorci su centrifugirani 1 min pri 280 x g na sobnoj temperaturi. Korišten je sljedeći program na uređaju 7300 RT-PCR System: 50 °C – 2 min, 95 °C – 10 min, 95 °C – 15 s i 60 °C – 1 min pri čemu su posljednja dva koraka ponovljena 40 puta.

### **3.2.3. Izolacija ukupnih proteina iz staničnih lizata, elektroforeza u poliakrilamidnom gelu uz prisutnost SDS-a i westernska metoda detekcije proteina**

U svrhu određivanja ekspresije receptora TLR7 na razini proteina koristili smo westernsku metodu detekcije proteina. To je metoda za kvalitativnu i semikvantitativnu analizu proteina. Nakon izolacije i kvantifikacije, proteini se razdvajaju po veličini elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti SDS-a. Natrij dodecil sulfat (SDS) prekriva naboj bočnih peptidnih lanaca proteina i u kompleksu s proteinima stvara konformaciju klupka. Kako je količina SDS-a vezanog po jedinici mase proteina konstantna, proteini će se ponašati kao da imaju jednak oblik i omjer naboja i mase. Proteini se razdvajaju isključivo po veličini pri čemu će proteini manje molekulske mase putovati brže, a oni veće sporije. Nakon elektroforeze, negativno nabijeni proteini se prenose s gela na pozitivno nabijenu nitroceluloznu ili PVDF membranu pod utjecajem istosmjerne električne struje. Membrana se zatim blokira obranim mlijekom kako bi se spriječilo nespecifično vezivanje antitijela nakon čega slijedi inkubacija u primarnom antitijelu, razrijeđenom u mlijeku, specifičnom za određeni protein i detekcija uz pomoć konjugiranog sekundarnog antitijela i supstrata.

Za potrebe ispitivanja ekspresije receptora TLR7 koristili smo ukupne proteine izolirane iz staničnih lizata. Stanice su nakon uzgoja isprane u 1 mL 1x DPBS-a. Zatim im je dodano 350  $\mu\text{L}$  1x Hot Lysis Laemmli pufera koji je prethodno zagrijan na 95 °C. Pufer 1x Hot Lysis

Laemmli pripremljen je miješanjem 1 mL 6x Hot Lysis Laemmli pufera i 5 mL DPBS-a. Stanični lizati sakupljeni su brzim resuspendiranjem i miješanjem pufera po cijeloj površini bunarića i prebačeni u 1,5 mL plastičnu tubicu. Uzorak je kratko sonificiran i pohranjen na – 20 °C do korištenja.

Za razdvajanje proteina elektroforezom pripremljeni su donji 10 % gel za razdvajanje i gornji 5 % gel za sabijanje. Poliakrilamidni gelovi nastaju polimerizacijom monomera akrilamida u lance poliakrilamida i njegovim unakrsnim povezivanjem s ko-monomerom N,N'-metilen-bis-akrilamidom pri čemu amonijev persulfat i tetrametilendiamin djeluju kao katalizatori reakcije. Gel za razdvajanje pripremljen je miješanjem 1,5 mL mqH<sub>2</sub>O, 1,85 mL 1 M Tris-HCl (pH=8,8), 50 µL 10 % SDS-a, 1,65 mL 30 % otopine akrilamida, 25 µL 10 % amonijevog persulfata i 5 µL tetrametiletilendiamina (TEMED). Tridesetpostotna otopina akrilamida se dobiva otapanjem akrilamida i N,N'-metilen-bis-akrilamida u omjeru 29:1 u vodi te se zatim filtrira. Otopina gela za razdvajanje je dobro pomiješana i izlivena između stakalaca pričvršćenih na postolje. Kako kisik sprječava polimerizaciju gela, do ruba prednjeg stakalca dodan je sloj izopropanola. Gel je ostavljen da polimerizira 45 min nakon čega je izopropanol uklonjen, rub gela ispran destiliranom vodom i na njega dodan gel za sabijanje koji je pripremljen prema sljedećem receptu: 1,4 mL mqH<sub>2</sub>O, 0,25 mL 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 20 µL 10 % SDS-a, 0,35 mL 30 % otopine akrilamida, 10 µL 10 % amonij persulfata i 2 µL TEMED-a. Odmah po izlivanju gornjeg gela stavljen je češljic za formiranje jažica. Gel je ostavljen da polimerizira 60 min.

Po završetku polimerizacije gelovi se postavljaju u nosače s elektrodama i u kadicu. Između i sa strane gelova dodan je pufer za elektroforezu. U jažice ja naneseo 20 µL proteinskog uzorka netretiranih stanica H1299 koji je prethodno grijan 5 min na 96 °C u termobloku i 2 µl markera molekulskih masa *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific). Elektroforeza je provedena pri 120 V u uređaju za vertikalnu elektroforezu (Bio-Rad) u trajanju 90 min.

Transfer proteina na membranu PVDF rađen je pomoću uređaja TransBlot Turbo BlottingSystem (Bio-Rad). Membrana je aktivirana u metanolu 60 sekundi i zatim isprana u destiliranoj vodi. U kasetu uređaja su stavljeni filter papiri koji su prethodno bili uronjeni u pufer za prijenos na koje je zatim stavljena aktivirana membrana pa gel i u konačnosti ponovno filter papiri natopljeni u puferu za prijenos. Kasetu je zaklopljena i postavljena u



uređaj te je odabran program TURBO kojim se prijenos vrši pri 2500 mA u trajanju 7 minuta.

Provjera uspješnosti prijenosa rađena je bojanjem membrane u otopini Ponceau S. Bojanje omogućava vizualizaciju proteinskih vrpca na membrani jer se negativno nabijena boja veže za pozitivno nabijene skupine aminokiselina proteina i stvara nekovalentne veze s nepolarnim regijama proteina. Membrana se zatim ispiru u fosfatnom puferu s Tweenom (PBS-T) dok se ne uklone svi tragovi boje i inkubira 60 min u 5 % otopini mlijeka u prahu i PBS-T-a kako bi se spriječila nespecifična vezivanja antitijela. Pripremljeno je 1 : 500 razrjeđenje primarnog antitijela specifičnog za TLR7 dodatkom 10  $\mu$ L izvorne otopine antitijela u 5 mL 5 % otopine mlijeka u prahu. Kao kontrola nanošenja korišten je  $\beta$ -aktin. Pripremljeno je i 1 : 1000 razrjeđenje primarnog antitijela specifičnog za  $\beta$ -aktin dodatkom 5  $\mu$ L izvorne otopine antitijela u 5 mL otopine 5 % mlijeka u prahu. Membrana je nakon blokiranja inkubirana u otopini specifičnih antitijela preko noći na 4 °C uz konstantno miješanje na tresilici.

Sljedeći dan su membrane isprane tri puta u trajanju od 10 min u PBS-T-u uz miješanje pri sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja membrana je inkubirana 60 min u razrjeđenju sekundarnog sekundarnog antitijela (razrjeđenje 1 : 10 000). Membrana je zatim isprana tri puta po 10 min u PBS-T-u uz miješanje pri sobnoj temperaturi.

Detekcija proteinskih vrpca rađena je uz pomoć supstrata Clarity ECL Western Blotting Substrate (Bio-Rad) za  $\beta$ -aktin i SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate za TLR7. Otopina luminola i otopine peroksida pomiješane su u omjeru 1 : 1 te se u toj smjesi membrana inkubirala pet minuta u mraku. S membrane je uklonjen višak otopine te je ona potom uslikana uz pomoć uređaja Uvitec Alliance Q9 Mini.

#### **3.2.4. MTT test**

Kako bismo odredili utjecaj združene terapije citostaticima i ligandima za receptor TLR7 na preživljenje stanica H1299, koristili smo MTT test. Sama metoda temelji se na mogućnosti dehidrogenaza vijabilnih (živih) stanica da reduciraju žute topljive tetrazolijeve soli u ljubičasti netopljivi formazan, a pogodna je jer omogućava analiziranje utjecaja velikog broja tvari u širokom rasponu koncentracija na stanice u kratkom vremenu. Apsorbancija koja se očitava proporcionalna je broju živih stanica.

#### **3.2.4.1. Određivanje IC50 vrijednosti citostatika**

Prije početka analiza neophodno je testom MTT odrediti IC50 vrijednosti za spojeve čiji se citotoksični učinak mjeri, u konkretnom slučaju cisplatinu, karboplatinu i paklitaksel. Vrijednost IC50 (engl. *half maximal inhibitory concentration*) predstavlja koncentraciju tvari koja uzrokuje 50 % inhibiciju nekog parametra. Kako bi se odredila IC50 vrijednost citostatika, na pločicu s 96 bunarića nasadeno je 5 000 stanica H1299 u 100 µL po jažici.

Sljedeći dan su napravljena serijska razrjeđenja citostatika. Ispitivane koncentracije citostatika prikazane su na Slici 9. (u Rezultatima). Stanicama je dodano 20 µL jednog citostatika određene koncentracije. Kontrola u vidu netretiranih stanica i svi tretmani rađeni su u kvadriplikatima.

Stanice su inkubirane u citostaticima 72 h nakon čega im je uklonjen medij te im je dodano 40 µL 1x 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolij bromida (MTT). Dodano je i 40 µL MTT-a u tri prazne jažice koje će služiti kao prazna kontrola. Stanice su inkubirane četiri sata u MTT-u nakon čega im je dodano 170 µL DMSO-a koji funkcionira kao otapalo za kristale formazana. Stanice su zatim blago vorteksirane 10 min kako bi se pospješilo otapanje kristala. Nakon toga izmjerena je apsorbancija pri 570 nm na mikrotitarskom čitaču pločica uz program Ascent / MTT SHAKE S.E.E.

#### **3.2.4.2. Utjecaj združene terapije ligandima receptora TLR7 i citostaticima na stanice**

Za potrebe procjene utjecaja združene terapije ligandima receptora TLR7 i citostaticima nasadeno je 4 000 stanica H1299 u 100 µL po jažici na pločicu s 96 jažica. Netretirane stanice su korištene kao negativna kontrola. Kontrola i svi navedeni tretmani rađeni su u triplikatima.

Stanice su 24 h nakon nasađivanja tretirane s 20 µL resiquimoda ili imiquimoda određene koncentracije, a zatim nakon četiri sata i s 20 µL određenog citostatika. Inkubacija je trajala 72 h na 37 °C nakon čega je stanicama uklonjen medij i dodano 40 µL 1x 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolij bromida (MTT). Također je dodano i 40 µL MTT-a u tri prazne jažice koje će služiti kao prazna kontrola. Stanice su ostavljene u MTT-u 4 h te im je potom dodano 170 µL DMSO-a, blago su vorteksirane 10 min nakon čega je mjerena

apsorbancija pri 570 nm na mikrotitarskom čitaču pločica i pomoću programa Ascent / MTT SHAKE S.E.E.

### **3.2.5. Statistička analiza**

Statistička analiza rezultata rađena je pomoću Two way ANOVA testa u Programu GraphPad Prism 5. Statistički značajne vrijednosti prikazane su na grafovima (Slika 10. i Slika 11.) zvjezdicama, gdje jedna zvjezdica (\*) označava vrijednosti  $P < 0,05$ , dvije zvjezdice (\*\*) vrijednosti  $P < 0,01$  i tri zvjezdice (\*\*\*)  $P < 0,001$ .

## 4. Rezultati

Ovim istraživanjem analizirali smo utjecaj združene terapije sintetskim ligandima za receptor TLR7 (imiquimod i resiquimod) i citostaticima (cisplatina, karboplatina i paklitaksel) na preživljenje stanične linije H1299. Cisplatina, karboplatina i paklitaksel su na listi najčešće korištenih kemoterapeutika prilikom liječenja tumora pluća ne-malih stanica, a tretman imiquimodom pokazao je antiproliferativni učinak na stanične linije različitih tumora. Kako su upalni procesi uključeni u sve stadije tumorigeneze, važno je razumjeti ulogu imunskog sustava u njima. Važnu ulogu u aktivaciji urođenog imunskog sustava imaju Toll-like receptori, a dosadašnja istraživanja su pokazala da bi receptor TLR7 mogao imati kako antitumorska, tako i tumorigenična djelovanja.

Prije provjere učinka združene terapije ligandima i citostaticima na stanice H1299, ispitali smo razinu ekspresije receptora TLR7 na nivou mRNA i proteina. Nakon što smo potvrdili izražaj gena/proteina na testiranoj staničnoj liniji, odredili smo IC50 vrijednost korištenih citostatika. Definirane IC50 koncentracije smo koristili u daljnjim pokusima ispitivanja združenog djelovanja na način da su stanice uvijek bile tretirane s rastućim koncentracijama sintetskog liganda i IC50 koncentracijom testiranog citostatika.

#### 4.1. Ekspresija receptora TLR7 na razini mRNA

U svrhu određivanja razine ekspresije gena *TLR7* na nivou mRNA korištena je opisana metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (RT-qPCR). Za potrebe te analize prvo smo izolirali ukupnu RNA metodom po Trizolu iz netretiranih i tretiranih stanica. Koncentracija i čistoća izoliranih RNA prikazana je u Tablici 1.

Tablica 1. Srednje vrijednosti očitanih masenih koncentracija (ng/ $\mu$ L) RNA izoliranih iz netretiranih i tretiranih stanica H1299 i OD 260/280 i 230/280 na spektrofotometru BioSpec Nano VIS; NT-netretirane stanice

Uzorak	$\gamma$ (ng/ $\mu$ L)	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
NT	1716	1,9	1,9
R848 1 $\mu$ M	717,17	1,55	2,29
R848 5 $\mu$ M	869,75	1,66	2,29
R848 15 $\mu$ M	1043,645	1,66	2,32
Imiquimod 1 $\mu$ g/mL	839,03	1,73	1,57
Imiquimod 5 $\mu$ g/mL	890,88	1,76	1,6
Imiquimod 15 $\mu$ g/mL	399,62	1,65	0,91

Zatim je rađen tretman DNazom pomoću TURBO DNA-free kit-a nakon kojeg je ponovno određena koncentracija i čistoća RNA (Tablica 2.) te je 1  $\mu$ g te RNA kasnije korišten u reverznoj transkripciji koja je napravljena pomoću High Capacity cDNA Reverse Transcription kit-a.

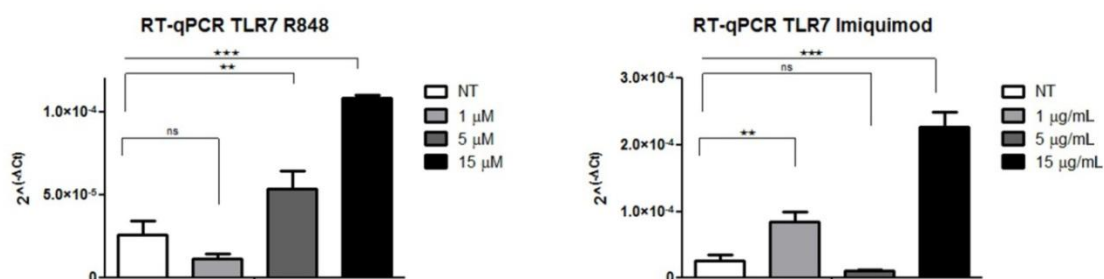
Tablica 2. Srednje vrijednosti očitanih masenih koncentracija (ng/ $\mu$ L) RNA izoliranih iz netretiranih i tretiranih stanica H1299 i OD 260/280 i 230/280 na spektrofotometru BioSpec Nano VIS nakon tretmana DNazom; NT-netretirane stanice

Uzorak	$\gamma$ (ng/ $\mu$ L)	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
NT	1153,81	1,94	1,56
R848 1 $\mu$ M	155,915	1,94	1,59
R848 5 $\mu$ M	192,09	2	1,7
R848 15 $\mu$ M	165,24	1,97	1,73
Imiquimod 1 $\mu$ g/mL	274,14	1,68	0,76
Imiquimod 5 $\mu$ g/mL	172,23	1,93	1,28
Imiquimod 15 $\mu$ g/mL	173,825	1,87	0,78

Za potrebe predamplifikacije korišteno je 250 ng cDNA, a 1  $\mu$ L predamplificirane cDNA koristio se kasnije u lančanoj reakciji polimerazom u stvarnom vremenu. Za potrebe RT-qPCR-a korištene su TaqMan ekspresijske probe za gene *TLR7* i  $\beta$ -aktin i uređaj 7300 RT-PCR System.

Tablica 3. Omjer ekspresije gena za *TLR7* u odnosu na endogeni gen  $\beta$ -aktin dobiven RT-PCR analizom iz stanica H1299 kultiviranih u čistom mediju i mediju s dodatkom resiquimoda i imiquimoda u rastućim koncentracijama. NT- netretirane stanice; Ct – srednja vrijednost Ct tehničkih triplikata

Uzorak	Ct (TLR7)	Ct ( $\beta$ -aktin)	$2^{-\Delta Ct}$
NT	23,35227394	9,959706306	9,29898E-05
R848 1 $\mu$ M	23,76389313	7,369855404	1,16119E-05
R848 5 $\mu$ M	21,68920898	7,333810806	4,77084E-05
R848 15 $\mu$ M	20,65228844	7,473583221	0,000107849
Imiquimod 1 $\mu$ g/mL	21,17975426	7,637945652	8,38512E-05
Imiquimod 5 $\mu$ g/mL	24,12898827	7,553577423	1,02401E-05
Imiquimod 15 $\mu$ g/mL	20,16573143	7,849159718	0,000196039



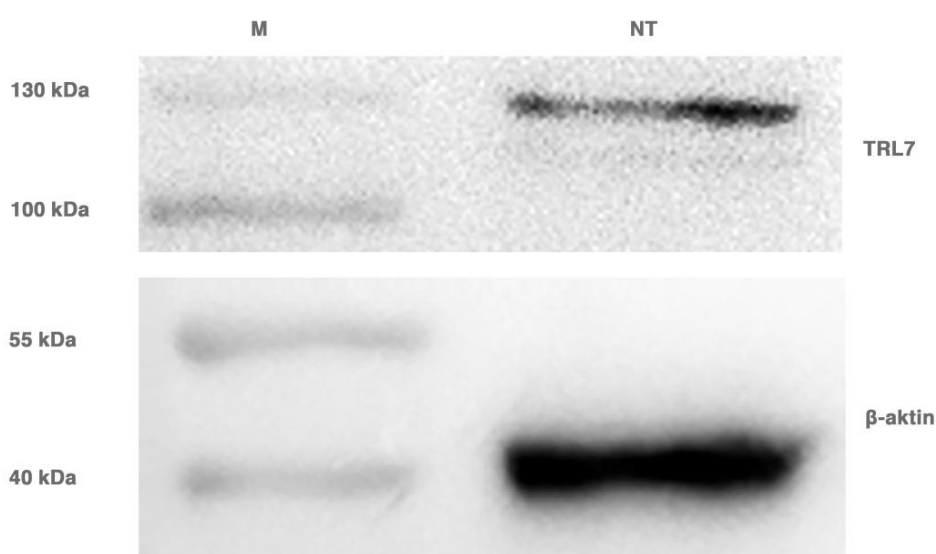
Slika 6. Ekspresija receptora TLR7 u netretiranim stanicama H1299 i stanicama tretiranim 1, 5 i 15  $\mu$ M koncentracijama resiquimoda/R848 (lijevo) i 1, 5 i 15  $\mu$ g/mL koncentracijama imiquimoda (desno); NT- netretirane stanice

Rezultati ove analize pokazuju da netretirane stanice i stanice tretirane sintetskim ligandima ekspimiraju receptor TLR7 na razini mRNA. Također, rezultati ove analize su pokazali da tretman ligandima utječe na razinu ekspresije samog receptora, ali mehanizmi tih promjena nisu dio ovog istraživanja. Važno je napomenuti da u uzorcima u kojima nije dodana cDNA

(engl. *non template control*) nije došlo do umnažanja što znači da su korištene probe visoko specifične.

#### 4.2. Ekspresija receptora TLR7 na razini proteina

Sljedeći korak bio je ispitati ekspresiju receptora TLR7 na razini proteina. Za te potrebe ukupni proteini izolirani su iz staničnih lizata netretiranih stanica H1299, razdvojeni na temelju veličine elektroforezom i preneseni na PVDF membranu koja je inkubirana s monoklonskim antitijelima sopecifičnim za TLR7 i  $\beta$ -aktin.



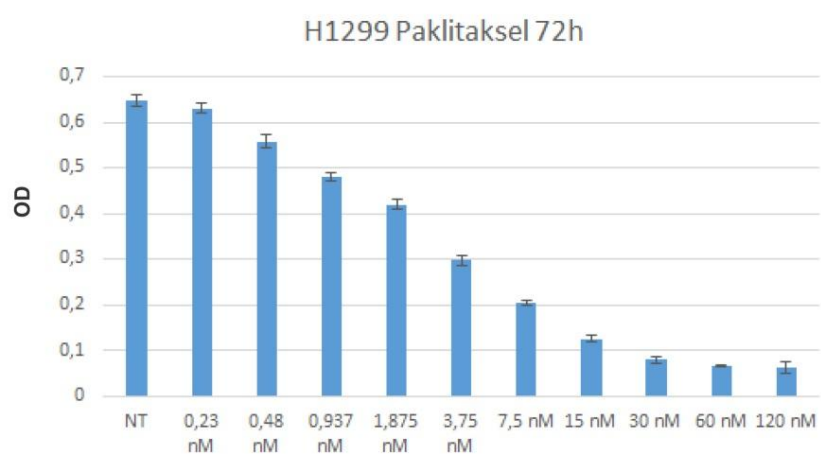
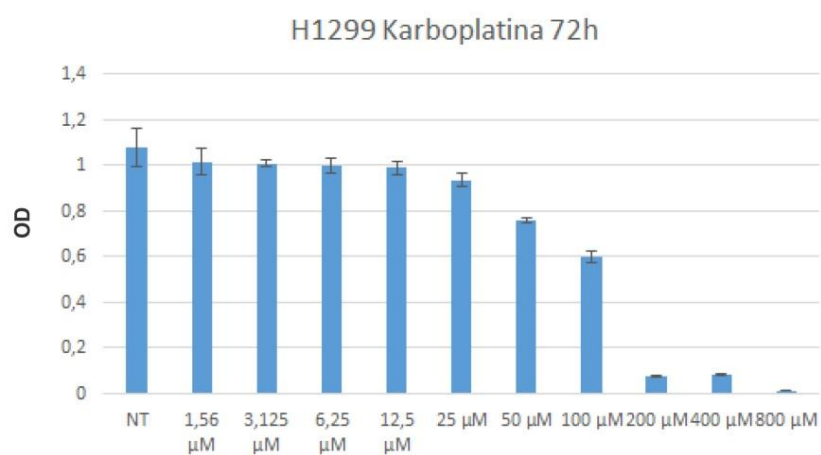
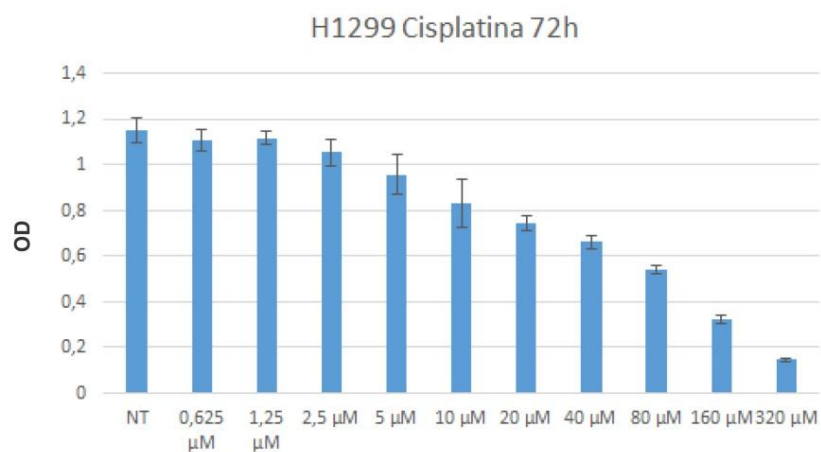
Slika 7. PVDF membrana inkubirana u antitijelu za receptor TLR7 (ab28048) i  $\beta$ -aktin (sc-47778) nakon provedene ekspozicije u trajanju 15 min za receptor TLR7 i 5 s za  $\beta$ -aktin. M - marker molekulskih masa *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific), NT - uzorak netretiranih stanica H1299

Rezultati ove analize prikazani su na Slici 7. gdje se jasno vidi proteinska vrpca receptora TLR7 na odgovarajućoj veličini od oko 130 kDa. Može se vidjeti i proteinska vrpca kontrole  $\beta$ -aktina koja potvrđuje prisutnost proteina u uzorcima na veličini nešto većoj od 40 kDa. Rezultati ovih analiza pokazali su da stanična linija H1299 eksprimira receptor TLR7 i na proteinskoj razini.

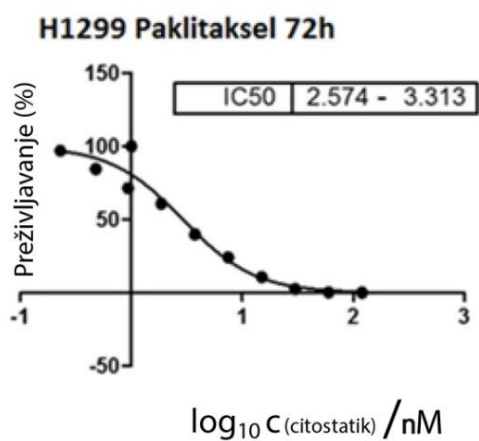
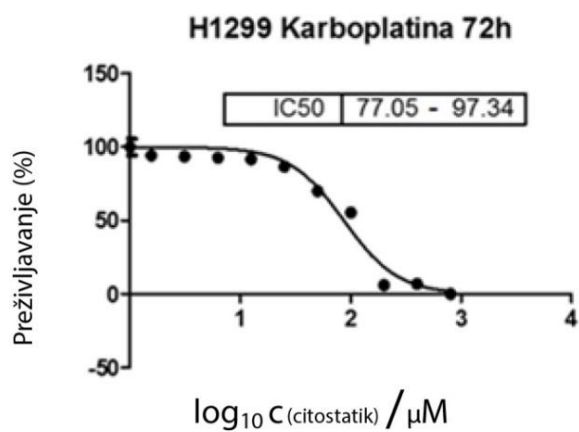
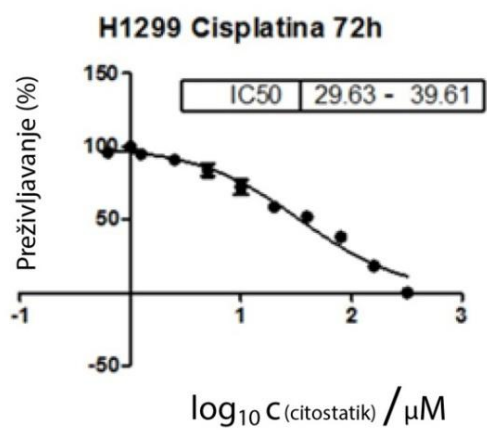
### **4.3. Određivanje IC50 vrijednosti citostatika**

Prilikom promatranja utjecaja združene terapije sintetskih liganada za receptor TLR7 i citostatika bilo je neophodno odrediti IC50 koncentraciju korištenih kemoterapeutika. Korištene koncentracije resiquimoda i imiquimoda odabrane su na temelju prethodnih pokusa. IC50 vrijednosti za svaki citostatik određene su MTT testom vijabilnosti, a vrijednosti ispitivanih koncentracija prikazane su na Slici 8. Na Slici 9. prikazane su krivulje preživljenja stanica nakon tretmana.





Slika 8. Utjecaj citostatika: cisplatine (gore), karboplatine (sredina) i paklitaksela (dolje) na preživljenje stanica H1299. Promatrane koncentracije za svaki citostatik prikazane su na x-osi. OD – optička gustoća (engl. *optical density*). Vrijeme inkubacije iznosilo je 72 h.

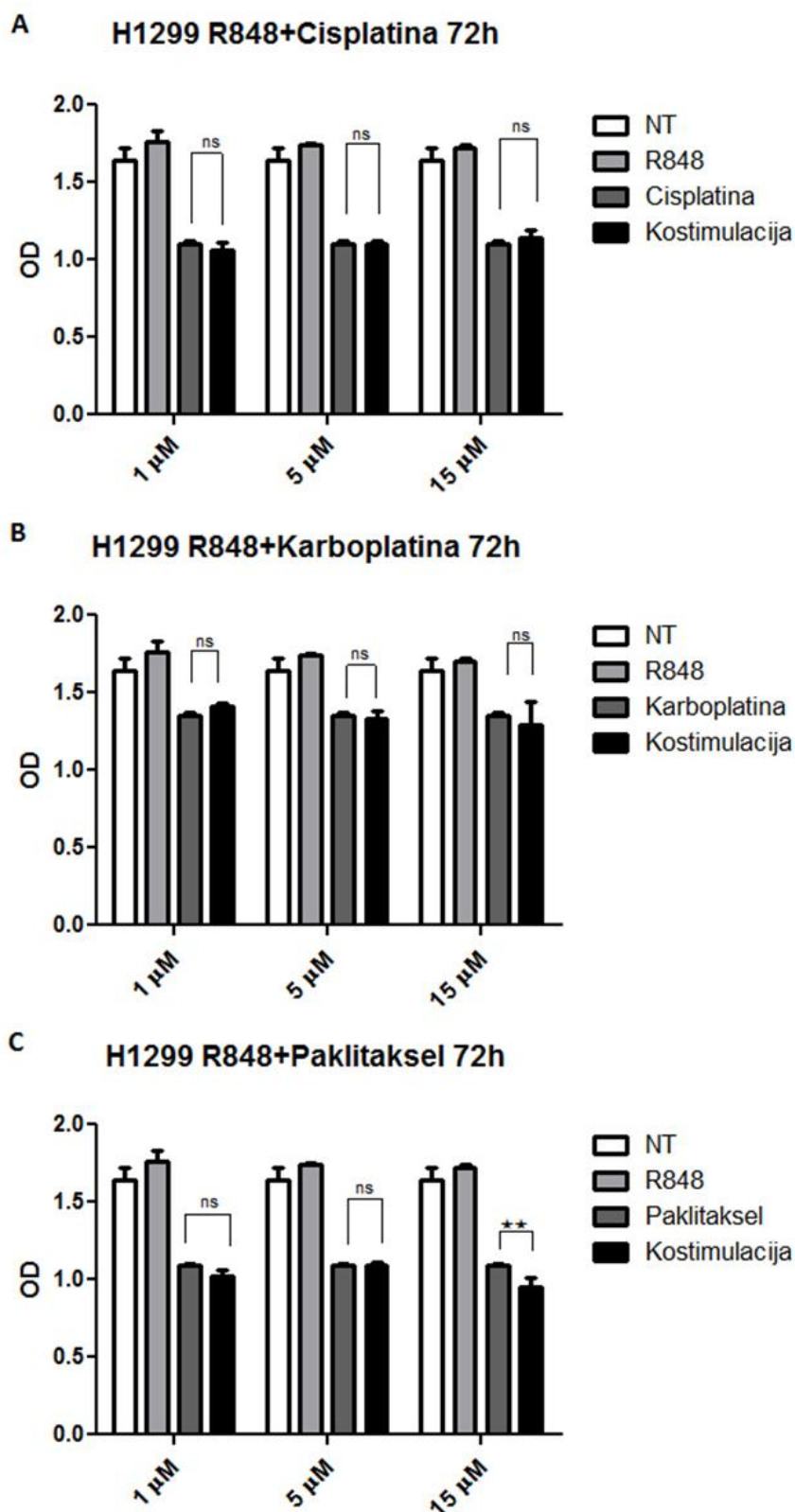


Slika 9. Krivulja preživljenja stanica H1299 nakon tretmana citostaticima: cisplatinom (gore), karboplatinom (sredina) i paklitakselom (dolje) u trajanju 72 h. Istaknute su IC50 vrijednosti za svaki od korištenih citostatika.

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da su dobiveni sljedeći rasponi IC<sub>50</sub> vrijednosti: za cisplatinu 29,63 - 39,61  $\mu\text{M}$ , za karboplatinu 77,05 - 97,34  $\mu\text{M}$  i za paklitaksel 2,574 - 3,313 nM. Svi spojevi su pokazali citotoksični učinak na stanice H1299 što je očekivano s obzirom na to da se radi o poznatim kemoterapeutcima. Također, vidljivo je da se povećanjem koncentracije citostatika smanjuje vijabilnost stanica. Najslabiji citotoksični učinak ima karboplatina (IC<sub>50</sub> = 77,05 - 97,34  $\mu\text{M}$ ), a najjači paklitaksel koji je već pri niskim koncentracijama izrazito citotoksičan za stanice (IC<sub>50</sub> = 2,574 - 3,313 nM). U daljnjim pokusima odlučili smo koristiti sljedeće koncentracije: 35  $\mu\text{M}$  za cisplatinu, 85  $\mu\text{M}$  za karboplatinu i 2,5 nM za paklitaksel.

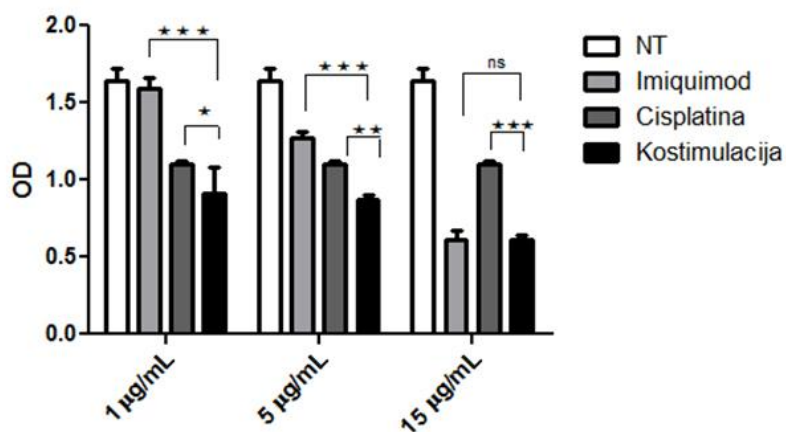
#### **4.4. Utjecaj terapije ligandima za receptor TLR7 i citostaticima na stanice**

U svrhu ispitivanja združenog djelovanja sinteskih liganada za TLR7 i citostatika na preživljenje stanica H1299, stanice su tretirane s određenom IC<sub>50</sub> koncentracijom citostatika i rastućim koncentracijama liganda - 1, 5 i 15  $\mu\text{M}$  koncentracijom resiquimoda i 1, 5 i 15  $\mu\text{g/mL}$  koncentracijom imiquimoda. Promatrani su sljedeći eksperimentalni uvjeti: netretirane stanice, stanice tretirane samo ligandom, stanice tretirane samo citostaticom i stanice tretirane kombinacijom liganda i citostatika. Svi pokusi rađeni su u triplikatima. Utjecaj terapije na preživljenje stanica određen je MTT testom. Očitani rezultati su statistički obrađeni, a vrijednost  $P < 0,05$  se uzimala kao statistički značajna.

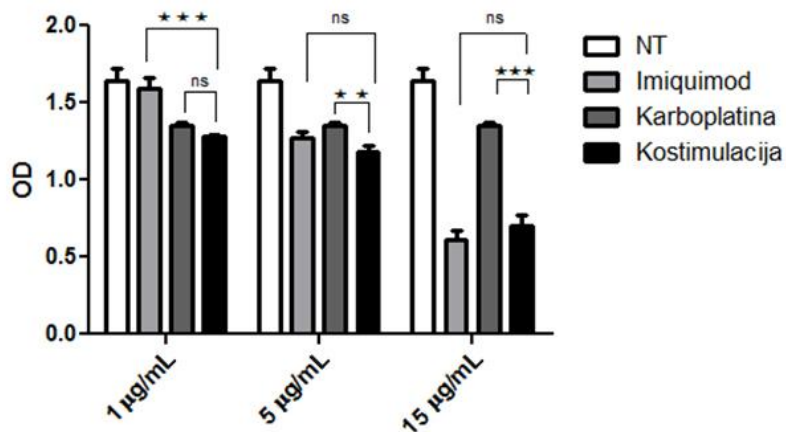


Slika 10. Učinkovitost združene terapije R848 (resiquimodom) i cisplatinom (A), R848 i karboplatinom (B), R848 i paklitakeslom (C) na tumorske stanice H1299. OD – optička gustoća (engl. *optical density*); NT – netretirane stanice; ns – *non significant*, \* -  $P < 0,05$ , \*\* -  $P < 0,01$  \*\*\* -  $P < 0,001$

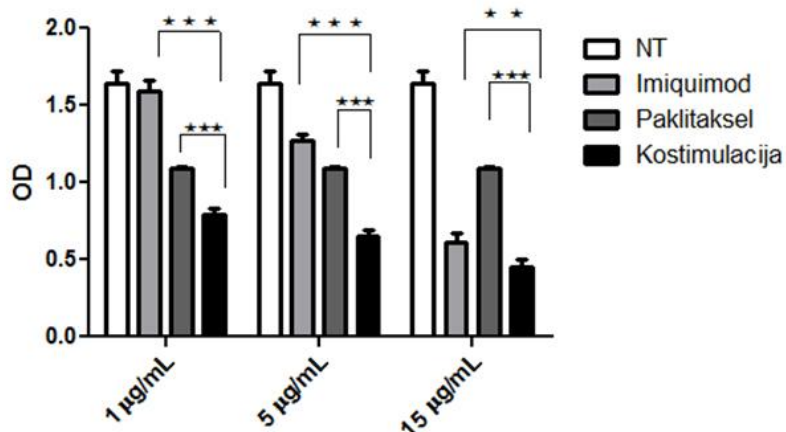
**A H1299 Imiquimod+Cisplatina 72h**



**B H1299 Imiquimod+Karboplatina 72h**



**C H1299 Imiquimod+Paklitaksel 72h**



Slika 11. Učinkovitost zdužene terapije imiquimodom i cisplatinom (A), imiquimodom i karboplatinom (B), imiquimodom i paklitakeslom (C) na tumorske stanice H1299. OD – optička gustoća (engl. *optical density*); NT – netretirane stanice; ns – *non significant*, \* -  $P < 0,05$ , \*\* -  $P < 0,01$  \*\*\* -  $P < 0,001$

Kako bi se razlučilo djelovanje liganda od citostatika, promatran je i učinak tretmana samo ligandom ili samo citostatikom na tumorske stanice.

Rezultati analiza pokazali su da ligand R848 nema citotoksičan učinak na stanice i njihova vijabilnost, u svim primijenjenim koncentracijama, je ostala jednaka netretiranim stanicama (Slika 10.). Rezultati MTT testa su pokazali da tretman stanica resiquimodom u kombinaciji s cisplatinom i karboplatinom ne mijenja citotoksični učinak citostatika, a u kombinaciji s paklitakselom, pri koncentraciji resiquimoda od 15  $\mu\text{M}$ , dolazi do statistički značajnog povećanja citotoksičnog učinka na stanice u odnosu na tretman stanica samo paklitakselom.

Za razliku od liganda R848, imiquimod je pokazao snažno citotoksično djelovanje pri koncentracijama 5  $\mu\text{g/mL}$  i 15  $\mu\text{g/mL}$ . Tretman stanica imiquimodom koncentracijom od 1  $\mu\text{g/mL}$  nije imao citotoksično djelovanje na stanice – stanice su se ponašale identično netretiranim uvjetima (Slika 11.). Združeni tretman stanica imiquimodom (1  $\mu\text{g/mL}$ ) u kombinaciji sa cisplatinom i paklitakselom statistički je značajno povećavao citotoksični učinak na stanice H1299. Povećanjem koncentracije imiquimoda (5  $\mu\text{g/mL}$ ) povećao se i citotoksični učinak na stanice H1299, koji je i dalje bio manji ili jednak učinku samog citostatika. Kostimulacija stanica sa testiranim citostaticima statistički je značajno, u manjoj (karboplatina) ili većoj mjeri (cisplatina i paklitaksel), pojačala citotoksični učinak na stanice, u odnosu na sami imiquimod ili citostatik. Daljnjim povećanjem koncentracije imiquimoda došlo je do značajnog porasta citotoksičnog djelovanja samog liganda i taj učinak je bio jači od sva tri testirana citostatika. Stoga je u slučaju tretmana stanica H1299 s 15  $\mu\text{g/mL}$  imiquimoda promatrano nadjačava li združeni tretman citostatikom djelovanje sintetskog liganda, imiquimoda. Rezultati ovih analiza su pokazali da jedino združeni tretman stanica H1299 s imiquimodom (15  $\mu\text{g/mL}$ ) i paklitakselom statistički značajno nadjačava djelovanje pojedinačnih tretmana.

## 5. Rasprava

Maligni tumor pluća predstavlja značajan javno-zdravstveni problem. Iako se njegova učestalost značajno smanjila pod utjecajem kampanja protiv pušenja, broj umrlih je i dalje gotovo jednak broju dijagnosticiranih slučajeva. Pušenje se smatra najvećim faktorom rizika za razvoj tumora pluća, ali velik broj dijagnosticiranih slučajeva kod nepušača upućuje na genetsku predispoziciju bolesti.

Procjenjuje se da se oko 20 % dijagnosticiranih tumora javlja kao posljedica kroničnih upala (Grivennikov, Greten i Karin, 2010). Upalni procesi su važni za tumorigenezu i mogu biti uključeni u sve stadije: inicijaciju, promociju, progresiju, angiogenezu i metastaziranje. Uz stanice samog tumora, tumorski mikrookoliš sadrži i stanice urođenog (makrofage, neutrofile, mastocite, dendritičke stanice, prirodene stanice ubojice) i stečenog imunskog sustava (T i B limfocite). Te stanice komuniciraju otpuštanjem citokina koji aktivacijom različitih transkripcijskih faktora poput SMAD (engl. *small mothers against decapentaplegic*), STAT (engl. *signal transducer and activator of transcription*), NF- $\kappa$ B (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) i AP-1 (engl. *activator protein 1*) mogu potaknuti progresiju tumora ili antitumorsku imunost (Grivennikov, Greten i Karin, 2010). U ove signalne puteve uključeni su i Toll-like receptori (TLR) odgovorni za prepoznavanje patogenu pridruženih molekularnih sljedova. Endosomski receptor TLR7 eksprimiran je u plazmocitoidnim dendritičkim stanicama, mijeloidnim dendritičkim stanicama, monocitima, makrofagima te B-limfocitima. Aktiviraju ga jednolančane virusne RNA i sintetski ligandi, a prijenos signala preko molekula Myd88, IRAK4, TRAF6 i TRAF3 ili TAK1 dovodi do aktivacije transkripcijskih faktora IRF7 ili NF- $\kappa$ B (Kobold *i sur.*, 2014). Pokazano je da receptor TLR7 može imati i antitumorsko i protumorigenično djelovanje (Dajon, Iribarren i Cremer, 2015). Međutim, još uvijek se ne zna koji su to geni, modulatori imunskog odgovora, uključeni u procese karcinogeneze.

Istraživanje na Institutu Ruđer Bošković, pod vodstvom više znanstvene suradnice dr. sc. Jelene Knežević, pokazalo je da je polimorfizam smješten u promotorskoj regiji gena *TLR7* statistički značajno povezan s nastankom karcinoma pluća i na taj način se može smatrati čimbenikom rizika za razvoj tumora pluća. Također je pokazano, u *in vitro* modelu, da prisutnost tog polimorfizma značajno utječe na razinu ekspresije gena (neobjavljeni rezultati).

Osim na stanicama imunskog sustava, receptori TLR su eksprimirani i u mnogim tumorskim stanicama, kao i u nekim zdravim tkivima. Jiang i sur. su dokazali ekspresiju receptora TLR7 u stanicama tumora želuca iako je ona bila manja u odnosu na zdravo epitelno tkivo želuca (Jiang *i sur.*, 2016). Cherfils-Vicini i sur. pokazali su da su receptori TLR 1-10 eksprimirani u tumorskim stanicama ne-malih tumora pluća, konkretno adenokarcinoma i karcinoma skvamoznih stanica. Također, dokazali su ekspresiju receptora i u staničnim linijama adenokarcinoma A549 i H1355, skvamoznog karcinoma SK-MES i epitelnih stanica bronha 16HBE i BEAS-2B (Cherfils-Vicini *i sur.*, 2010). U ovom radu uspjeli smo pokazati da stanična linija metastatskog tumora pluća H1299 eksplicira receptor TLR7 kako na mRNA (Slika 6.), tako i na proteinskoj razini (Slika 7.). Ovaj rezultat je značajan jer će omogućiti funkcionalne analize na genu/proteinu TLR7 na još jednom staničnom modelu.

Kao što je već ranije spomenuto, osim liganda virusnog porijekla, danas postoji i čitav niz sintetskih liganada koji aktiviraju receptor TLR7. Neki su specifični za receptor TLR7, a neki uz receptor TLR7 aktiviraju i receptor TLR8. U specifične ubrajamo imidazokvinolne spojeve imiquimod (R837) i gardiquimod, analog gvanizina loksoribin, analog adenina CL264 i analog baza CL307. Imidazokvinolni spojevi resiquimod (R848) i CL097 i polidT mogu aktivirati i receptor TLR7 i receptor TLR8.

Iz literature je poznato da imiquimod može potaknuti apoptozu tumorskih stanica aktivacijom kaspaza preko proteina Bcl-2 (Schön i Schön, 2007). Također, Courbet i sur. pokazali su da imiquimod narušava strukturu mikrotubula u *in vitro* uvjetima što dovodi do blokiranja staničnog ciklusa u G2/M fazi i induciranja apoptoze. Spojevi koji ometaju normalno funkcioniranje mikrotubula iznimno su interesantni i koriste se u liječenju tumora jer su tumorske stanice, uslijed čestih dioba, više izložene njihovom djelovanju (Courbet *i sur.*, 2017). Nekoliko istraživanja pokazalo je da tretman imiquimodom smanjuje proliferaciju različitih tumora. Jiang i sur. su utvrdili da tretman imiquimodom dovodi do smanjenja proliferacije stanica tumora želuca SGC-7901 (Jiang *i sur.*, 2016). Han i sur. dokazali su da imiquimod u mišjim (TRAMP-C2) i ljudskim (PC3) staničnim linijama prostate u *in vitro* uvjetima inhibira proliferaciju stanica te sprječava rast tumora prostate u *in vivo* uvjetima u mišjim modelima (Han, Lee, *i sur.*, 2013). Rezultati Almomen i sur. upućuju na to da imiquimod inducira apoptozu *in vitro* u staničnim linijama endometrijskog adenokarcinoma Ishikawa i HEC-1A te inhibira tumorski rast *in vivo* u mišjim modelima (Almomen *i sur.*, 2016). Villamon i sur. pokazali su da imiquimod, ali i resiquimod (R848) u manjoj mjeri, inhibiraju proliferaciju staničnih linija mijeloične leukemije. Imiquimod je zaustavljao rast u



linijama HL-60, U-937, HEL, MOLM-13, EOL-1, K-562, KG-1, KG-1a, Kasumi-1 i NB4, a resiquimod samo u prvih šest i s manjom učinkovitošću (Villamón *i sur.*, 2018). Naši rezultati također su potvrdili da imiquimod ima citotoksično djelovanje i na metastatske stanice tumora pluća H1299 u *in vitro* uvjetima bazalne ekspresije receptora TLR7 pri koncentracijama 5  $\mu\text{g/mL}$  i 15  $\mu\text{g/mL}$  što je u skladu s istraživanjima na drugim vrstama tumora. Resiquimod nije pokazao citotoksično djelovanje na stanice H1299 ni pri jednoj koncentraciji (Slika 10.).

Cisplatina, karboplatina i paklitaksel su kemoterapeutici često korišteni pri liječenju tumora pluća ne-malih stanica. Cisplatina i karboplatina interferiraju s replikacijom DNA, dok paklitaksel interferira s normalnom funkcijom mikrotubula. U našem istraživanju sva tri spoja su se pokazala citotoksičnim za stanice H1299 što je i očekivano s obzirom na to da se radi o poznatim kemoterapeuticima. Najveći citotoksični učinak imao je paklitaksel, a najmanji karboplatina.

Naše istraživanje pokazalo je da združeni tretman stanica imiquimodom (1  $\mu\text{g/mL}$ ) u kombinaciji sa cisplatinom i paklitakselom statistički značajno povećava citotoksični učinak na stanice H1299. Koncentracija imiquimoda od 5  $\mu\text{g/mL}$  imala je veći citotoksični učinak na stanice H1299, dok je kostimulacija stanica sa cisplatinom i paklitakselom statistički značajno pojačala citotoksični učinak na stanice, u odnosu na sami imiquimod ili citostatik. Pri koncentraciji 15  $\mu\text{g/mL}$  citotoksični učinak imiquimoda bio je jači od svih ispitivanih citostatika (Slika 11.). Također, pokazali smo da resiquimod pri koncentraciji od 15  $\mu\text{M}$  u kombinaciji s paklitakselom statistički značajno povećava citotoksični učinak na stanice H1299 u odnosu na tretman stanica samo paklitakselom (Slika 10.). Posebno su nam interesantni rezultati koje smo dobili na niskim koncentracijama i sintetskog liganda imiquimoda i citostatika, gdje u prvom redu ističemo paklitaksel. Oni ukazuju na translacijski potencijalni dobivenih rezultata u npr. animalne modele. Važno je naglasiti da su na Institutu Ruđer Bošković u tijeku istraživanja koja ispituju mijenja li promijenjena razina ekspresije gena *TLR7* ove rezultate. U liječenju tumora pluća ovo bi bio izuzetno važan podatak jer bi ukazivao na činjenicu da bi razina ekspresije gena *TLR7* mogla biti dobar biomarker odgovora na združenu terapiju.

Cherfils-Vicini *i sur.* su u svojim istraživanjima pokazali da se prethodnim stimuliranjem receptora TLR7 sintetskim ligandom loksoribinom potiče kemorezistencija staničnih linija ne-malih tumora pluća A549 i SK-MES na djelovanje citostatika cisplatine, karboplatine,

doksorubicina i navelbina (Cherfils-Vicini *i sur.*, 2010). Također, Chatterjee *i sur.* dokazali su da u *in vivo* mišjim modelima s graftom stanica A549 tretman loksoribinom onemogućava negativni učinak cisplatine na rast tumora (Chatterjee *i sur.*, 2014). Na prvi pogled čini se da su naši rezultati u suprotnosti s do sada objavljenim rezultatima, međutim, mi smo u našim pokusima koristili drugi stanični model (H1299) i druge ligande. Za konačnu potvrdu do sada objavljenih rezultata o djelovanju loksoribina na način da potiče kemorezistenciju tumorskih stanica svakako bi trebalo uključiti i naš stanični model metastatskih stanica tumora pluća, H1299. Međutim, to istraživanje je izvan okvira ovog rada.

Rezultati prikazani u ovom radu povoljni su u kontekstu liječenja tumora ne-malih stanica pluća jer sugeriraju da bi se kombinacijom liganda za receptor TLR7 i kemoterapeutika postigao bolji odgovor na kemoterapiju. Sljedeći korak bio bi ispitati utjecaj združene terapije ligandima i citostaticima na stanice H1299 u uvjetima prekomjerne ekspresije i down-regulacije receptora TLR7, kao i utjecaj združene terapije na zdrave stanice epitela pluća.

## 6. Zaključak

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati razinu ekspresije gena i proteina TLR7 metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (RT-qPCR) i westernskom metodom detekcije proteina te istražiti MTT testom kako u *in vitro* uvjetima stanice metastatskog tumora pluća (H1299) odgovaraju na združenu terapiju citostaticima (cisplatina, karboplatina i paklitaksel) i sintetskim ligandima za receptor TLR7 (resiquimod i imiquimod), u uvjetima bazalne ekspresije gena *TLR7*. Zaključujemo:

- 1) Stanice metastatskog tumora pluća H1299 eksprimiraju receptor TLR7 kako na mRNA, tako i na proteinskoj razini
- 2) Određena je IC50 vrijednost utjecaja citostatika cisplatine, karboplatine i paklitaksela na stanice H1299 i ona je iznosila 29,63 - 39,61  $\mu\text{M}$  za cisplatinu, 77,05 - 97,34  $\mu\text{M}$  za karboplatinu i 2,574 - 3,313 nM za paklitaksel
- 3) Imiquimod pokazuje citotoksičan učinak na stanice H1299 pri povećanim koncentracijama (5 i 15  $\mu\text{g/mL}$ )
- 4) Združena terapija imiquimodom i citostaticima (cisplatina i paklitaksel) statistički značajno smanjuje preživljenje stanica H1299 u odnosu na tretman samo citostatikom
- 5) Resiquimod nema citotoksičan ni citoproliferativan učinak na stanice i u kombinaciji s citostaticima ne utječe značajnije u odnosu na sam citostatik na preživljenje stanica H1299, osim u kombinaciji s paklitakselom pri 15  $\mu\text{M}$  koncentraciji

Dobiveni rezultati u skladu su s postavljenom hipotezom da stanice H1299 eksprimiraju funkcionalni protein TLR7 i da bi njegova kostimulacija s poznatim kemoterapeuticima, u uvjetima bazalne ekspresije, mijenjala preživljenje testiranih stanica.

## 7. Literatura

Aderem, A., and Ulevitch, R. J. (2000) 'Toll-like receptors in the induction of the innate immune response', *Nature*, 406(6797), pp. 782–787. doi:10.1038/35021228

Akopyan, G. and Bonavida, B. (2006) 'Understanding tobacco smoke carcinogen NNK and lung tumorigenesis (Review)', *International Journal of Oncology*, 29(4), pp. 745-52. doi: 10.3892/ijo.29.4.745

Almomen, A., Jarboe, E. A., Dodson, M. K., Peterson, C. M., Owen S. C., Janát-Amsbury, M. M. (2016) 'Imiquimod Induces Apoptosis in Human Endometrial Cancer Cells In vitro and Prevents Tumor Progression In vivo', *Pharmaceutical Research*. Pharmaceutical Research, 33(9), pp. 2209–2217. doi: 10.1007/s11095-016-1957-6.

American Cancer Society (2019) 'Facts & Figures 2019', *American Cancer Society*, p. 76. Available at: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2019/cancer-facts-and-figures-2019.pdf>.

Anand, S. S., Singh, H. and Dash, A. K. (2009) 'Clinical applications of PET and PET-CT', *Medical Journal Armed Forces India*. Director General, Armed Forces Medical Services, 65(4), pp. 353–358. doi: 10.1016/S0377-1237(09)80099-3.

Applequist, S. E. (2002) 'Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines', *International Immunology*, 14(9), pp. 1065–1074. doi: 10.1093/intimm/14.9.1065

Barta, J.A., Powell, C.A. and Wisnivesky, J.P., (2019) 'Global Epidemiology of Lung Cancer', *Annals of Global Health*, 85(1), p.8. doi: <http://doi.org/10.5334/aogh.2419>

Bhatia, R., Lopipero, P. and Smith, A. (1998) 'Diesel Exhaust Exposure and Lung Cancer', *Epidemiology*, 9(1), pp. 84-91.

Bodner S. M., Minna J. D., Jensen S. M., D'Amico D., Carbone D., Mitsudomi T., Fedorko J., Buchhagen D. L., Nau M. M., Gazdar A. F. (1992) 'Expression Of Mutant p53 Proteins In Lung Cancer Correlates With The Class Of p53 Gene Mutation', *Oncogene*, 7, pp. 743–749.

Cai, W., Li, X., Su, C., Fan, L., Zheng, L., Fei, K., Zhou, C., Manegold, C., Schmid-Bindert, G. (2013) 'ROS1 fusions in Chinese patients with non-small-cell lung cancer', *Annals of*

*Oncology*, 24(7), pp. 1822–1827. doi: 10.1093/annonc/mdt071.

Chatterjee, S., Crozet, L., Damotte, D., Iribarren, K., Schramm, C., Alifano, M., Lupo, A., Cherfils-Vicini, J., Goc, J., Katsahian, S., Younes, M., Dieu-Nosjean, M. C., Fridman, W. H., Sautès-Fridman, C., Cremer, I. (2014) ‘TLR7 promotes tumor progression, chemotherapy resistance, and poor clinical outcomes in non-small cell lung cancer’, *Cancer Research*, 74(18), pp. 5008–5018. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2698.

Cherfils-Vicini, J., Platonova, S., Gillard, M., Laurans, L., Validire, P., Caliandro, R., Magdeleinat, P., Mami-Chouaib, F., Dieu-Nosjean, M. C., Fridman, W. H., Damotte, D., Sautès-Fridman, C., Cremer, I. (2010) ‘Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance’, *Journal of Clinical Investigation*, 120(4), pp. 1285–1297. doi: 10.1172/JCI36551.

Courbet, A., Bec, N., Constant, C., Larroque, C., Pugniere, M., Messaoudi, S. E., Zghaib, Z., Khier, S., Deleuze-Masquefa, C., Gattacceca, F. (2017) ‘Imidazoquinoxaline anticancer derivatives and imiquimod interact with tubulin: Characterization of molecular microtubule inhibiting mechanisms in correlation with cytotoxicity’, *PLoS ONE*, 12(8), pp. 1–21. doi: 10.1371/journal.pone.0182022.

Dela Cruz, C. S., Tanoue, L. T. and Matthay, R. A. (2011) ‘Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention’, *Clinics in Chest Medicine*, 32(4), pp. 605–644. doi: 10.1016/j.ccm.2011.09.001.

Dajon, M., Iribarren, K. and Cremer, I. (2015) ‘Dual roles of TLR7 in the lung cancer microenvironment’, *OncoImmunology*, 4(3), pp. 1–3. doi: 10.4161/2162402X.2014.991615.

Denissenko, M. F., Pao, A., Tang, M. S., Pfeifer, G. P. (1996) ‘Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53’, *Science*, 274(5286), pp. 430–432. doi: 10.1126/science.274.5286.430.

Driscoll, T., Nelson, D. I., Steenland, K., Leigh, J., Concha-Barrientos, M., Fingerhut, M., Prüss-Üstün, A. (2005) ‘The global burden of disease due to occupational carcinogens’, *American Journal of Industrial Medicine*, 48(6), pp. 419–431. doi: 10.1002/ajim.20209.

Drobits, B., Holcman, M., Amberg, N., Swiecki, M., Grundtner, R., Hammer, M., Colonna, M., Sibilina, M. (2012) ‘Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells’, *Journal of Clinical Investigation*,

122(2), pp.5 75-585. 122(2). doi: 10.1172/JCI61034DS1.

Droemann, D., Albrecht, D., Gerdes, J., Ulmer, A. J., Branscheid, D., Vollmer, E., Dalhoff, K., Zabel, P., Goldmann, T. (2005) 'Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9', *Respiratory Research*, 6, pp. 1–10. doi: 10.1186/1465-9921-6-1.

Ewald, S. E., Engel, A., Lee, J., Wang, M., Bogyo, M., Barton, G. M. (2011) 'Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase', *Journal of Experimental Medicine*, 208(4), pp. 643–651. doi: 10.1084/jem.20100682.

Fan, J. Fong, T., Xia, Z., Zhang, J., Luo, P. (2018) 'The efficacy and safety of ALK inhibitors in the treatment of ALK-positive non-small cell lung cancer: A network meta-analysis', *Cancer Medicine*, 7(10), pp. 4993–5005. doi: 10.1002/cam4.1768.

Feng, S. H. and Yang, S. T. (2019) 'The new 8th tnm staging system of lung cancer and its potential imaging interpretation pitfalls and limitations with ct image demonstrations', *Diagnostic and Interventional Radiology*, 25(4), pp. 270–279. doi: 10.5152/dir.2019.18458.

Gantier, M. P., Tong, S., Behlke, M. A., Xu, D., Phipps, S., Foster, P. S., Williams, B. R. G. (2008) 'TLR7 Is Involved in Sequence-Specific Sensing of Single-Stranded RNAs in Human Macrophages', *The Journal of Immunology*, 180(4), pp. 2117–2124. doi: 10.4049/jimmunol.180.4.2117.

Grivennikov, S. I., Greten, F. R. and Karin, M. (2010) 'Immunity, Inflammation, and Cancer', *Cell*. Elsevier Inc., 140(6), pp. 883–899. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.025.

Hall, J. and Guyton, A. (2006). 'Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology', 11th ed., Saunders/Elsevier, Philadelphia

Hammerschmidt, S. and Wirtz, H. (2009) 'Lung Cancer Current Diagnosis and Treatment', *Deutsches Aerzteblatt Online*, 106(49), pp. 809-20. doi: 10.3238/arztebl.2009.0809

Han, J. H., Lee, J., Jeon, S. J., Choi, E. S., Cho, S. D., Kim, B. Y., Kim, D. J., Park, J. H., Park, J. H. (2013) 'In vitro and in vivo growth inhibition of prostate cancer by the small molecule imiquimod', *International Journal of Oncology*, 42(6), pp. 2087–2093. doi: 10.3892/ijo.2013.1898.

Han, J. H., Park, S. Y., Kim, J. B., Cho, S. D., Kim, B., Kim, B. Y., Kang, M. J., Kim, D. J.,

Park, J. H., Park, J. H. (2013) 'TLR7 Expression is Decreased During Tumour Progression in Transgenic Adenocarcinoma of Mouse Prostate Mice and Its Activation Inhibits Growth of Prostate Cancer Cells', *American Journal of Reproductive Immunology*, 70(4), pp. 317–326. doi: 10.1111/aji.12146.

Harris, J. E., Thun, M. J., Mondul, A. M., Calle, E. E. (2004) 'Cigarette tar yields in relation to mortality from lung cancer in the cancer prevention study II prospective cohort, 1982-8', *British Medical Journal*, 328(7431), pp. 72–76. doi: 10.1136/bmj.37936.585382.44.

He, W., Liu, Q., Wang, L., Chen, W., Li, N., Cao, X. (2007) 'TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance', *Molecular Immunology*, 44(11), pp. 2850–2859. doi: 10.1016/j.molimm.2007.01.022.

Hecht, S., Carmella, S., Murphy, S., Akerkar, S., Brunnemann, K. and Hoffmann, D. (1993) 'A Tobacco-Specific Lung Carcinogen in the Urine of Men Exposed to Cigarette Smoke', *New England Journal of Medicine*, 329(21), pp.1543-1546. doi: 10.1056/NEJM199311183292105

Hipp, M. M., Shepherd, D., Booth, S., Waithe, D., Reis e Sousa, C., Cerundolo, V. (2015) 'The Processed Amino-Terminal Fragment of Human TLR7 Acts as a Chaperone To Direct Human TLR7 into Endosomes', *The Journal of Immunology*, 194(11), pp. 5417–5425. doi: 10.4049/jimmunol.1402703.

Huang, B., Zhao, J., Li, H., He, K. L., Chen, Y., Chen, S. H., Mayer, L., Unkeless, J. C., Xiong, H. (2005) 'Erratum: Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance (Cancer Research (June 15, 2005) 65 (5009-5014))', *Cancer Research*, 65(19), p. 9108. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-correction.

Janerich, D., Thompson, W., Varela, L., Greenwald, P., Chorost, S., Tucci, C., Zaman, M., Melamed, M., Kiely, M. and McKneally, M. (1990) 'Lung Cancer and Exposure to Tobacco Smoke in the Household', *New England Journal of Medicine*, 323(10), pp.632-636. doi: 10.1056/NEJM199009063231003

Jiang, J., Dong, L., Qin, B., Shi, H., Guo, X., Wang, Y. (2016) 'Decreased expression of TLR7 in gastric cancer tissues and the effects of TLR7 activation on gastric cancer cells', *Oncology Letters*, 12(1), pp. 631–636. doi: 10.3892/ol.2016.4617.

Jonsson, H. H. and Gulcher, J. R. (2004) 'Familial Risk of Lung Carcinoma', *Journal of American Medical Association*, 292(24), pp. 2977–2984.

Kalemkerian, G.P., Akerley, W., Bogner, P., Borghaei, H., Chow, L., Downey, R. J., Gandhi, L., Ganti, A. K. P., Govindan, R., Grecula, J. C., Hayman, J., Suk Heist, R., Horn, L., Jahan, T., Koczywas, M., Loo Jr, B. W., Merritt, R. E., Moran, C. A., Niell, H. B., O'Malley, J., Patel, J. D. (2013) 'Small Lung Cancer Clinical Practice Guidelines in Oncology', *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 11(1), pp. 78-89.

Kang, J. U., Koo, S. H., Kwon, K. C., Park, J. W., Shin, S. Y., Kim, J. M., Jung, S. S. (2007) 'High Frequency of Genetic Alterations in Non-small Cell Lung Cancer Detected by Multi-target Fluorescence In Situ Hybridization', *Journal of Korean Medical Science*, 22(Suppl), pp. 47-51. doi: 10.3346/jkms.2007.22.s.s47.

Kanno, A., Yamamoto, C., Onji, M., Fukui, R., Saitoh, S., Motoi, Y., Shibata, T., Matsumoto, F., Muta, T., Miyake, K. (2013) 'Essential role for Toll-like receptor 7 (TLR7)-unique cysteines in an intramolecular disulfide bond, proteolytic cleavage and RNA sensing', *International Immunology*, 25(7), pp. 413–422. doi: 10.1093/intimm/dxt007.

Kanwal, M., Ding, X. J. and Cao, Y. (2017) 'Familial risk for lung cancer', *Oncology Letters*, 13(2), pp. 535–542. doi: 10.3892/ol.2016.5518.

Kawasaki, T. and Kawai, T. (2014) 'Toll-like receptor signaling pathways', *Frontiers in Immunology*, 5(SEP), pp. 1–9. doi: 10.3389/fimmu.2014.00461.

Kettunen, E., Salmenkivi, K., Vuopala, K., Toljamo, T., Kuosma, E., Norppa, H., Knuutila, S., Kaleva, S., Huuskonen, M. S., Anttila, S. (2006) 'Copy number gains on 5p15, 6p11-q11, 7p12, and 8q24 are rare in sputum cells of individuals at high risk of lung cancer', *Lung Cancer*, 54(2), pp. 169–176. doi: 10.1016/j.lungcan.2006.07.009.

Khuder, S. A. (2001) 'Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: A meta-analysis', *Lung Cancer*, 31(2–3), pp. 139–148. doi: 10.1016/S0169-5002(00)00181-1.

Kim, Y. M., Brinkmann, M. M., Paquet, M. E., Ploegh, H. L. (2008) 'UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes', *Nature*, 452(7184), pp. 234–238. doi: 10.1038/nature06726.



Kobold, S., Wiedemann, G., Rothenfußer, S., Endres, S. (2014) 'Modes of action of TLR7 agonists in cancer therapy', *Immunotherapy*, 6(10), pp. 1085–1095. doi: 10.2217/imt.14.75.

Krawczyk, P., Kowalski, D. M., Ramlau, R., Kalinka-Warzocha, E., Winiarczyk, K., Stencel, K., Powrózek, T., Reszka, K., Wojas-Krawczyk, K., Bryl, M., Wójcik-Superczyńska, M., Głogowski, M., Barinow-Wojewódzki, A., Milanowski, J., Krzakowski, M., (2017) 'Comparison of the effectiveness of erlotinib, gefitinib, and afatinib for treatment of non-small cell lung cancer in patients with common and rare EGFR gene mutations', *Oncology Letters*, 13(6), pp. 4433–4444. doi: 10.3892/ol.2017.5980.

Lee, J., Wu, C. C. N., Lee, K. J., Chuang, T. H., Katakura, K., Liu, Y. T., Chan, M., Tawatao, R., Chung, M., Shen, C., Cottam, H. B., Lai, M. M. C., Raz, E., Carson, D. A. (2006) 'Activation of anti-hepatitis C virus responses via Toll-like receptor 7', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(6), pp. 1828–1833. doi: 10.1073/pnas.0510801103.

Lester, R. T., Yao, X. D., Ball, T. B., McKinnon, L. R., Kaul, R., Wachihi, C., Jaoko, W., Plummer, F. A., Rosenthal, K. L. (2008) 'Toll-like receptor expression and responsiveness are increased in viraemic HIV-1 infection', *Aids*, 22(6), pp. 685–694. doi: 10.1097/QAD.0b013e3282f4de35.

Li, Z. J., Sohn, K. C., Choi, D. K., Shi, G., Hong, D., Lee, H. E., Whang, K. U., Lee, Y. H., Im, M., Lee, Y., Seo, Y. J., Kim, C. D., Lee, J. H. (2013) 'Roles of TLR7 in Activation of NF-κB Signaling of Keratinocytes by Imiquimod', *PLoS ONE*, 8(10), pp. 4–11. doi: 10.1371/journal.pone.0077159.

Lin, D. L. and Chang, C. (1996) 'p53 is a mediator for radiation-repressed human TR2 orphan receptor expression in MCF-7 cells, a new pathway from tumor suppressor to member of the steroid receptor superfamily', *Journal of Biological Chemistry*, 271(25), pp. 14649–14652. doi: 10.1074/jbc.271.25.14649.

Lipsett, M. and Campleman, S. (1999) 'Occupational exposure to diesel exhaust and lung cancer: A meta-analysis', *American Journal of Public Health*, 89(7), pp. 1009–1017. doi: 10.2105/AJPH.89.7.1009.

Littman, A. J., Jackson, L. A. and Vaughan, T. L. (2005) 'Chlamydia pneumoniae and lung cancer: Epidemiologic evidence', *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 14(4),

pp. 773–778. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-04-0599.

Lu, Y. J., Dong, X. Y., Shipley, J., Zhang, R. G., Cheng, S. J. (1999) ‘Chromosome 3 imbalances are the most frequent aberration found in non-small cell lung carcinoma’, *Lung Cancer*, 23(1), pp. 61–66. doi: 10.1016/S0169-5002(98)00093-2.

Maeda, H., Matsumura, A., Kawabata, T., Suito, T., Kawashima, O., Watanabe, T., Okabayashi, K., Kubota, I. (2012) ‘Adenosquamous carcinoma of the lung: Surgical results as compared with squamous cell and adenocarcinoma cases’, *European Journal of Cardiothoracic Surgery*, 41(2), pp. 357–361. doi: 10.1016/j.ejcts.2011.05.050.

Maschalidi, S., Hässler, S., Blanc, F., Sepulveda, F. E., Tohme, M., Chignard, M., van Ender, P., Si-Tahar, M., Descamps, D., Manoury, B. (2012) ‘Asparagine Endopeptidase Controls Anti-Influenza Virus Immune Responses through TLR7 Activation’, *PLoS Pathogens*, 8(8). doi: 10.1371/journal.ppat.1002841.

McLean, A., Barnes, D. and Troy, L. (2018) ‘Diagnosing Lung Cancer: The Complexities of Obtaining a Tissue Diagnosis in the Era of Minimally Invasive and Personalised Medicine’, *Journal of Clinical Medicine*, 7(7), p. 163. doi: 10.3390/jcm7070163.

Medzhitov, R. and Janeway, C. A. (1997) ‘Innate immunity: Impact on the adaptive immune response’, *Current Opinion in Immunology*, 9(1), pp. 4–9. doi: 10.1016/S0952-7915(97)80152-5.

Micke, P., Faldum, A., Metz, T., Beeh, K. M., Bittinger, F., Hengstler, Jan G., Buhl, R. (2002) ‘Staging small cell lung cancer: Veterans Administration Lung Study Group versus International Association for the Study of Lung Cancer - What limits limited disease?’, *Lung Cancer*, 37(3), pp. 271–276. doi: 10.1016/S0169-5002(02)00072-7.

Moore, R. A., Edwards, J. E., Hopwood, J., Hicks, D. (2001) ‘Imiquimod for the treatment of genital warts: A quantitative systematic review’, *BMC Infectious Diseases*, 1(3). doi: 10.1186/1471-2334-1-3.

O’Neill, L. A. J. (2006) ‘How Toll-like receptors signal: What we know and what we don’t know’, *Current Opinion in Immunology*, 18(1), pp. 3–9. doi: 10.1016/j.coi.2005.11.012.

Ochi, A., Graffeo, C., Zambirinis, C., Rehman, A., Hackman, M., Fallon, N., Barilla, R., Henning, J., Jamal, M., Rao, R., Greco, S., Deutsch, M., Medina-Zea, M., Saeed, U. B, Ego

- Osuala, M., Hajdu, C., Miller, G. (2012) ‘Toll-like receptor 7 regulates pancreatic carcinogenesis in mice and humans’, *Journal of Clinical Investigation*, 122(11), pp. 4118–4129. doi: 10.1172/JCI63606DS1.
- Pecorino, L. (2012) ‘Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics’, 3rd ed., Oxford University Press, Oxford
- Pelosi, G., Barbareschi, M., Cavazza, A., Graziano, P., Rossi, G., Papotti, M., (2015) ‘Large cell carcinoma of the lung: A tumor in search of an author. A clinically oriented critical reappraisal’, *Lung Cancer*. Elsevier Ireland Ltd, 87(3), pp. 226–231. doi: 10.1016/j.lungcan.2015.01.008.
- Petes, C., Odoardi, N. and Gee, K. (2017) ‘The Toll for trafficking: Toll-like receptor 7 delivery to the endosome’, *Frontiers in Immunology*, 8(SEP), pp. 1–9. doi: 10.3389/fimmu.2017.01075.
- Pirkle, J., Flegal, K., Bernert, J., Brody, D., Etzel, R., Maurer, K. (1996) ‘Exposure of the US population to environmental tobacco smoke: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988 to 1991’, *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 275(16), pp.1233-1240. doi: 10.1001/jama.1996.03530400021033
- Pradere, J. P., Dapito, D. H. and Schwabe, R. F. (2014) ‘The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer’, *Oncogene*, 33(27), pp. 3485–3495. doi: 10.1038/onc.2013.302.
- Riely, G. J., Kris, M. G., Rosenbaum, D., Marks, J., Li, A., Chitale, D. A., Nafa, K., Riedel, E. R., Hsu, M., Pao, W., Miller, V. A., Ladanyi, M. (2008) ‘Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma’, *Clinical Cancer Research*, 14(18), pp. 5731–5734. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0646.
- Rodenhuis, S. and Slebos, R. J. C. (1992) ‘Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer’, *Cancer Research*, 52(9 SUPPL.). doi: 10.1016/0169-5002(93)90536-7.
- Rosso, Q. Del (2008) ‘Topical Imiquimod Therapy for Actinic Keratosis’, *Clinical\_Aesthetic*, 1(3), pp. 44–47.
- Ryberg, D., Hewer, A., Phillips, D. and Haugen, A. (1994) ‘Different susceptibility to smoking-induced DNA damage among male and female lung cancer patients’, *Cancer Research*, 54(22), pp. 5801–5803.

Salaun, B., Coste, I., Rissoan, M., Lebecque, S. J., Renno, T. (2006) 'TLR3 Can Directly Trigger Apoptosis in Human Cancer Cells', *The Journal of Immunology*, 176(8), pp. 4894–4901. doi: 10.4049/jimmunol.176.8.4894.

Schön, M. P. and Schön, M. (2007) 'Imiquimod: Mode of action', *British Journal of Dermatology*, 157(SUPPL. 2), pp. 8–13. doi: 10.1111/j.1365-2133.2007.08265.x.

Shi C. and Kehrl JH. (2008) 'MyD88 and Trif target Beclin 1 to trigger autophagy in macrophages', *Journal of Biological Chemistry* 283(48), pp. 33175–82. doi: 10.1074/jbc.M804478200

Skillrud, D. M., Offord, K. P. and Miller, D. W. (1986) 'Higher risk of lung cancer in chronic obstructive pulmonary disease. A prospective, matched, controlled study', *Annals of Internal Medicine*, 105(4), pp. 503–507. doi: 10.7326/0003-4819-105-4-503.

Slatore, C. G., Chien, J. W., Au, D.H., Satia, J. A., White, E. (2010) 'Lung cancer and hormone replacement therapy: Association in the vitamins and lifestyle study', *Journal of Clinical Oncology*, 28(9), pp. 1540–1546. doi: 10.1200/JCO.2009.25.9739.

Sun, S., Schiller, J. H. and Gazdar, A. F. (2007) 'Lung cancer in never smokers - A different disease', *Nature Reviews Cancer*, 7(10), pp. 778–790. doi: 10.1038/nrc2190.

Szeimies, R. M., Bichel, J., Ortonne, J. P., Stockfleth, E., Lee, J., Meng, T. C. (2008) 'A phase II dose-ranging study of topical resiquimod to treat actinic keratosis', *British Journal of Dermatology*, 159(1), pp. 205–210. doi: 10.1111/j.1365-2133.2008.08615.x.

Taioli, E. and Wynder, E. L. (1994) 'Re: Endocrine factors and adenocarcinoma of the lung in women', *Journal of the National Cancer Institute*, 86(11), pp. 869–870. doi: 10.1093/jnci/86.11.869.

Takahashi, K., Shibata, T., Akashi-Takamura, S., Kiyokawa, T., Wakabayashi, Y., Tanimura, N., Kobayashi, T., Matsumoto, F., Fukui, R., Kouro, T., Nagai, Y., Takatsu, K., Saitoh, S., Miyake, K. (2007) 'A protein associated with Toll-like receptor (TLR) 4 (PRAT4A) is required for TLR-dependent immune responses', *Journal of Experimental Medicine*, 204(12), pp. 2963–2976. doi: 10.1084/jem.20071132.

Tatematsu, M., Funami, K., Ishii, N., Seya, T., Obuse, C., Matsumoto, M., (2015) 'LRRC59 Regulates Trafficking of Nucleic Acid-Sensing TLRs from the Endoplasmic Reticulum via

Association with UNC93B1', *The Journal of Immunology*, 195(10), pp. 4933–4942. doi: 10.4049/jimmunol.1501305.

Tengroth, L., Millrud, C. R., Kvarnhammar, A. M., Georén, S. K., Latif, L., Cardell, L. O. (2014) 'Functional effects of Toll-Like Receptor (TLR)3, 7, 9, RIG-I and MDA-5 stimulation in nasal epithelial cells', *PLoS ONE*, 9(6), pp. 3–10. doi: 10.1371/journal.pone.0098239.

Toh, C. K., Toh, C. K., Gao, F., Lim, W. T., Leong, S. S., Fong, K. W., Yap, S. P., Hsu, A. A. L., Eng, P., Koong, H. N., Thirugnanam, A., Tan, E. H. (2006) 'Never-smokers with lung cancer: Epidemiologic evidence of a distinct disease entity', *Journal of Clinical Oncology*, 24(15), pp. 2245–2251. doi: 10.1200/JCO.2005.04.8033.

Tomai, M. A., Miller, R. L., Lipson, K. E., Kieper, W. C., Zarraga, I. E., Vasilakos, J. P. (2007) 'Resiquimod and other immune response modifiers as vaccine adjuvants', *Expert Review of Vaccines*, 6(5), pp. 835–847. doi: 10.1586/14760584.6.5.835.

Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H. M., Beasley, M. B., Chirieac, L. R., Dacic, S., Duhig, E., Flieder, D. B., Geisinger, K., Hirsch, F. R., Ishikawa, Y., Kerr, K. M., Noguchi, M., Pelosi, G., Powell, C. A., Tsao, M. S., Wistuba, I. (2015) 'The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances since the 2004 Classification', *Journal of Thoracic Oncology*. International Association for the Study of Lung Cancer, 10(9), pp. 1243–1260. doi: 10.1097/JTO.0000000000000630.

Villamón, E., González-Fernández, J., Such, E., Cervera, J. V., Gozalbo, D., Luisa Gil, M. (2018) 'Imiquimod inhibits growth and induces differentiation of myeloid leukemia cell lines', *Cancer Cell International*. BioMed Central, 18(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s12935-018-0515-1.

Wang, R., Hu, H., Pan, Y., Li, Y., Ye, T., Li, C., Luo, X., Wang, L., Li, H., Zhang, Y., Li, F., Lu, Y., Lu, Q., Xu, J., Garfield, D., Shen, L., Ji, H., Pao, W., Sun, Y., Chen, H., (2012) 'RET fusions define a unique molecular and clinicopathologic subtype of non-small-cell lung cancer', *Journal of Clinical Oncology*, 30(35), pp. 4352–4359. doi: 10.1200/JCO.2012.44.1477.

Wolf, I. H., Smolle, J., Binder, B., Cerroni, L., Richtig, E., Kerl, H. (2003) 'Topical imiquimod in the treatment of metastatic melanoma to skin', *Archives of Dermatology*,

139(3), pp. 273–276. doi: 10.1001/archderm.139.3.273.

Wu, J. J., Huang, D. B. and Tyring, S. K. (2004) ‘Resiquimod: A new immune response modifier with potential as a vaccine adjuvant for Th1 immune responses’, *Antiviral Research*, 64(2), pp. 79–83. doi: 10.1016/j.antiviral.2004.07.002.

Yang, Y., Liu, B., Dai, J., Srivastava, P. K., Zammit, D. J., Lefrançois, L., Li, Z. (2007) ‘Heat Shock Protein gp96 Is a Master Chaperone for Toll-like Receptors and Is Important in the Innate Function of Macrophages’, *Immunity*, 26(2), pp. 215–226. doi: 10.1016/j.immuni.2006.12.005.

Ye, J., Findeis-Hosey, J. J., Yang, Q., McMahon, L. A., Yao, J. L., Li, F., Xu, H. (2011) ‘Combination of napsin A and TTF-1 immunohistochemistry helps in differentiating primary lung adenocarcinoma from metastatic carcinoma in the lung’, *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*, 19(4), pp. 313–317. doi: 10.1097/PAI.0b013e318205b059.

Yu, H., Boyle, T. A., Zhou, C., Rimm, D. L., Hirsch, F. R. (2016) ‘PD-L1 expression in lung cancer’, *Journal of Thoracic Oncology*. Elsevier Ltd, 11(7), pp. 964–975. doi: 10.1016/j.jtho.2016.04.014.

Zappa, C. and Mousa, S. A. (2016) ‘Non-small cell lung cancer: Current treatment and future advances’, *Translational Lung Cancer Research*, 5(3), pp. 288–300. doi: 10.21037/tlcr.2016.06.07.

Internetski izvori:

<https://zdravstvo.gov.hr/izvjesce-o-provedenom-savjetovanju-o-nacrtu-nacionalnog-programa-za-probir-i-rano-otkrivanje-raka-pluca-2019-2023/3579> (Pristupljeno 21. 12. 2019.)

<https://www.invivogen.com/tlr7-8-base-analog> (Pristupljeno 3. 1. 2020.)

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Imiquimod> (Pristupljeno 27. 12. 2019.)

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Resiquimod#section=2D-Structure> (Pristupljeno 27. 12. 2019.)

## 8. Životopis

### Osobni podaci:

**Ime i prezime:** Ana Vukić

**Datum rođenja:** 25.9.1995.

**E-mail:** avukic@stud.biol.pmf.hr

### Obrazovanje:

2017. – 2020. Diplomski sveučilišni studij molekularne biologije

Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet,  
Zagreb (Hrvatska)

2014. – 2017. Preddiplomski sveučilišni studij molekularne biologije

Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet,  
Zagreb (Hrvatska)

### Iskustvo:

svibanj 2019. – siječanj 2020. Izrada diplomskog rada na Institutu Ruđer Bošković

Zavod za molekularnu medicinu

Laboratorij za naprednu genomiku

Tema: *In vitro* testiranje združenog djelovanja

kemoterapeutika i sintetskih liganada za receptor TLR7 u  
staničnoj liniji H1299

Mentorice: dr. sc. Jelena Knežević, viša znanstvena suradnica  
prof. dr. sc. Nada Oršolić

ožujak 2018. – svibanj 2018. Laboratorijska stručna praksa

Prirodoslovno-matematički fakultet

Zavod za molekularnu biologiju

Voditeljica: izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

listopad 2015. – siječanj 2016. Demonstratorica (kolegij Zoologija)

Prirodoslovno-matematički fakultet

Zoologijski zavod

### **Ostalo**

2016. – sudjelovanje na manifestaciji „Noć biologije“, PMF