

# Uloga polimorfizma gena TLR5 u nastanku karcinoma pluća

---

**Drpa, Gordana**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2022**

*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:217:458198>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-09**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Gordana Drpa

**Uloga polimorfizma gena *TLR5*  
u nastanku karcinoma pluća**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Gordana Drpa

**Uloga polimorfizma gena *TLR5*  
u nastanku karcinoma pluća**

DOKTORSKI RAD

Mentori: Jelena Knežević, Suzana Kukulj

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Gordana Drpa

**The role of *TLR5* polymorphism  
in lung cancer development**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors: Jelena Knežević, Suzana Kukulj

Zagreb, 2022

„Ovaj doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za naprednu genomiku Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom doc. dr. sc. Jelene Knežević kao mentora i izv. prof. dr. sc. Suzane Kukulj kao komentora, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.”

## INFORMACIJE O MENTORICI

Viša znanstvena suradnica dr. sc. Jelena Knežević diplomirala je 1995. godine na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Sveučilišta u Osijeku. Magistrirala je 2004. godine na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a 2008. godine doktorirala je na istom fakultetu.

Zaposlena je 2001. godine kao znanstveni novak na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a od 2002. godine radi na Institutu Ruđer Bošković, Zavod za molekularnu medicinu u Zagrebu. Po zapošljavanju na Institutu Ruđer Bošković radila je na problematici istraživanja genske osnove monogenetskih bolesti, a tijekom doktorata i nakon toga usmjerena je na istraživanje genetičke podloge razvoja malignih bolesti u kontekstu poremećenog imunološkog odgovora.

Izabrana je u znanstveno zvanje znanstvenog suradnika 2011. godine, a 2018. godine u znanstveno zvanje višeg znanstvenog suradnika, u području biomedicine i zdravstva, polje temeljne medicinske znanosti. Izabrana je u naslovno znanstveno-nastavno zvanje docenta 2020. godine na Fakultetu za dentalnu medicinu i zdravstvo Sveučilišta u Osijeku.

Voditeljica je dvaju znanstvenih projekata financiranih od Hrvatske zaklade za znanost i međudržavnog projekta s Njemačkom financiranog od Ministarstva znanosti i obrazovanja i DAAD-a (njem. *Deutscher Akademischer Austauschdienst*). Autorica je 30 znanstvenih radova i mentorica pet doktorskih disertacija i pet diplomskih radova.

## INFORMACIJE O KOMENTORICI

Viša znanstvena suradnica dr. sc. Suzana Kukulj diplomirala je 1984. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Magistrirala je 1994. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a doktorirala 2004. godine na istom fakultetu.

Od 1984. do 1992. godine radila je kao liječnik opće medicine u Domu zdravlja u Posušju, Bosna i Hercegovina. Istovremeno je od 1988. do 1992. bila na specijalizaciji iz pneumoftizeologije u Kliničkom bolničkom centru Split i Kliničkom bolničkom centru Zagreb. Nakon položenog specijalističkog ispita zapošljava se u Klinici za plućne bolesti Jordanovac, gdje radi od 1992. godine do danas. Stječe supspecijalizaciju iz pulmologije i naziv primarijus 2005. godine.

Nakon zapošljavanja u Klinici za plućne bolesti radila je u Kabinetu za bronhoskopiju do 1995. godine, a nakon toga na Odjelu za alergije do 2010. godine. Od 2010. godine do danas radi na Zavodu za tumore pluća i sredoprsja, Odjel za tumore sredoprsja, a od 2011. je voditeljica Odjela za tumore sredoprsja.

Izabrana je u znanstveno zvanje višeg znanstvenog suradnika 2006. godine, u području biomedicine i zdravstva, polje medicinske znanosti. Na Medicinskom fakultetu, Sveučilišta u Mostaru, Bosna i Hercegovina, izabrana je u znanstveno-nastavno zvanje docenta 2008. godine, izvanrednog profesora 2014. godine i redovitog profesora 2021. godine, a na Medicinskom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu, u znanstveno-nastavno zvanje docenta 2013. godine i izvanrednog profesora 2021. godine.

Predaje na dodiplomskoj nastavi Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Mostaru te na dodiplomskoj i poslijediplomskoj nastavi Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Suradnica je na dva projekta Ministarstva znanosti i obrazovanja, a od 2011. sudjelovala je u sedam kliničkih istraživanja. Autorica je ili koautorica 50 publikacija, od kojih 20 citiranih u bazi *Current Contents* i mentorica dvije doktorske disertacije i dva obranjena diplomatska rada.

## ZAHVALE

- Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Jeleni Knežević na stručnoj pomoći tijekom poslijediplomskog studija i prilikom izrade doktorskog rada te na prilici da proniknem u jedno sasvim novo područje znanosti.
- Zahvaljujem drugoj mentorici izv. prof. dr. sc. Suzani Kukulj na savjetima i poticanju u znanstvenoj aktivnosti.
- Zahvaljujem prof. dr. sc. Dunji Leljak Levanić što je uvijek bila dostupna i spremna pomoći čime mi je uvelike olakšala snalaženje na studiju.
- Zahvaljujem Aleksandri Žmegač-Horvat, prof. na lekturi sažetka na engleskom.
- Zahvaljujem gospođi Ivani Majer iz Središnje medicinske knjižnice Medicinskog fakulteta na stručnim savjetima o uređivanju literaturnih navoda.
- Zahvaljujem gospođi Mariji Bićanić iz Ureda za poslijediplomski studij Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, čije su mi upute bile od velike pomoći za vrijeme cijelog studija.
- Posebna zahvala namijenjena je Maji Šutić i Jurici Baranašiću, djelatnicima Laboratorija za naprednu genomiku Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković, koji su svojim predanim radom u znatnoj mjeri doprinijeli ostvarenju ovog doktorskog rada.
- Zahvaljujem svojoj obitelji na iskazanoj ljubavi, podršci, strpljenju i razumijevanju.
- Ovaj rad posvećujem svojim roditeljima.



## ULOGA POLIMORFIZMA GENA *TLR5* U NASTANKU KARCINOMA PLUĆA

GORDANA DRPA

Institut Ruđer Bošković

Otkriće receptora TLR dovelo je do novih spoznaja o imunosnim procesima u stanicama. Ovim receptorima, kao i polimorfizmima njihovih gena, pripisuje se važna uloga u nastanku mnoštva bolesti, uključujući karcinome. Prema dostupnoj literaturi, u ovom je radu prvi put ispitivana uloga polimorfizma rs2072493/N592S u genu *TLR5* kod karcinoma pluća. Ciljevi rada bili su funkcionalna procjena varijante i identifikacija proliferacijskog kapaciteta stanica s varijantom. U radu su korištene stanične linije zdravih pluća i karcinoma pluća u koje su uneseni plazmidi ili adenovirusni konstrukti s divljim tipom ili varijantom N592S. Tako dobivene stanice stimulirane su flagelinom. U stanicama je potom izmjerena sposobnost prijenosa signala i razina ekspresije specifičnih proteina, a ispitan je i utjecaj varijante na staničnu pokretljivost i vijabilnost. Utvrđeno je da je varijanta N592S funkcionalna te da je porast aktivnosti NF- $\kappa$ B nakon stimulacije flagelinom u stanicama s varijantom slabiji. Na proteinskoj razini nađene su razlike u aktivnosti nizvodnih signalnih molekula u ovisnosti o prisustvu varijante kao i značajno manja pokretljivost i vijabilnost stanica s prekomjernom ekspresijom varijante u odnosu na divlji tip gena *TLR5*.

(131 stranica, 45 slika, 9 tablica, 176 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

**Ključne riječi:** karcinom pluća; prirođena imunost; polimorfizam gena; Tollu slični receptori; rs2072493/N592S varijanta

**Mentori:** 1. doc. dr. sc. Jelena Knežević, Institut Ruđer Bošković  
2. izv. prof. dr. sc. Suzana Kukulj, Klinički bolnički centar Zagreb

**Ocjenjivači:** 1. prof. dr. sc. Nada Oršolić, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb  
2. izv. prof. dr. sc. Inga Urlić, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb  
3. akademik Miroslav Samaržija, Klinički bolnički centar Zagreb

**Zamjena:** izv. prof. dr. sc. Marko Jakopović, Klinički bolnički centar Zagreb

Tema rada prihvaćena je 10.5.2017.

## THE ROLE OF *TLR5* POLYMORPHISM IN LUNG CANCER DEVELOPMENT

GORDANA DRPA

Ruder Bošković Institute

The discovery of Toll-like receptors led to new insights into cellular immune processes. These receptors, as well as their genetic polymorphisms, are attributed an important role in the development of many diseases, including cancer. Based on the available literature, this is the first research into the role of the rs2072493/N592S polymorphism in the *TLR5* gene in lung cancer. The objectives of this work were a functional evaluation of the variant as well as the identification of the proliferative capacity of cells carrying the variant. Healthy lung and lung cancer cell lines with inserted plasmids or adenovirus constructs containing wild-type or the rs2072493/N592S variant were used in the research. Following the stimulation of the thus obtained cells with flagellin, the ability of signal transmission, specific protein expression, as well as cell viability and migration were measured in the cells. The N592S variant was found to be functional, and it was established that after stimulation with flagellin, the increase in NF- $\kappa$ B activity in cells with the variant was lower. On the protein level, differences in the activity of downstream signaling molecules depending on the presence of the variant were observed, as well as a significantly lower mobility and viability of cells with the variant in comparison to wild-type *TLR5* gene.

(131 pages, 45 figures, 9 tables, 176 references, original in croatian)

**Keywords:** lung cancer; innate immunity; gene polymorphism; toll-like receptors; rs2072493/N592S variant

**Supervisors:** 1. *assistant professor Jelena Knežević, PhD, Ruđer Bošković Institute*  
2. *associate professor Suzana Kukulj, PhD, University Hospital Zagreb*

**Reviewers:** 1. *full professor tenure Nada Oršolić, PhD, Faculty of Science, Zagreb*  
2. *associate professor Inga Urlič, PhD, Faculty of Science, Zagreb*  
3. *academician Miroslav Samaržija, PhD, University Hospital Zagreb*

**Replacement:** *associate professor Marko Jakopović, PhD, University Hospital Zagreb*

Thesis accepted: May, 10th, 2017

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b>	1
1.1. Tema doktorskog rada	4
1.2. Svrha, cilj i opseg rada	4
1.3. Korištene metode	5
1.4. Polazna hipoteza	5
<b>2. LITERATURNI PREGLED</b>	6
<b>2.1. KARCINOM PLUĆA</b>	6
2.1.1. Etiologija i patofiziologija karcinoma pluća	7
2.1.2. Podjela karcinoma pluća	9
2.1.2.1. Histološka podjela karcinoma pluća	9
2.1.2.2. Klinička podjela karcinoma pluća	10
2.1.3. Dijagnostika karcinoma pluća	10
2.1.3.1. Slikovna dijagnostika	11
2.1.3.2. Invazivna dijagnostika	12
2.1.3.3. Metode obrade uzoraka	12
2.1.4. Metode liječenja karcinoma pluća	13
<b>2.2. IMUNOSNI SUSTAV</b>	15
2.2.1. Prirođena imunost	15
2.2.1.1. Mehanizmi prirodene imunosti u dišnom sustavu	19
2.2.2. Stečena imunost	20
2.2.3. Uloga imunosnog sustava u nastanku karcinoma	22
<b>2.3. KRONIČNA UPALA</b>	24
2.3.1. Uloga kronične upale u nastanku karcinoma	25
2.3.2. Citokini	26
2.3.2.1. Proupalni citokini	27
2.3.2.2. Protuupalni citokini	28
2.3.3. Kronična upala i karcinom pluća	28

2.4. TOLLU SLIČNI RECEPTORI	31
2.4.1. TLR1/2/6/10	35
2.4.2. TLR3	35
2.4.3. TLR4	35
2.4.4. TLR5	36
2.4.5. TLR7/8/9	36
2.4.6. Uloga TLR-a u nastanku karcinoma	37
2.4.7. Uloga TLR-a u nastanku karcinoma pluća	37
2.5. POLIMORFIZMI GENA	40
2.5.1. Mutacije	40
2.5.2. Polimorfizmi	41
2.5.2.1. SNP	42
2.5.2.2. Polimorfizmi gena za TLR-e	44
2.5.2.2.1. Polimorfizmi gena <i>TLR5</i>	44
2.5.2.2.2. Polimorfna varijanta N592S	45
2.5.2.2.3. Polimorfizmi gena za TLR-e kod karcinoma	46
<b>3. MATERIJALI I METODE</b>	<b>47</b>
3.1. MATERIJALI	47
3.1.1. Stanice	47
3.1.1.1. Humane stanice	47
3.1.1.2. Bakterijske stanice	47
3.1.2. Hranjivi mediji	48
3.1.3. Plazmidi	48
3.1.4. Komercijalni kompleti	48
3.1.5. Kemikalije i biološki materijal	49
3.1.6. Pribor	49
3.1.7. Aparatura	50
3.2. METODE	51
3.2.1. Uzgoj staničnih linija	51

3.2.2. Uzgoj i transformacija bakterija i izolacija plazmidne DNA	52
3.2.2.1. Izolacija plazmidne DNA pomoću komercijalnog kompleta <i>Plasmid Mini Kit</i>	54
3.2.2.2. Izolacija plazmidne DNA pomoću komercijalnog kompleta <i>Plasmid Midi Kit</i>	55
3.2.3. Transfekcija stanica i mjerenje signalnog potencijala varijante	57
3.2.3.1. <i>Dual-glo</i> luciferazni test	59
3.2.4. Izolacija proteina iz ispitivanih staničnih linija i analiza metodom <i>western blot</i>	61
3.2.5. Test ELISA	65
3.2.5.1. Test ELISA za provjeru endogene aktivnosti TLR5	66
3.2.5.2. Test ELISA za provjeru utjecaja infekcije adenovirusnim konstruktom na signalne puteve nizvodno od TLR5	67
3.2.6. Test vijabilnosti stanica	69
3.2.7. Migracijski test	72
3.2.8. Statistička obrada podataka	73
<b>4. REZULTATI</b>	74
4.1. Endogena aktivnost receptora TLR5 u staničnim linijama zdravih pluća i tumora pluća	74
4.1.1. Endogena aktivnost receptora TLR5 u staničnim linijama WI-38, H1299 i A549, određena testom ELISA	74
4.1.2. Endogena aktivnost receptora TLR5 u staničnim linijama WI-38 i A549, određena metodom <i>western blot</i>	77
4.1.3. Proliferacijski kapacitet staničnih linija WI-38 i A549, stimuliranih TLR5 ligandom flagelinom, određen testom MTT	79
4.2. Mjerenje signalnog potencijala varijante	81
4.2.1. Utjecaj varijante rs2072493/N592S gena <i>TLR5</i> na aktivaciju transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B, određen luciferaznim esejom	81
4.2.2. Utjecaj infekcije staničnih linija adenovirusnim konstruktom, na aktivaciju signalnih puteva nizvodno od receptora TLR5, određen testom ELISA	84

4.2.3. Utjecaj varijante rs2072493/N592S na aktivaciju molekula nizvodno od receptora TLR5, određen metodom <i>western blot</i>	85
4.2.3.1. Aktivacijski potencijal varijante rs2072493/N592S u staničnoj liniji WI-38	86
4.2.3.2. Aktivacijski potencijal varijante rs2072493/N592S u staničnoj liniji H1299	89
4.3. Proliferacijski kapacitet tumorskih stanica s divljim i mutiranim genom <i>TLR5</i>	92
4.4. Migracijski potencijal varijante	96
<b>5. RASPRAVA</b>	98
<b>6. ZAKLJUČCI</b>	107
<b>7. POPIS LITERATURE</b>	108
<b>8. PRILOZI</b>	123
8.1. PRILOG 1	123
8.1.1. Strane kratice upotrijebljene u tekstu	123
8.1.2. Hrvatske kratice upotrijebljene u tekstu	126
8.2. PRILOG 2	127
8.2.1. Mjerne jedinice	127
8.3. PRILOG 3	128
8.3.1. Kemijske formule	128
8.4. PRILOG 4	129
8.4.1 Priznanje vlasnicima za dozvolu uporabe slika koje podliježu autorskim pravima	129
<b>9. ŽIVOTOPIS AUTORA</b>	131

### 1. UVOD

Karcinom pluća najčešća je i najpogubnija maligna bolest u svijetu.<sup>1</sup> Smrtnost od ove bolesti približno odgovara ukupnoj smrtnosti od četiriju drugih vrsta karcinoma zajedno: karcinoma prostate, dojke, debelog crijeva i gušterače.<sup>2</sup> Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2018. godine, karcinom pluća jedina je maligna bolest koja se nalazi među deset vodećih uzroka smrtnosti u svijetu (Slika 1), a to se nije promijenilo do danas.<sup>3</sup> Unatoč mnogim kliničkim i bazičnim istraživanjima kao i novootkrivenim ciljanim lijekovima, petogodišnje preživljenje oboljelih od karcinoma pluća i dalje je vrlo loše.<sup>1</sup> Posljedica je to još uvijek nedovoljno razjašnjenih etioloških i patogenetskih mehanizama koji sudjeluju u nastanku ove kompleksne bolesti.



**Slika 1.** Deset vodećih uzroka smrtnosti u svijetu, prema podacima SZO-a iz 2018. godine  
Preuzeto i prilagođeno sa stranice: World Health Organization (WHO). The top 10 causes of death [Internet]. Geneva (Switzerland): World Health Organization; c2018 [pristupljeno 8. 11. 2020.].  
Dostupno na: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death><sup>3</sup>

Više od 80% karcinoma pluća događa se kod pušača. Uzročna povezanost raka pluća i pušenja cigareta nepobitno je dokazana brojnim epidemiološkim istraživanjima. No samo manji broj pušača razvija bolest, uz primjetan trend porasta broja oboljelih nepušača.<sup>2</sup> Sve je ovo dovelo do spoznaje da je karcinom pluća bolest kod koje, pored pušenja, važnu ulogu igraju i drugi, kako okolišni, tako i genetski čimbenici.<sup>4</sup>

Zahvaljujući prije svega tehnološkom napretku, krajem dvadesetog stoljeća značajno se povećao broj istraživanja različitih molekularnih mehanizama povezanih s nastankom raka pluća. Na moguću genetsku podlogu bolesti, pored do sada navedenih činjenica, upućivalo je još nekoliko kliničkih i epidemioloških opažanja. Jedno od važnijih bilo je da se bolest u nekim obiteljima javlja učestalije i u mlađoj dobi, neovisno o izloženosti duhanskom dimu.<sup>5,6,7</sup> Nadalje, uočena je veća pojavnost bolesti kod osoba koje su preboljele neku plućnu infekciju ili boluju od pridruženih plućnih bolesti.<sup>8,9</sup> U konačnici, utvrđeno je značajno povećanje broja oboljelih nepušača u nekim dijelovima svijeta.<sup>10,11</sup>

U molekularnim istraživanjima vezanima za nastanak raka pluća proučavani su brojni geni uključeni u mnoštvo signalnih puteva. Iako je za dobar dio njih utvrđeno da imaju ulogu u karcinogenezi, specifični geni koji bi bili odgovorni za povećanu osjetljivost na karcinogene, a time i povećani rizik za nastanak karcinoma, nisu nađeni.<sup>2,4</sup>

Posljednjih dvadeset godina intenzivno se istražuje utjecaj ekspresije Tollu sličnih receptora (engl. *Toll-like receptor*, TLR) na razvoj različitih patoloških stanja. Njihovo otkriće predstavlja značajnu prekretnicu u razumijevanju imunskih procesa u sisavaca. Naime, do početka ovoga stoljeća smatralo se da je prirodna imunost nespecifična. Međutim, otkrićem humanog homologa Toll receptora, ranije nađenog kod *Drosophila*, započinje era boljeg razumijevanja mehanizama prirodne imunosti.<sup>12,13</sup>

Danas se zna da su TLR-i transmembranski proteini koji prepoznaju osnovne građevne jedinice mikroorganizama, tzv. PAMPs (engl. *pathogen-associated molecular patterns*), ali i dijelove oštećenih vlastitih stanica, odnosno DAMPs (engl. *damage-associated molecular patterns*). Navedene strukture predstavljaju ligande pojedinih receptora.<sup>12,14</sup>

Vezanje specifičnog liganda za TLR pokreće vezanje adaptacijske molekule na unutarstaničnu podjedinicu receptora. Time započinje aktivacija signalnog puta koja dovodi do stvaranja upalnih citokina i tako pomaže u borbi protiv infekcije. Kod čovjeka je otkriveno deset Tollu sličnih receptora, nakon čega su za većinu otkriveni i specifični ligandi.<sup>12,15</sup>

Dosadašnja su istraživanja uloge TLR-a u nastanku i razvoju različitih karcinoma oprečna. Dok neka upućuju na povećanu ekspresiju pojedinih TLR-a u tumorskom tkivu, u drugima to nije potvrđeno. Unatoč tomu, brojni dokazi ukazuju na važnu ulogu ovih molekula u biologiji tumora.<sup>16,17,18</sup>



Receptor TLR5 član je TLR obitelji kodiran genom *TLR5*. Specifični ligand za TLR5 jest flagelin, protein koji je osnovna građevna tvar bakterijskog filameta. Nakon vezanja flagelina na vanjsku podjedinicu TLR5 dolazi do dimerizacije receptora. Time se pokreće unutarstanični signalni put, čiji je rezultat aktivacija NF- $\kappa$ B-a (engl. *nuclear factor-kappa B*), proteinskog kompleksa koji kontrolira transkripciju deoksiribonukleinske kiseline (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA), produkciju citokina i preživljavanje stanice u uvjetima infekcije.<sup>19,20</sup> Na osnovu dosadašnjih istraživanja opisana je moguća uloga TLR5 u nastanku upalnih bolesti crijeva i nekoliko vrsta raka, a svake se godine objavljuju novi radovi koji ukazuju na potencijalnu povezanost ovog receptora i s drugim bolestima.<sup>21,22,23,24</sup>

Nakon otkrića TLR-a porastao je interes za istraživanje polimorfizama gena *TLR* i njihova utjecaja na nastanak upalnih, imunosnih i malignih bolesti. Prva poveznica polimorfizma gena *TLR* i neke bolesti otkrivena je 2003. godine.<sup>25</sup> Tada je dokazana povećana sklonost legionarskoj bolesti kod nositelja polimorfizma stop kodona gena *TLR5* (A392T). Pretpostavljeno je da se slična poveznica s bolestima može naći i za druge polimorfizme, što je potaknulo daljnja istraživanja. Upravo zahvaljujući njima dokazana je povezanost genetskih promjena, kronične upale i nastanka karcinoma.<sup>26</sup>

Polimorfizmi gena danas se smatraju odgovornima za nastanak mnogih bolesti. Oni mogu dovesti do promjene funkcije gena i poremećaja prijenosa signala, a dugoročno i do maligne promjene. Za razliku od mutacija njihova učestalost u populaciji veća je od 1% i odgovorni su za razlike u našoj osjetljivosti na bolesti. Najviše istraživani polimorfizmi oni su s varijacijom u samo jednom nukleotidu, poznati pod engleskom kraticom SNP (engl. *single-nucleotide polymorphism*).<sup>26</sup>

Genskim mapiranjem u genu *TLR5* nađen je velik broj polimorfničkih varijanti, a neprekidno se otkrivaju nove. Prema trenutno dostupnim podacima u ovom je genu poznato 36 besmislenih varijanti i više od 500 varijanti krivog smisla. Većina ovih polimorfizama nije još istražena i ne zna se imaju li klinički značaj.<sup>27</sup>

I prije započinjanja našeg istraživanja dokazana je povezanost polimorfizama gena *TLR* s raznim upalnim i autoimunim bolestima te karcinomima.<sup>28,29</sup> No osim rada u kojemu su ispitivana dva polimorfizma gena *TLR4*, gotovo da nije bilo radova koji bi se odnosili na karcinom pluća. U navedenom istraživanju nađen je povećani rizik za razvoj karcinoma pluća kod nositelja rs4986791 varijante gena *TLR4*.<sup>30</sup>

Još uvijek, zaključno s početkom 2021. godine, nema literaturnih podataka o istraživanjima polimorfizama gena *TLR5* kod karcinoma pluća. Asocijacijsko istraživanje na kojemu se temelji ova doktorska disertacija pokazalo je, međutim, da postoji statistički značajna povezanost polimorfne promjene rs2072493/N592S sa sklonošću razvoju karcinoma pluća i kronične opstruktivne plućne bolesti.

### 1.1. TEMA DOKTORSKOG RADA

Tema ovog doktorskog rada procjena je povezanosti polimorfizma rs2072493/N592S gena *TLR5* i neimunskih procesa koji dovode do nastanka karcinoma pluća. Radi se o nasljednoj mutaciji u kodirajućoj regiji gena *TLR5* kod koje dolazi do izmjene dušične baze adenina u gvanin na nukleotidu 1775.<sup>29</sup> Otkrivena je 2003. godine i jedna je od češće istraživanih mutacija.<sup>25</sup> To je varijanta koja odgovara na aktivaciju flagelinom kao i divlji tip, no za razliku od divljeg tipa dovodi do smanjenog provođenja signala.<sup>31</sup>

Varijanta je do sada istraživana u svega nekoliko upalnih bolesti i karcinoma, a mogući klinički značaj nađen je za legionarsku bolest i kolorektalni karcinom. Kod kolorektalnog karcinoma dokazana je povezanost s ukupnim i specifičnim preživljenjem. Naime, nosioci varijante imali su statistički značajno manje preživljenje od oboljelih s divljim tipom gena.<sup>25,32</sup>

### 1.2. SVRHA, CILJ I OPSEG RADA

Svrha rada bila je istražiti povezanost polimorfizma rs2072493/N592S gena *TLR5* s nastankom i razvojem karcinoma pluća. Kako je dosadašnjim istraživanjima nađena poveznica između polimorfizama gena *TLR* i različitih malignih bolesti, zanimalo nas je hoćemo li to potvrditi i za ispitivanu varijantu kod karcinoma pluća.

Specifični ciljevi rada:

1. Funkcionalna procjena polimorfizma rs2072493/N592S gena *TLR5* mjerenjem sposobnosti prijenosa signala u zdravim i tumorskim epitelnim stanicama pluća
2. Identifikacija proliferacijskog kapaciteta zdravih i tumorskih stanica pluća koje nose polimorfizam rs2072493/N592S gena *TLR5*

Provedeno je usporedno ispitivanje na staničnim linijama karcinoma pluća A549 i H1299 i staničnoj liniji fibroblasta pluća WI-38 koja je služila kao kontrola. U ispitivanim staničnim linijama procijenjena je sposobnost prijenosa signala za divlji tip i za ispitivani polimorfizam. Nadalje, istražena je vijabilnost i sposobnost proliferacije stanica koje nose divlji tip, odnosno ispitivani polimorfizam. Dobiveni rezultati statistički su obrađeni da bi se utvrdilo postoji li statistički značajna razlika između ispitivanih varijabli.

### 1.3. KORIŠTENE METODE

U izradi ovog rada upotrijebljene su sljedeće metode:

1. Uzgoj staničnih linija WI-38, A549 i H1299
2. Uzgoj i transformacija bakterija i izolacija plazmidne DNA
3. Transfekcija stanica i mjerenje signalnog potencijala, odnosno djelovanja ispitivane varijante na aktivaciju transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B
4. Izolacija proteina iz ispitivanih staničnih linija i analiza proteinske ekspresije metodom *western blot*
5. Test ELISA za provjeru endogene aktivnosti TLR5 prije i nakon infekcije adenovirusnim konstruktom
6. Test vijabilnosti stanica WI-38 i A549 stimuliranih flagelinom te stanica H1299 stimuliranih flagelinom i citostaticima
7. Migracijski test za usporedbu pokretljivosti stanica ovisno o stimulaciji flagelinom

Dobiveni podaci statistički su obrađeni. Varijable su izražene kao aritmetička sredina +/- standardna devijacija. Za određivanje statističke značajnosti razlika između dobivenih rezultata korišten je *t*-test. Razina značajnosti iskazana je kao *p* vrijednost, a *p* vrijednost  $\leq 0,05$  smatrana je značajnom.

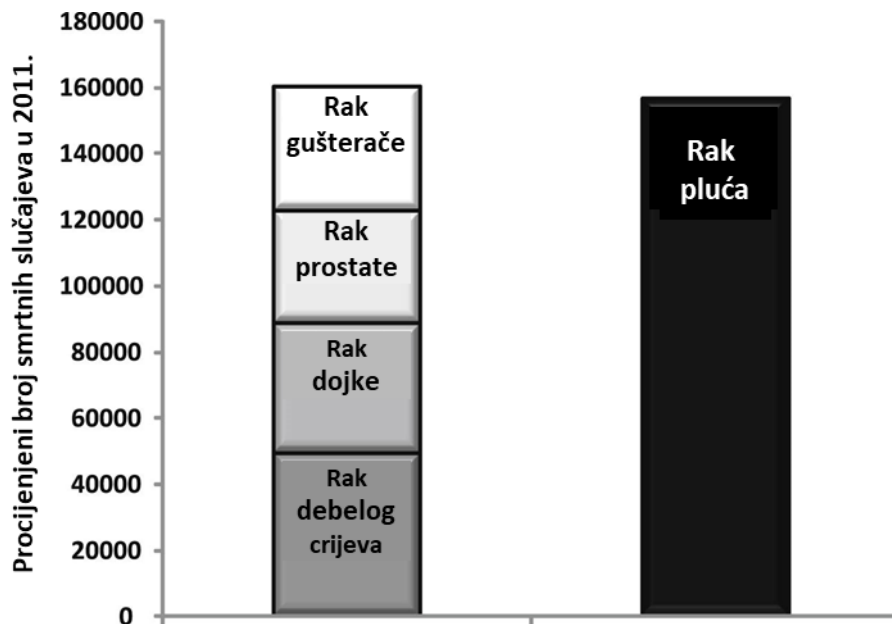
### 1.4. POLAZNA HIPOTEZA

Rad je zasnovan na polaznoj hipotezi prema kojoj je funkcionalna varijanta rs2072493/N592S gena *TLR5* povezana s neimunskim procesima koji sudjeluju u nastanku karcinoma pluća.

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. KARCINOM PLUĆA

U manje od sto godina karcinom pluća od rijetke je bolesti postao vodeći uzrok smrtnosti od malignih oboljenja i veliki javnozdravstveni problem u čitavom svijetu.<sup>1,33</sup> Od 1985. godine to je najčešći karcinom i po pojavnosti i po smrtnosti. Smrtnost od raka pluća daleko je veća od drugih čestih malignih bolesti (Slika 2).<sup>2</sup> Unatoč brojnim znanstvenim istraživanjima usmjerenima otkrivanju uzroka ove bolesti, kao i ispitivanju različitih mogućnosti liječenja, pomaci u preživljenju bolesnika još uvijek su nedostatni. Dok svjedočimo vrlo brzom tehnološkom napretku, koji je između ostaloga doveo do razvoja brojnih novih dijagnostičkih metoda, bolest se čak i u najrazvijenijim zemljama u većine bolesnika otkriva kasno.<sup>34</sup> Istovremeno, nove terapije koje su se počele koristiti zadnjih desetak godina dovele su do boljeg ishoda liječenja samo u manjoj skupini oboljelih.<sup>34</sup> Stoga je sveukupna smrtnost od raka pluća još uvijek vrlo visoka.<sup>1,34</sup>

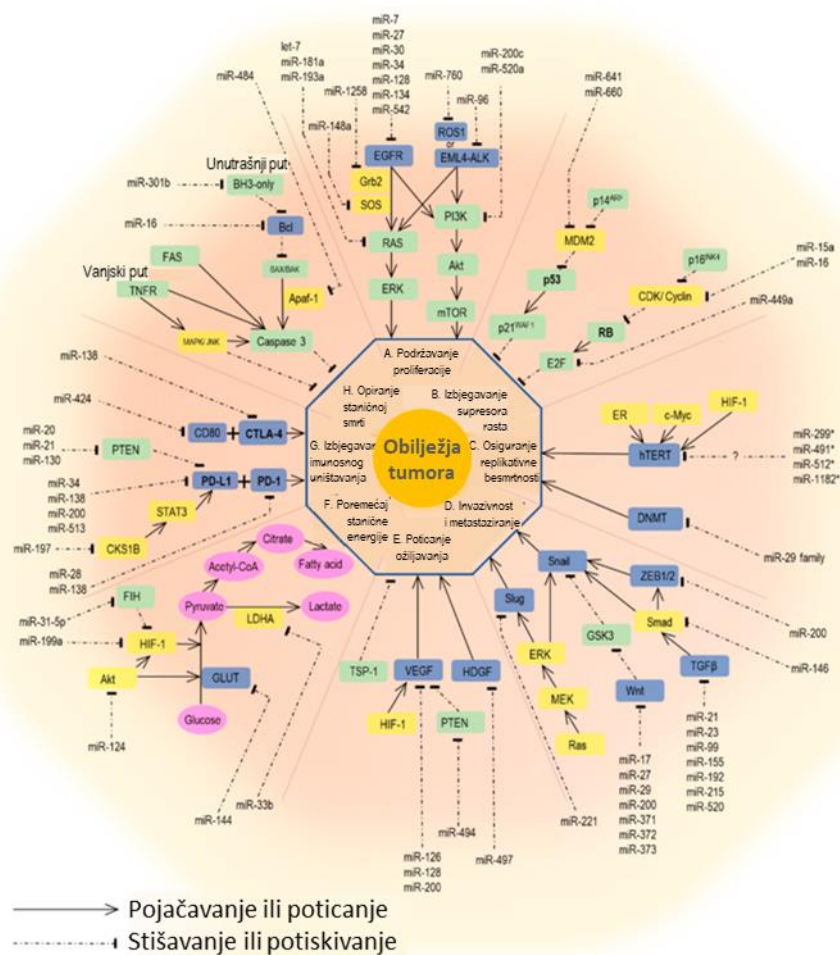


**Slika 2.** Smrtnost od karcinoma pluća u usporedbi s drugim karcinomima  
Preuzeto i prilagođeno prema: Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung Cancer: Epidemiology, etiology, and prevention. Clin Chest Med. 2011;32(4):605-44. doi:

10.1016/j.ccm.2011.09.001<sup>2</sup>

## 2.1.1. Etiologija i patofiziologija karcinoma pluća

Uzroci karcinoma pluća i patofiziološki mehanizmi uključeni u njegov razvoj, kao i kod drugih malignih bolesti, brojni su i međusobno isprepleteni (Slika 3). Nakon desetljeća kliničkih i molekularnih istraživanja jasno je da se radi o vrlo kompleksnoj bolesti u čijem nastanku i razvoju sudjeluju brojni čimbenici, s jedne strane genetski, a s druge okolišni ili epigenetski. Stoga je za razumijevanje etiologije i patofiziologije karcinoma pluća potrebno povezivanje različitih uzročnih čimbenika u jedinstvenu cjelinu.<sup>35</sup>



**Slika 3.** Obilježja tumorskog rasta i signalni putevi uključeni u razvoj karcinoma  
 Preuzeto i prilagođeno prema: Wu KL, Tsai YM, Lien CT, Kuo PL, Hung JY. The roles of  
 microRNA in lung cancer. *Int J Mol Sci.* 2019;20(7):1611. doi: 10.3390/ijms20071611<sup>35</sup>

Početak dvadesetog stoljeća karcinom pluća bio je rijetka bolest. No kako se povećavao broj oboljelih, pojavljivalo se sve više kliničkih radova koji su usmjeravali daljnja znanstvena razmišljanja i istraživanja. Jedno od važnih kliničkih zapažanja bila je značajno veća pojavnost ove bolesti u pušača. U svrhu dokazivanja ili opovrgavanja teze da pušenje uzrokuje rak pluća učinjena su brojna epidemiološka istraživanja, čime je uzročna povezanost raka pluća i izloženosti duhanskom dimu nepobitno potvrđena. Naime, dokazano je da se više od 80% karcinoma pluća događa u pušača, a nađena je i povezanost broja popušanih cigareta i duljine pušačkog staža s nastankom ove vrste raka. Utvrđeno je da osim pušenja kao plućni karcinogeni djeluju i zagađenje zraka, izloženost radioaktivnom zračenju i različitim toksičnim tvarima kao što su azbest, radon, krom i nikel.<sup>2</sup>

Izloženost čimbenicima rizika ipak nije mogla u potpunosti objasniti nastanak bolesti. Naime, utvrđeno je da od karcinoma pluća obolijeva manje od 20% pušačke populacije.<sup>2,4</sup> Zamijećena je i povećana učestalost karcinoma pluća u nekim obiteljima i nekim dijelovima svijeta, što se također nije moglo povezati isključivo s izloženosti duhanskom dimu ili drugim plućnim karcinogenima. Nadalje, karcinom pluća češće je dijagnosticiran kod ljudi koji su već imali neku plućnu bolest, bilo preboljelu infekciju kao što su pneumonija i tuberkuloza pluća, bilo neku kroničnu plućnu bolest kao što su KOPB (kronična opstruktivna bolest pluća) i IPF (intersticijska plućna fibroza). Na kraju, zamijećena je sve veća učestalost karcinoma pluća u nepušača.<sup>2,36</sup>

Meta analizom, u koju je uključen veliki broj relevantnih istraživanja koja su proučavala utjecaj pridruženih plućnih bolesti na nastanak karcinoma pluća, utvrđeno je da je relativni rizik za nastanak karcinoma pluća veći kod osoba koje su preboljele KOPB, pneumoniju ili tuberkulozu. Kada su nepušači analizirani odvojeno od pušača, nađena je direktna veza ranije preboljele tuberkuloze odnosno pneumonije s nastankom karcinoma.<sup>9</sup>

Sve su ove spoznaje ukazivale na razlike u osjetljivosti pojedinaca na plućne karcinogene. Drugim riječima, uočena je važna uloga molekularnih mehanizama u nastanku bolesti. Bazična istraživanja išla su u raznim smjerovima u skladu s istovremenim otkrićem brojnih gena. Proučavani su geni uključeni u regulaciju upalnog odgovora, geni staničnog ciklusa, geni zaduženi za diferencijaciju stanice, proliferaciju, apoptozu, geni odgovorni za popravak oštećene DNA, kao i brojni drugi. Za mnoge od njih utvrđena je važna uloga u karcinogenezi. Međutim, još uvijek je najveći izazov pronaći gene koji su ključni u nastanku bolesti.<sup>4</sup>

### 2.1.2. Podjela karcinoma pluća

Prva podjela karcinoma pluća pojavila se još dvadesetih godina prošlog stoljeća. Temeljem morfološkog nalaza patohistoloških preparata karcinom pluća podijeljen je na četiri tipa: karcinom malih stanica, karcinom velikih stanica, karcinom pločastih stanica i karcinom žljezdanih stanica.<sup>37</sup> Ta je podjela postala osnova svih kasnijih histoloških podjela karcinoma pluća. Budući da se u kliničkom radu nije pokazala korisnom, vremenom se počela koristiti podjela na karcinom malih i nemalih stanica. Iako je i ova podjela pomalo zastarjela, još uvijek se upotrebljava jer je jednostavna i ukazuje na dvije podvrste karcinoma koje se značajno razlikuju po kliničkom tijeku, načinu liječenja i prognozi.<sup>38</sup>

Kako su pojedini karcinomi nemalih stanica pokazivali značajna odstupanja u ponašanju u odnosu na druge karcinome iz iste skupine i po nekim su osobinama više sličili karcinomu malih stanica vremenom se, pored podjele na karcinom malih i nemalih stanica, pojavila i skupina takozvanih neuroendokrinih karcinoma. To je skupina karcinoma koja ima neke zajedničke karakteristike. U njoj se nalaze i karcinomi malih stanica i neki karcinomi velikih stanica, tako da između ove dvije podjele postoje određena preklapanja.<sup>38</sup>

Danas se dosta zna i o genetskoj prirodi bolesti, pa su u novijim podjelama svoje mjesto našle i mutacije pojedinih gena za koje se zna da dovode do nastanka nekih oblika bolesti. Kako postoji sve više ciljanih lijekova kojima se može uspješno liječiti karcinome koji izražavaju neku mutaciju, to je izdvajanje ovih podtipova od osobite važnosti pri odabiru strategije liječenja.<sup>38</sup>

#### 2.1.2.1. Histološka podjela karcinoma pluća

Histološka klasifikacija tumora pluća iznimno je kompleksna, a uvođenjem novih metoda u patohistološku dijagnostiku sa svakom novom revizijom postaje još kompleksnija. Od 1967. godine objavljuje je skup stručnjaka okupljenih pod pokroviteljstvom SZO-a. Zadnja revizija objavljena je 2015. godine. Iako postoji veliki broj različitih vrsta tumora pluća, najučestaliji je karcinom koji se dalje dijeli na brojne tipove, od kojih su najvažnija četiri osnovna tipa kao i prije sto godina.<sup>39</sup>



Mikrocelularni ili karcinom malih stanica (engl. *small cell lung cancer*, SCLC) uglavnom se dijagnosticira u pušača. Čini oko 15% svih karcinoma pluća, a u zemljama u kojima su na snazi stroge mjere protiv pušenja njegov je udio i manji.<sup>40,41</sup> Nemikrocelularni ili karcinom nemalih stanica (engl. *non-small cell lung cancer*, NSCLC) dijeli se na adenokarcinom ili karcinom žljezdanih stanica, planocelularni ili karcinom pločastih stanica i makrocelularni ili karcinom velikih stanica te neke rijetke tipove karcinoma. Karcinom velikih i karcinom malih stanica podvrste su neuroendokrinih karcinoma. Svaka od ovih skupina ima brojne podskupine.<sup>39</sup> Adenokarcinom je najučestaliji tip karcinoma pluća, osobito u žena nepušača.<sup>10</sup>

### 2.1.2.2. Klinička podjela karcinoma pluća

Osim prema patohistološkom nalazu karcinomi se pluća kao i druge maligne bolesti sistematiziraju i prema proširenosti. Najpoznatija podjela karcinoma koja se temelji na proširenosti bolesti jest TNM klasifikacija (engl. *tumor, nodes, metastases*). Njome je definirano koje su strukture zahvaćene bolešću i u kojoj mjeri. Karcinom se pluća prema TNM klasifikaciji dijeli u četiri stadija, ovisno o tome je li bolest zahvatila samo pluća ili limfne čvorove i udaljene strukture. Budući da je ponekad nemoguće precizno definirati stadij bolesti, a stadiji se dijelom preklapaju, klasifikacija je podložna stalnim promjenama i vremenom je postala vrlo kompleksna. Jedan od čimbenika koji utječe na razvrstavanje jest preživljenje. To znači da se bolesnici koji pripadaju graničnim skupinama, a imaju slično očekivano trajanje života, u sljedećoj reviziji mogu razvrstati u istu skupinu. Zadnja, osma revizija TNM klasifikacije objavljena je u siječnju 2017. godine.<sup>42,43</sup>

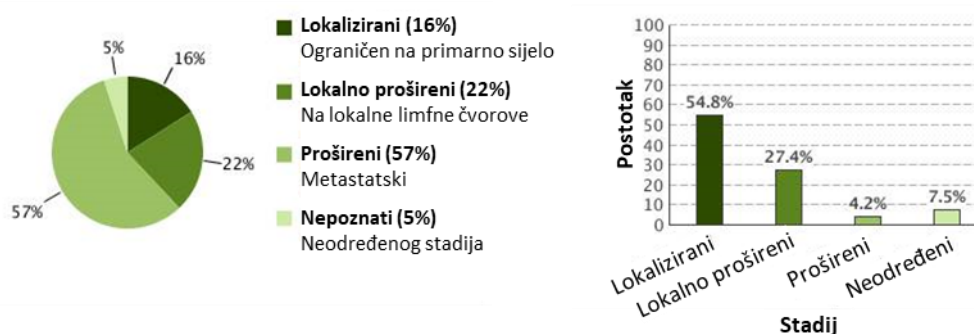
### 2.1.3. Dijagnostika karcinoma pluća

Dijagnostika karcinoma pluća započinje prikupljanjem anamnestičkih podataka i kliničkim pregledom. Time se dobivaju osnovni podatci koji nas usmjeravaju k odabiru odgovarajućih dijagnostičkih alata. Dugi je niz godina prva dijagnostička pretraga bila klasična rtg snimka, no danas je kod većine plućnih bolesti, a osobito kod karcinoma pluća i intersticijskih bolesti, zlatni standard kompjutorizirana tomografija (engl. *computed tomography*, CT). To je metoda koja daje detaljan uvid u stanje plućnog parenhima, ali i drugih intratorakalnih struktura.<sup>44</sup>



Ovisno o kliničkom nalazu i nalazu CT-a odabiru se dodatne dijagnostičke pretrage koje su najčešće invazivne. To mogu biti: bronhoskopija, citopunkcija ili biopsija dostupnih tvorbi na periferiji ili u unutrašnjim organima. Danas raspolažemo brojnim novim radiološkim tehnikama kojima možemo vrlo brzo otkriti asimptomatske tumore ili udaljene presadnice. Također, velik je napredak postignut u razvoju bronhoskopskih pretraga, što omogućuje uzimanje sve kvalitetnijih uzoraka.<sup>44</sup>

Jedan od razloga lošeg ishoda karcinoma pluća njegovo je kasno otkrivanje, što je u suprotnosti sa sve sofisticiranijim dijagnostičkim metodama. Dijelom je to zato što se radi o pritajenoj bolesti koja se u više od 50% slučajeva otkriva kada je već uznapredovala (Slika 4).<sup>2,45</sup> Ne bi li se otkrila u ranijem stadiju, razvijena je metoda probira niskodoznim CT-om od koje se očekuje smanjenje pojavnosti uznapredovalog stadija karcinoma pluća.<sup>46</sup>



**Slika 4.** Stadij karcinoma pluća kod postavljanja dijagnoze i petogodišnje preživljenja  
Preuzeto i prilagođeno sa stranice: National Cancer Institute. Cancer stat facts: lung and bronchus cancer [Internet]. Bethesda, MD: National Institutes of Health, National Cancer Institute, c2021 [pristupljeno 19. 6. 2021.]. Dostupno na: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html><sup>45</sup>

### 2.1.3.1. Slikovna dijagnostika

Osim navedenih radioloških metoda u dijagnostici karcinoma pluća koriste se i brojne druge slikovne metode. To su različite vrste scintigrafskih snimanja, magnetna rezonancija, a u novije vrijeme i pozitronska emisijska tomografija u kombinaciji s niskodoznim CT-om ili PET-CT (engl. *positron emission tomography*). To je jedna od najsuvremenijih metoda snimanja i ima važnu ulogu, kako u ranom otkrivanju i procjeni proširenosti bolesti, tako i u praćenju bolesnika. Premda je njenim uvođenjem postignut značajan napredak, kao i svaka druga, i ova pretraga ima određena ograničenja.<sup>44</sup>

### 2.1.3.2. Invazivna dijagnostika

Najvažnija invazivna metoda u dijagnostici karcinoma pluća jest bronhoskopija. Njome se pregledava bronhalno stablo iznutra i uzimaju potrebni uzorci za daljnju analizu. Bronhoskopski pregled važan je, kako u procjeni proširenosti bolesti, tako i u postavljanju točne citološke/histološke dijagnoze. U novije je vrijeme uz klasični bronhoskopski pregled standard postao EBUS (engl. *endobronchial ultrasound*) ili pregled endobronhalnom ultrazvučnom sondom, a sve više se koriste brojne tehnike vođene bronhoskopije.<sup>47</sup>

Osim bronhoskopije u dijagnostici karcinoma pluća koriste se i druge invazivne pretrage, od manje invazivnih kao što su pleuralna punkcija i citološka punkcija različitih tvorbi, preko invazivnijih kao što je transtorakalna biopsija, do kirurških kao što su videoasistirana medijastinoskopija odnosno torakoskopija i otvorena biopsija. Cilj je svih ovih pretraga dobivanje kvalitetnog uzorka za daljnju citološku ili patohistološku analizu.<sup>44</sup>

### 2.1.3.3. Metode obrade uzoraka

Citološka i patohistološka dijagnostika karcinoma pluća podrazumijeva obradu uzoraka dobivenih različitim invazivnim dijagnostičkim postupcima. Od iznimne je važnosti jer tip tumora određuje način liječenja i prognozu bolesnika. Pored morfološke procjene svakog uzorka danas su u upotrebi i različite imunocitokemijske (IC) i imunohistokemijske (IHC) metode bojenja kojima se može točnije odrediti tip tumora kao i ekspresija molekula od interesa. Za ova bojenja koriste se različita protutijela koja imaju sposobnost specifičnog vezanja za epitope na stanicama ispitivanog uzorka.<sup>48,49</sup>

Molekularna biologija u novije je vrijeme postala jedan od najvažnijih segmenata u dijagnostici karcinoma pluća. Tomu je ponajprije doprinijela pojava ciljane terapije čija primjena zahtijeva preciznu dijagnostičku obradu. Naime, otkrićem različitih mutacija u karcinomu pluća pojavila se potreba za dodatnim molekularnim testiranjima kojima se definira tip mutacije. Molekularne metode koje se koriste u dijagnostici karcinoma pluća jesu: PCR (engl. *polymerase chain reaction*), NGS (engl. *next generation sequencing*), FISH (engl. *fluorescence in situ hybridization*), RT-PCR (engl. *reverse transcription-PCR*) i mnoge druge, a koja će biti upotrijebljena ovisi o vrsti mutacije koja se želi dokazati.<sup>48,50</sup>

### 2.1.4. Metode liječenja karcinoma pluća

Liječenje karcinoma pluća izrazito je kompleksno. Prije odabira strategije liječenja potrebni su što je moguće bolja procjena proširenosti bolesti i uvid u stanje bolesnika. Ova dva parametra uvelike određuju plan i ciljeve liječenja. Pored toga vrlo je važno imati što točniju dijagnozu koja treba biti upotpunjena sa što više imunohistokemijskih i molekularnih biljega. Za ograničenu bolest metoda izbora je operacija, dok se uznapredovala bolest liječi sustavnom terapijom, samom ili u kombinaciji sa zračenjem.<sup>51</sup>

Kirurško odstranjenje metoda je izbora u liječenju karcinoma prvog i drugog stadija. Odabir operacijske metode ovisi o veličini i smještaju tumora, općem stanju bolesnika te pridruženim bolestima, ako ih ima. To su ujedno čimbenici koji mogu kontraindicirati kirurški zahvat. Zadnja dva do tri desetljeća sve više se rade videoasistirani zahvati zbog bržeg postoperacijskog oporavka bolesnika.<sup>51</sup>

Sustavna terapija primjenjuje se uglavnom u liječenju trećeg i četvrtog stadija karcinoma pluća, a podrazumijeva kemoterapiju, imunoterapiju i ciljane lijekove. Iako je kemoterapija najstariji oblik sustavnog liječenja karcinoma, još uvijek u njemu ima značajno mjesto. Kemoterapija djeluje toksično na stanice koje se brzo dijele. To su prvenstveno stanice karcinoma, ali i zdrave stanice kao što su stanice sluznice probavnog sustava i stanice koštane srži. Zbog toga kemoterapija ima specifične nuspojave koje su vezane upravo uz ove sustave. Kod ograničene i lokalno uznapredovale bolesti kemoterapija se primjenjuje u kombinaciji s kirurškim zahvatom ili zračenjem, dok se u metastatskoj bolesti daje sama ili s imunoterapijom.<sup>51</sup>

Imunoterapija je novi oblik sustavnog liječenja malignih tumora. Od različitih vrsta imunoterapije za sada su kod karcinoma pluća u kliničkoj primjeni samo inhibitori kontrolnih točaka. Oni ne djeluju izravno na tumor, već posredno putem citotoksičnih limfocita T. Radi se o monoklonskim protutijelima koja sprečavaju inhibicijski učinak tumorskog mikrookoliša na aktivaciju limfocita T. Ovaj učinak posredovan je molekulama CTLA-4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) i PD-1 (engl. *programmed cell death protein*). Molekula CTLA-4 proteinski je receptor eksprimiran na površini citotoksičnih limfocita, dok je PD-1 površinski receptor izražen na aktiviranim limfocitima T i drugim imunskim stanicama. U normalnim okolnostima ovi receptori sprečavaju prekomjernu aktivnost limfocita T i posljedičnu autoimunost, a visoko su izraženi u karcinomima.<sup>51</sup>

Iako su uz imunoterapiju još uvijek vezane mnoge nepoznanice, nepobitna je činjenica da je ovaj oblik liječenja za određeni broj bolesnika s karcinomom pluća značajno poboljšao preživljenje. Međutim, zbog uplitanja u imunosni sustav domaćina, ova terapija ima i brojne, prvenstveno imunosne nuspojave.<sup>51</sup>

Ciljana terapija podrazumijeva lijekove koji inhibiraju mutacije u tumorskim stanicama. Ove mutacije najčešće nastaju u genima koji putem različitih signalnih molekula sudjeluju u kontroli proliferacije stanica. Njihovom se inhibicijom stoga sprečava rast i širenje tumora. Prva mutacija koja se pokazala klinički značajnom i koja je dovela do promjene paradigme liječenja karcinoma pluća bila je mutacija gena *EGFR* (engl. *epidermal growth factor receptor*). Ona dovodi do pretjerane aktivnosti transembranskog proteina istog naziva i posljedičnog nekontroliranog rasta stanice.<sup>52</sup>

Osim ove mutacije, danas su mete ciljane terapije karcinoma pluća translokacije gena *ALK* (engl. *anaplastic lymphoma kinase*) i *ROS1* (engl. *c-ros oncogene 1*), a neprekidno se otkrivaju nove, uglavnom rijetke genske promjene koje također postaju ciljane molekule novih lijekova. Među njima su mutacije gena *HER2* (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*), *BRAF* (engl. *B-raf proto-oncogene*), *NTRK* (engl. *neurotrophic receptor tyrosine kinase*), *NRG1* (engl. *neuregulin-1*), *MET* (engl. *MET proto-oncogene receptor tyrosine kinase*) i *RET* (engl. *ret proto-oncogene*).<sup>51</sup>

Uvođenjem ciljanih lijekova preživljenje se za skupinu bolesnika s pozitivnom mutacijom višestruko produljuje, s ranijih šest do osam mjeseci na dvije do tri, a često na pet i više godina uz očuvanu kvalitetu života. Nuspojave ovih lijekova posljedica su njihove nespecifičnosti, odnosno činjenice da većina djeluje i na divlji tip gena. Glavni je problem s ciljanom terapijom, uz nuspojave, razvoj rezistencije, što se pokušava prevladati dizajniranjem novih lijekova koji izbjegavaju mehanizme rezistencije i djeluju specifično na mutirani gen.<sup>51</sup>

Radioterapija ili terapija zračenjem najčešće se primjenjuje u kombinaciji s drugim oblicima liječenja. Kombinira se s citostatskom terapijom kod lokalno uznapredovale bolesti. Može se, ali rjeđe, primijeniti nakon kirurškog zahvata, a često se koristi za ublažavanje simptoma bolesti.<sup>51</sup>

Karcinom pluća bolest je koja znatno remeti kvalitetu života oboljele osobe. Stoga je od početka bolesti važno djelovati na ublažavanje simptoma. Taj dio liječenja naziva se palijativnom skrbi.<sup>53</sup>

### 2.2. IMUNOSNI SUSTAV

Imunosni sustav sastoji se od različitih vrsta stanica i molekula čija je zadaća obrana organizma od infekcije. Dva su osnovna mehanizma obrane, prirođeni i stečeni. Prirođeni reagira brzo i uvijek na isti način, dok stečeni djeluje sporije ali ciljano, što mu uz sposobnost pamćenja omogućava da prilikom ponovljenog doticaja s patogenom reagira puno brže i učinkovitije. Do početka ovog stoljeća o prirođenom imunitetu znalo se puno manje nego o stečenom i smatran je nespecifičnim.<sup>12,54</sup>

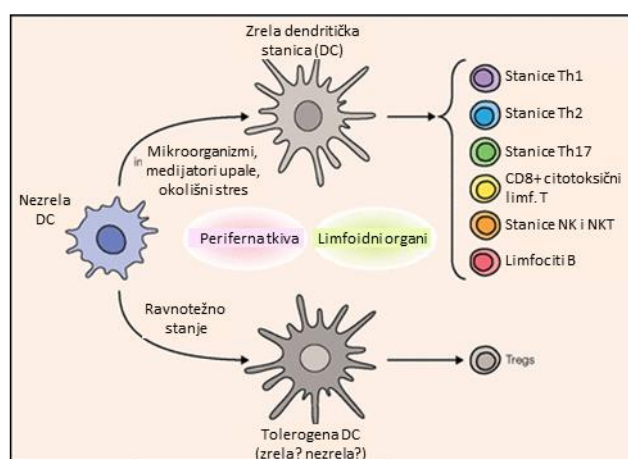
Jedna od važnih značajki imunskog sustava jest mogućnost finog podešavanja. To znači da će uspjeh imunске reakcije s jedne strane ovisiti o adekvatnom odgovoru na antigen, a s druge o sposobnosti povratka u stanje mirovanja. Isključivanje imunskog odgovora jednako je važno kao i njegovo uključivanje jer sprečava prekomjernu reakciju koja bi dovela do oštećenja organizma domaćina. Odvija se po sličnom principu kao mehanizam negativne povratne sprege u endokrinom sustavu.<sup>55</sup>

#### 2.2.1. Prirodna imunost

Prije kontakta s imunskim sustavom svaki patogen najprije mora svladati prirodne prepreke kao što su koža, sluznice, sluz te različiti enzimi i druge tvari koje onemogućavaju vezanje patogena za stanicu. Mikroorganizmi koji svladaju ovu prvu barijeru dolaze u dodir s imunskim sustavom, što predstavlja sljedeću razinu obrane organizma. Prirođeni imunski sustav čine raznovrsne stanice i molekule koje imaju sposobnost prepoznavanja i odstranjivanja stranih antigena. Od presudne su važnosti u obrani organizma od infekcije jer vrlo rano signaliziraju prisutnost patogena. Za razliku od stanica stečenog imunskog sustava one nemaju memorijsku sposobnost. To znači da će pri svakom ponovljenom doticaju s antigenom reagirati identično.<sup>54,56</sup>

Najvažnije stanice prirodne imunosti jesu dendritičke stanice (engl. *dendritic cell*, DC). Prvi ih je opisao Paul Langerhans krajem devetnaestog stoljeća te su dugo bile poznate pod nazivom Langerhansove stanice. Današnji naziv dao im je Ralph Marvin Steinman 1973. godine, otkrivši njihovu ključnu ulogu u povezivanju prirodne i stečene imunosti. Dendritičke stanice strateški su raspoređene na mjestima na kojima je organizam najviše izložen okolini kao što su koža, probavni i respiratorni sustav. Procesom endocitoze neprekidno uklanjaju strane antigene, ali obavljaju i niz znatno kompleksnijih zadataka.<sup>54,57</sup>

U tkivima se nalaze u nezrelom obliku. Nakon što dođu u doticaj s antigenom koji predstavlja opasnost, obrade ga i prenose u najbliže limfoidne organe, omogućavajući doticaj sa stanicama stečenog imuniteta. Pri tome prolaze proces sazrijevanja, postaju imunosno aktivne, izlučuju citokine čime potiču daljnji imunosni odgovor (Slika 5). Dendritičke stanice ujedno kontroliraju ovaj proces, sprečavajući reakciju limfocita T na vlastite antigene.<sup>57,58</sup>



**Slika 5.** Sazrijevanje i aktivacija dendritičkih stanica

Preuzeto i prilagođeno prema: Mellman I. Dendritic cells: master regulators of the immune response. *Cancer Immunol Res.* 2013;1(3):145-9. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0102<sup>58</sup>

Zahvaljujući receptorima na svojoj površini u stanju su prepoznati osnovne građevne jedinice mikroorganizama (PAMPs), ali i unutrašnje signale koji nastaju kao posljedica infekcije unutarstaničnim mikroorganizmima ili kod nekroze odnosno stanične smrti (DAMPs). Kada se takav antigen, koji predstavlja potencijalnu opasnost za organizam, veže za odgovarajući receptor, dendritičke se stanice aktiviraju i postaju antigen predočne stanice (engl. *antigen-presenting cell*, APC). Aktivirane dendritičke stanice putuju u najbliže limfne čvorove, a antigen koji ih je aktivirao ulazi u stanicu, gdje se razgrađuje djelovanjem proteolitičkih enzima. Tako obrađeni antigen izlažu na svojoj površini predočavajući ih limfocitima T. Istovremeno, pojačano eksprimiraju kostimulacijsku molekulu B7 koja omogućava aktivaciju limfocita T. Predočavanje antigena odvija se putem molekula MHC tipa II (engl. *major histocompatibility complex*).<sup>54,57,58</sup>

Kompleks MHC, to jest glavni kompleks tkivne snošljivosti, čini više povezanih gena koji kodiraju proteine na površini stanice s presudnom ulogom u stečenom imunitetu. Postoje dvije klase ovih proteina. Molekule MHC klase I izražene su na površini svih stanica s jezgrom i odgovorne su za razlikovanje vlastitih od stranih antigena, što je osobito važno kod infekcije unutarstaničnim mikroorganizmima. Molekule klase II izražene su samo na površini antigen predočnih stanica i imaju ulogu u predočavanju stranih antigena limfocitima T i njihovoj aktivaciji. Sposobnost predočavanja antigena na svojoj površini imaju i druge stanice kao što su limfociti B i aktivirani makrofagi. Ove tri vrste stanica čine skupinu takozvanih „profesionalnih antigen predočnih stanica” pri čemu su dendritičke stanice najbrojnije među njima.<sup>54,58</sup>

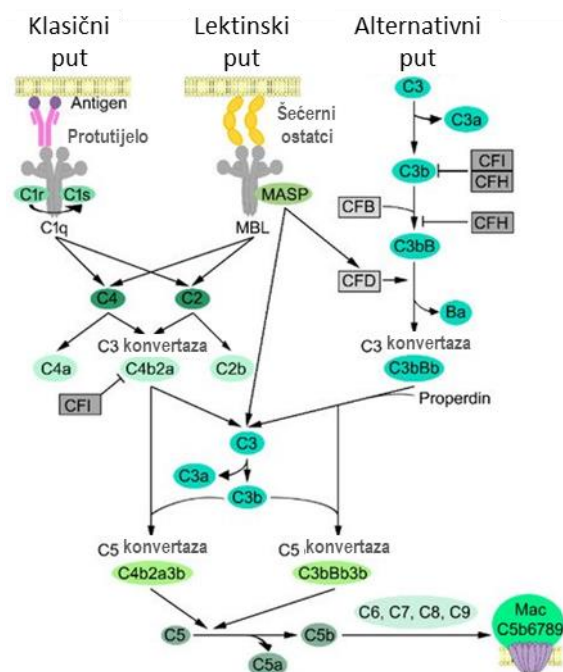
Osim dendritičkih stanica u imunom odgovoru prirođenog imuniteta sudjeluju brojne druge stanice koje kruže organizmom nošene krvnom strujom. Neke od njih, kao što su neutrofil, monociti i makrofagi, imaju sposobnost fagocitoze zaraženih stanica. Druge, kao što su bazofili, mastociti i eozinofili, otpuštaju medijatore upale, dok stanice NK (engl *natural killer cells*) djeluju izravno citotoksično na zaraženu stanicu, potičući proces apoptoze. Ključni događaj ranog imunog odgovora njihovo je nakupljanje i aktivacija na mjestu infekcije. Stanice koje se prve pojavljuju na mjestu prodora patogena jesu neutrofil, čija aktivacija i nakupljanje započinje nakon što prime odgovarajuću poruku. Nositelji su poruka u imunom sustavu citokini, male molekule koje imaju sposobnost promijeniti ponašanje stanica. Osim aktivacije neutrofila imaju i brojne druge funkcije.<sup>54,59</sup>

Citokini se dijele u nekoliko skupina, ovisno o vrsti molekule i stanici na koju djeluju. Interleukini nastaju u leukocitima i djeluju na druge leukocite. Citokini sa sposobnošću kemoatraktantnog učinka nazivaju se kemokini, a oni sa sposobnošću poticanja diferencijacije i proliferacije matičnih stanica faktori stimulacije kolonija.<sup>54,59</sup>

Posebna su skupina citokina interferoni. Oni imaju sposobnost ometanja replikacije virusa, a dijele se u dvije podskupine. Prvu čine interferoni  $\alpha$  i  $\beta$ , a drugu interferon  $\gamma$ . Pored izavnog antivirusnog djelovanja interferoni imaju i brojne druge funkcije u imunom sustavu kao što su aktivacija i poticanje citotoksičnog učinka neutrofila, makrofaga i stanica NK na stanice zaražene unutarstaničnim mikroorganizmima. Povećavajući ekspresiju molekula MHC na antigen predočnim stanicama, interferoni omogućavaju prepoznavanje zaraženih stanica. Prva skupina interferona povećava ekspresiju klase I, a interferon  $\gamma$  ekspresiju klase II molekula MHC.<sup>54,59</sup>



Osim citokina humoralni dio prirodnog imunskog sustava sadrži i druge molekule kao što su komplement i proteini akutne faze. Sve su one važan dio ovog sustava, bez čije aktivnosti stanične komponente ne bi mogle obavljati svoju funkciju. Jednom aktivirani neutrofilni odstranjuju patogen procesom fagocitoze, što im je najvažnija zadaća. Oblaganje patogena specifičnim protutijelima ili komplementom znatno olakšava njegovo prepoznavanje i čini fagocitozu čak sto puta učinkovitijom.<sup>54,59</sup> Sustav komplementa sadrži više od trideset serumskih i membranskih glikoproteina koji se u prisustvu patogena kaskadno aktiviraju pri čemu im se učinak višestruko pojačava. Aktivacija se odvija jednim od triju signalnih puteva (Slika 6), a svi završavaju lizom stanice patogena.<sup>60,61</sup>



**Slika 6.** Tri puta aktivacije komplementa

Preuzeto i prilagođeno prema: Riihilä P, Nissinen L, Knuutila J, Nezhad PR, Viikklepp K, Kähäri VM. Complement system in cutaneous squamous cell carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2019;20(14):3550.

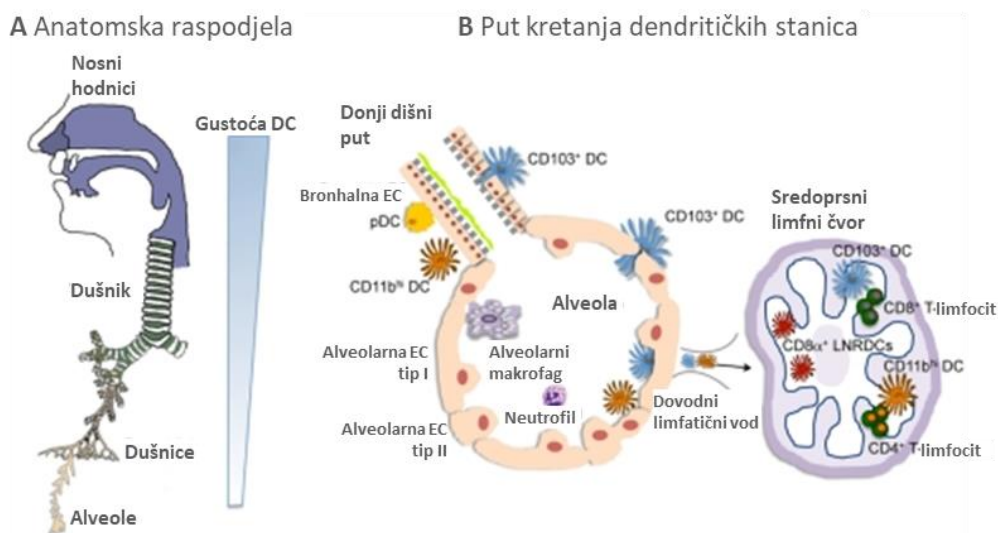
doi: 10.3390/ijms20143550<sup>61</sup>

Svi elementi prirodnog imunskog sustava, kako stanični, tako i molekularni, imaju jedinstvenu ulogu u akutnom upalnom odgovoru organizma na infekciju. Djelovanjem humoralnih komponenti imunosne stanice bivaju privučene na mjesto upalnog zbivanja, gdje sudjeluju u orkestriranom procesu uklanjanja patogena koji se nastavlja u isto tako uređeni odgovor stečenog imunskog sustava.<sup>59</sup>



### 2.2.1.1. Mehanizmi prirodene imunosti u dišnom sustavu

Dendritičke stanice imaju ključnu ulogu u održavanju tkivne homeostaze u plućima. Stoga se njihova populacija u respiratornom sustavu vrlo brzo izmjenjuje, s poluživotom od najviše dva dana. Zadužene su za nadzor nad antigenima koji iz vanjskog okoliša dopijevaju u pluća, zaštitu od infekcije i maligne promjene. Raspored dendritičkih stanica u dišnom sustavu ovisi o blizini vanjskog okoliša. Najviše ih je u gornjim dišnim putevima, dok im se distalno gustoća smanjuje (Slika 7A). U plućima se nalaze dvije vrste dendritičkih stanica (Slika 7B): plazmacitoidne (engl. *plasmacytoid dendritic cell*, pDC) i uobičajene (engl. *conventional dendritic cell*, cDC). Uobičajene se dijele na CD103<sup>+</sup> i CD11b<sup>hi</sup> (engl. *cluster of differentiation*). Stanice CD103<sup>+</sup> raspoređene su poput mreže između epitelnih stanica (na slici označene plavo), dok su CD11b<sup>hi</sup> (označene narančasto) smještene u lamini proprijji kao i pDC (označene žuto). Funkcija pojedinih skupina dendritičkih stanica predmet je brojnih istraživanja. Zbog središnje uloge u imunskim procesima u plućima, sve češće predstavljaju ciljno mjesto u liječenju različitih plućnih bolesti, uključujući karcinom pluća. Osim dendritičkih stanica važnu ulogu u prirodnom imunskom odgovoru u plućima imaju alveolarni makrofagi i eozinofili.<sup>62</sup>

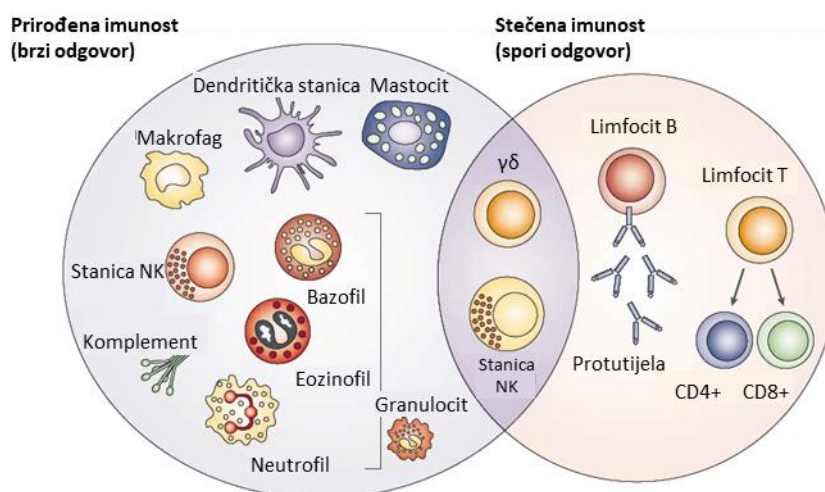


**Slika 7.** Raspored i uloga dendritičkih stanica (DC) u plućima

EC = endotelna stanica, LNRDC = DC limfnog čvora, pDC = plazmacitoidna DC. Preuzeto i prilagođeno prema: Condon TV, Sawyer RT, Fenton MJ, Riches DWH. Lung dendritic cells at the innate-adaptive immune interface. *J Leukoc Biol.* 2011;90(5):883-95. doi: 10.1189/jlb.0311134<sup>62</sup>

### 2.2.2. Stečena imunost

Iako se prirodna i stečena imunost uglavnom opisuju odvojeno, u stvarnosti je to jedinstveni sustav u kojemu se procesi isprepleću, a stanice međusobno surađuju. Stečeni imunostni sustav također se sastoji od humoralnog i staničnog dijela (Slika 8), to jest od molekula i stanica.<sup>63</sup> Najvažniju ulogu u stečenom imunitetu imaju limfociti B i T. Oni djeluju u suradnji sa stanicama prirodnog imunostnog sustava i na njihov poticaj. Osnovna je razlika ta što su stanice stečene imunosti izrazito antigen specifične i imaju sposobnost imunostnog pamćenja. To znači da će nakon prvog doticaja s antigenom njihova reakcija pri svakom sljedećem susretu biti znatno brža i svrsishodnija. Upravo zbog svoje sofisticiranosti ovaj dio imunostnog sustava obilježje je viših organizama.<sup>54,59</sup>



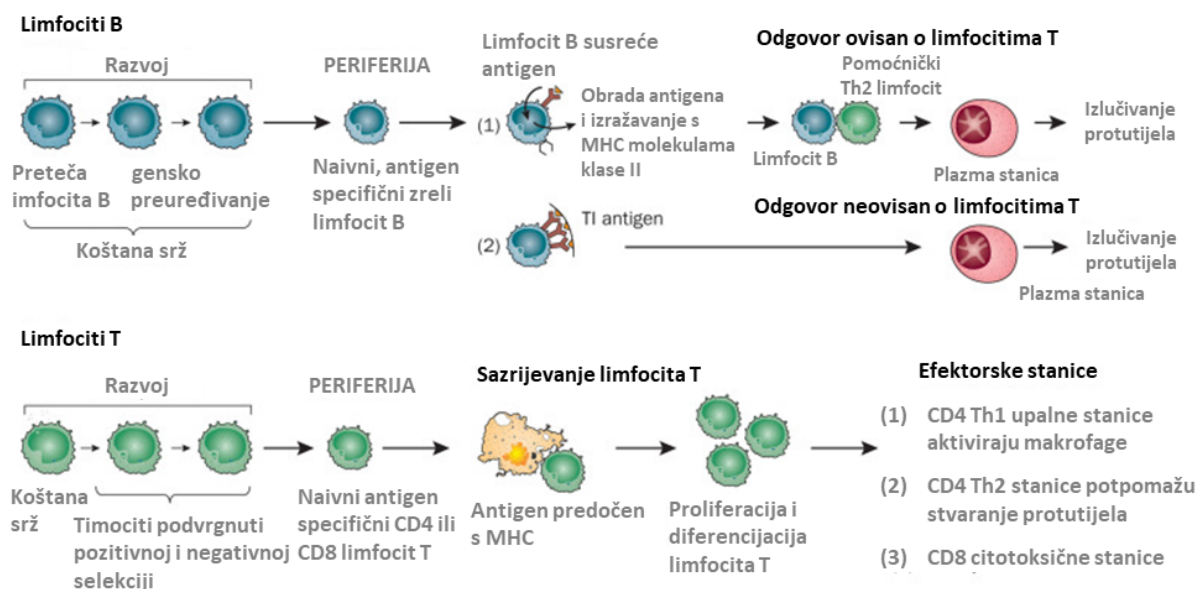
**Slika 8.** Najvažniji elementi prirodnog i stečenog imunostnog sustava

Preuzeto i prilagođeno prema: Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(1):11-22. doi: 10.1038/nrc1252<sup>63</sup>

Limfociti B i T sazrijevaju u koštanoj srži, s tim da limfociti T proces dozrijevanja dovršavaju u timusu (Slika 9). Antigen specifični receptori stvaraju se na obje vrste stanica procesom slučajnog preuređivanja različitih odsječaka DNA.<sup>59</sup> Tako nastaje više od  $10^{18}$  receptora na limfocitima T, a može nastati više od  $10^{11}$  protutijela putem limfocita B.<sup>64,65</sup>

Zreli limfociti koji nisu bili u doticaju sa specifičnim antigenom, takozvane naivne stanice, dospijevaju na periferiju. Budući da je svega nekoliko limfocita specifično za pojedini antigen, oni kruže tijelom nošeni krvlju velikom brzinom ne bi li povećali vjerojatnost susreta s točno određenim antigenom. Kada se limfociti susretnu s antigen predočnim stanicama koje im predočavaju za njih specifični antigen, dolazi do vezanja antigena za receptor i aktivacije limfocita (Slika 9). Stanica potom stvara klonove, povećavajući tako potencijal vezanja antigena.<sup>55,56,59</sup>

Dva su osnovna tipa imunskih reakcija stečenog imuniteta, humoralni i stanični. Aktivirani limfociti B djeluju putem humoralnog imunskog odgovora. Oni se transformiraju u plazma stanice koje imaju sposobnost stvaranja protutijela (Slika 9). Protutijela su imunoglobulini, to jest vrsta proteina koji se ciljano vežu za izvanstanične antigene, oblažu ih i tako omogućavaju stanicama prirodnog imuniteta da ih prepoznaju i uklone. Transformacija limfocita B u plazma stanice odvija se uz pomoć Th2 podskupine limfocita T ili neovisno o njima, što ovisi o vrsti antigena. Protutijela nastala kao reakcija na neki antigen mogu ostati trajno prisutna u krvi, što nazivamo imunošću na određeni antigen.<sup>59</sup>



**Slika 9.** Uloga limfocita B i T u stečenoj imunosti

Preuzeto i prilagođeno prema: Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*. 2001;357(9270):1777-89. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04904-7<sup>59</sup>

Limfociti T odgovorni su za stanični imunski odgovor, a uloga im je uklanjanje unutarstaničnih antigena. Dijele se na pomagačke (engl. *T helper*, Th) i citotoksične limfocite T (engl. *T cytotoxic*, Tc). Citotoksični limfociti T ili CD8<sup>+</sup> stanice izravno uništavaju stanicu zaraženu virusima jer ona predočava strane antigene zajedno s molekulama MHC klase I. Upravo to citotoksičnim limfocitima predstavlja signal za prepoznavanje, a ujedno onemogućava autoimunu reakciju. Pomagačke limfocite T ili CD4<sup>+</sup> stanice moderna medicina podijelila je na regulacijske (engl. *regulatory T cell*, Treg) i efektorske limfocite T (engl. *effector T cell*, Teff). Ovisno o citokinskom okolišu CD4<sup>+</sup> limfociti T diferenciraju se u Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 te u regulacijske (Treg) i folikularne (engl. *follicular helper T cell*, Tfh) efektorske populacije stanica koje iskazuju različite biološke funkcije. Efektorske stanice T štite od patogena i uključene su u upalne odgovore i imunsku regulaciju kroz lučenje IFN- $\gamma$  (engl. *interferon gamma*), IL-4 (engl. *interleukin*), IL-9, IL-17, IL-22 i IL-35. Efektorska funkcija CD4<sup>+</sup> stanica razlikuje se po citokinima koje izlučuju. Limfociti Th1 izlučuju citokine IL-2, IFN- $\gamma$  i TNF koji potiču upalni odgovor i tako kontroliraju umnažanje unutarstaničnih patogena. Limfociti Th2 izlučuju IL-4, IL-5, IL-6 i IL-10 potičući stvaranje protutijela u limfocitima B. Aktivacija naivnih limfocita T u najvećoj mjeri stimulirana je djelovanjem aktiviranih DC.<sup>59,66</sup>

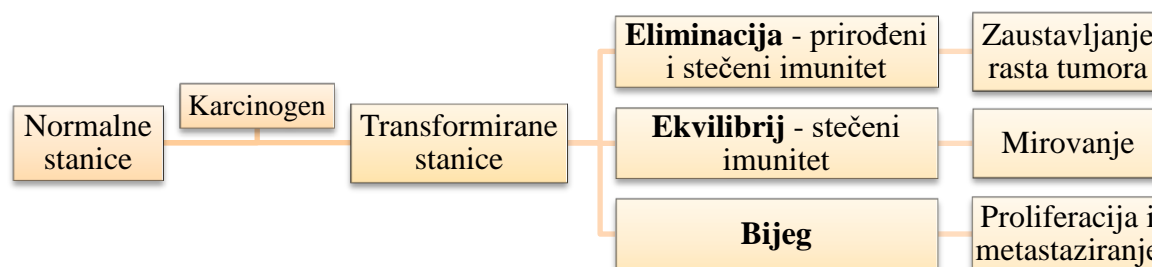
### 2.2.3. Uloga imunskog sustava u nastanku karcinoma

Početak dvadesetog stoljeća njemački znanstvenik Paul Erlich zaključio je da bi maligne bolesti u dugoživućih organizama bile kudikamo češće da nije zaštitne uloge imunskog sustava. Time je postao prvi zagovornik ideje prema kojoj imunski sustav može spriječiti nastanak tumora.<sup>67</sup> Pola stoljeća kasnije njegovu su zamisao Macfarlane Burnet i Lewis Thomas razvili u teoriju nazvanu hipoteza imunskog nadzora karcinoma (engl. *immunosurveillance hypothesis*). Prema njoj, imunski sustav imunokompetentnog organizma ima sposobnost prepoznavanja i uklanjanja maligno promijenjenih stanica. Pretpostavljeno je da je za to zadužen stečeni imunitet.<sup>68,69</sup> Teorija je bila daleko ispred svoga vremena i, kako nije potvrđena ranim istraživanjima uloge imunskog sustava u karcinogenezi, ubrzo je odbačena.<sup>70,71</sup> Da bi objasnili sve veću pojavnost malignih bolesti, znanstvenici su razvili teoriju o imunskoj neprepoznatljivosti tumora. Kako su stanice raka genetski modificirane normalne stanice, pretpostavljeno je da eksprimiraju uobičajene stanične proteine čime izbjegavaju prepoznavanje od strane imunskog sustava.<sup>72</sup>

Tek početkom ovog stoljeća teorija imunskog nadzora dobila je svoju djelomičnu znanstvenu potvrdu.<sup>73</sup> Robert Schreiber i suradnici utvrdili su da su tumori u imunokompetentnih miševa slabije imunogenični od tumora nastalih u miševa kojima nedostaje imunski sustav. Time su potvrdili postojanje imunskog nadzora, ali kao dijela procesa koji su nazvali imunskim uređivanjem (engl. *immunoediting hypothesis*). Teorija imunskog uređivanja ističe dvostruku ulogu imunskog sustava u nastanku tumora, s jedne strane zaštitnu, a s druge promocijsku. Proces započinje djelovanjem karcinogena, virusne infekcije, kronične upale ili drugih uzroka koji dovode do promjene stanica. Taj proces može se zaustaviti djelovanjem tumor-supresorskih mehanizama.<sup>73</sup>

Ukoliko do transformacije ipak dođe, stanice prolaze kroz proces imunskog uređivanja koji se sastoji od triju faza. U prvim dvjema promijenjene stanice mogu biti uništene ili zaustavljene u daljnjem rastu, dok u trećoj dolazi do bijega tumorskih stanica i tada imunski blokada rasta tumora više ne postoji (Slika 10). Izbjegavanje imunskog prepoznavanja danas se smatra jednim od najvažnijih obilježja tumorskog rasta (Slika 3).<sup>73</sup>

Nakon što transformirane stanice „pobjegnu” mehanizmima imunskog prepoznavanja, otvara se mogućnost njihova nekontroliranog rasta i bujanja, što dovodi do proliferacije tumora i metastaziranja. Imunosupresija se u tumorskom mikrookolišu događa zbog slabe imunogeničnosti tumorskih antigena, poremećenog predočavanja antigena i iscrpljivanja limfocita T kao najvažnijeg elementa stečene imunosti.<sup>73,74</sup> Imunologija tumora vrlo je kompleksno i još nedovoljno istraženo područje znanosti. Ipak, napredak koji se dogodio u posljednja dva desetljeća doveo je do boljeg razumijevanja etiologije malignih bolesti, kao i do uvođenja imunoterapije u njihovo liječenje.<sup>75</sup>



**Slika 10.** Pojednostavljeni prikaz procesa imunskog uređivanja

Preuzeto i prilagođeno prema: Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331(6024):1565-70. doi:

10.1126/science.1203486<sup>73</sup>

### 2.3. KRONIČNA UPALA

Iako upala predstavlja jedinstveni odgovor imunskog sustava na bilo koji za organizam štetan događaj, njezino predugo trajanje može dovesti do ozljede tkiva i nastanka autoimunih bolesti i karcinoma. Danas se zna da kronična upala dovodi do genetskih promjena kao što su točkaste mutacije u tumor-supresorskim genima, ali i do epigenetskih promjena, na primjer metilacije DNA. Sva ova stanja mogu biti začetak teških kroničnih bolesti.<sup>4</sup>

Ozljeda tkiva bilo koje vrste pokreće u organizmu mnoštvo složenih, u prvom redu imunskih procesa. U njima sudjeluju različite stanice i isprepleću se brojne molekule i signalni putevi. Ti procesi imaju dvojaku funkciju: što brže i učinkovitije uklanjanje štetnog podražaja uz što bolji oporavak oštećenog tkiva.<sup>76</sup>

Da bi se uništile zaražene ili oštećene stanice, pokreće se proces njihove programirane smrti, to jest apoptoze. To je fiziološki proces koji u uobičajenim situacijama omogućava uklanjanje neželjenih stanica, ali igra važnu ulogu i u nastanku karcinoma. Istovremeno s procesom uklanjanja oštećenih stanica odvijaju se drugi stanični procesi kao što su stanični rast i dijeljenje koji omogućavaju nadomještanje uklonjenih stanica novima odnosno cijeljenje tkiva.<sup>77</sup>

Svi stanični procesi strogo su nadzirani čime je omogućeno njihovo uredno funkcioniranje. Tako u normalnim okolnostima imunski sustav ima sposobnost samoutišavanja. To znači da se nakon uklanjanja stimulusa njegova aktivnost postupno smanjuje do stanja mirovanja. Utišavanje se regulira na više razina koje su međusobno povezane finim mehanizmima.<sup>55</sup>

Međutim, u uvjetima dugotrajne izloženosti štetnom događaju može doći do iscrpljivanja, a potom i do poremećaja regulacijskih mehanizama. Ukoliko dođe do poremećaja na bilo kojoj razini, upalni proces se opetovano pokreće i tako nastaje kronična upala. Ona je karakterizirana trajno i istovremeno prisutnim upalnim i reparacijskim procesima koji dovode do ozljede tkiva i povećavaju vjerojatnost nekontrolirane proliferacije.<sup>76,77</sup>

### 2.3.1. Uloga kronične upale u nastanku karcinoma

Rudolf Virchow još je 1863. godine otkrio prisustvo leukocita u tumorskom tkivu. Pretpostavio je da postoji poveznica između upale i nastanka odnosno progresije tumora. Ta pretpostavka dokazana je tek stotinjak godina kasnije, a danas je jedinstveni stav da upravo kronična upala igra ključnu ulogu u tumorigenezi.<sup>78,79</sup>

Vjerojatna uzročna povezanost različitih kroničnih upalnih procesa i nastanka karcinoma najprije je potvrđena epidemiološkim istraživanjima. Tako je dokazano da upalne bolesti crijeva predstavljaju neovisni rizični čimbenik za karcinom debelog crijeva, kronična *Helicobacter pylori* infekcija za karcinom želuca, a hepatitis B i C za karcinom jetre. Slične poveznice nađene su za mnoge upalne procese i pripadajuće maligne bolesti. U Tablici 1 prikazane su neke kronične infekcije koje se povezuju s nastankom karcinoma.<sup>80</sup>

**Tablica 1.** Primjeri kroničnih infekcija povezanih s nastankom karcinoma

Upala	Karcinom
ezofagitis	karcinom jednjaka
<i>H.pylori</i> gastritis	karcinom želuca
hepatitis B/C	hepatocelularni karcinom
kolecistitis	karcinom žučnog mjehura
pankreatitis	karcinom gušterače
upalne bolesti crijeva	karcinom debelog crijeva
KOPB, tuberkuloza	karcinom pluća
prostatitis	karcinom prostate
HPV cervicitis	karcinom vrata maternice

Preuzeto i prilagođeno prema: Multhoff G, Molls M, Radons J. Chronic inflammation in cancer development. *Front Immunol.* 2012;2:98. doi: 10.3389/fimmu.2011.00098<sup>80</sup>



Danas se smatra da je najmanje 25% svih karcinoma posljedica kronične bakterijske ili virusne infekcije. Zbog toga je kronična infekcija uvrštena u osnovna obilježja nastanka i razvoja karcinoma.<sup>79,80</sup> Do kronične infekcije mogu dovesti: nepotpuno uništenje infektivnog uzročnika, dugotrajna upalna aktivnost ili poremećaj upalnih mehanizama. Koji god uzrok bio, kada jednom nastane kronična je infekcija samoodrživa te pogoduje stvaranju i podržavanju takozvanog tumorskog mikrokoliša.<sup>81</sup>

Tumorski mikrokoliš područje je u koje je zbog upalnog procesa privučeno mnoštvo različitih imunskih stanica kao što su dendritičke stanice, makrofagi, stanice NK i limfociti T. Sve te stanice djeluju sinkronizirano s ciljem uklanjanja uzročnika i popravljivanja nastale štete. Međutim, u stanju dugotrajne upale mogu nastati oštećenja deoksiribonukleinske kiseline koja se više ne mogu popraviti, a to može biti uzrokom transformacije stanica.<sup>77,80</sup>

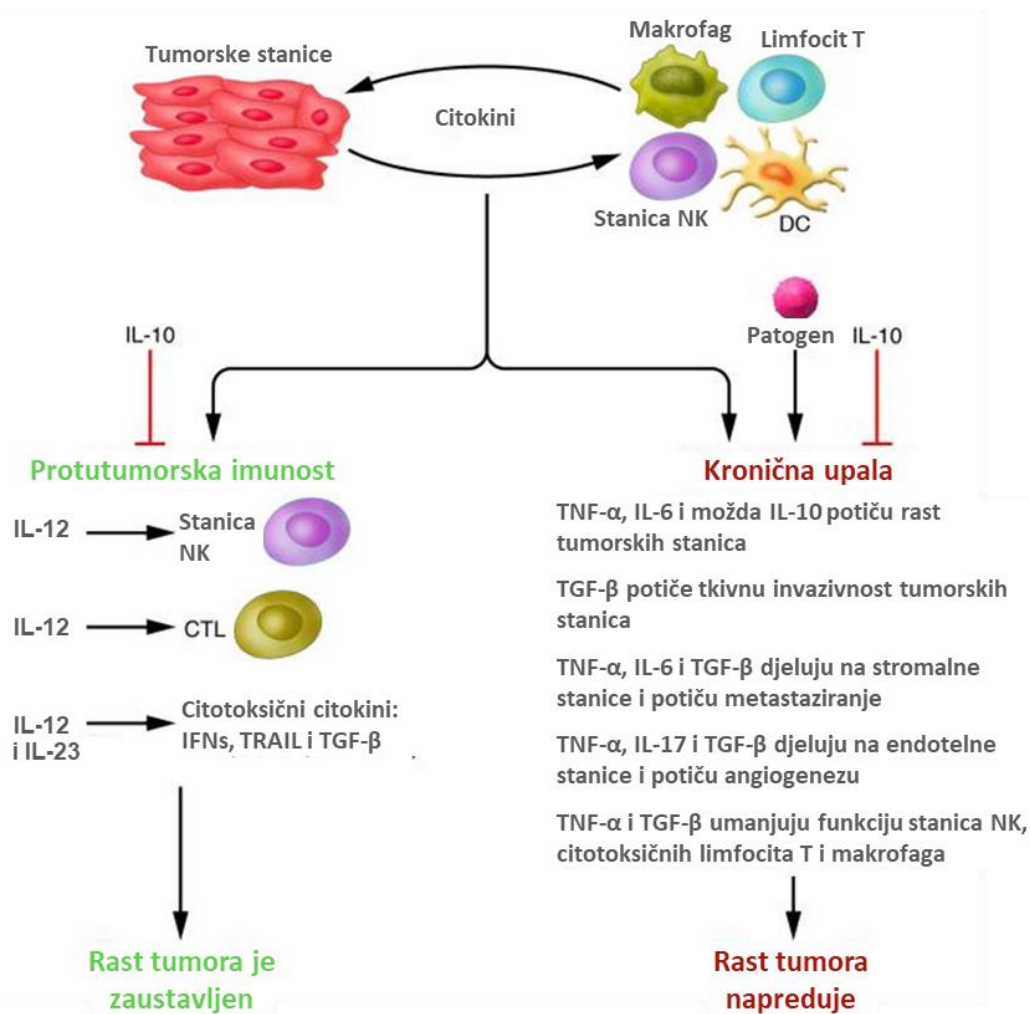
Prema teoriji imunskog uređivanja, transformacija stanica rana je faza procesa nastanka tumora. U toj fazi promijenjene stanice mogu biti uklonjene djelovanjem obrambenih snaga domaćina. Međutim, one su isto tako aktivni sudionici u navedenom procesu.<sup>73,82</sup> Lučeći proupalne i imunosupresijske medijatore, transformirane stanice podržavaju upalu i koče imunski odgovor domaćina, što im omogućava preživljenje. Stvara se nestabilna ravnoteža između imunskih i transformiranih stanica, odnosno tumor-podržavajući mikrokoliš, što olakšava nastanak karcinoma.<sup>81</sup>

Ako imunski sustav domaćina, u kojem najvažniju ulogu imaju limfociti T, uspije nadvladati promijenjene stanice, klinički vidljiv tumor neće se razviti. Ukoliko pak zbog imunosupresijskog djelovanja tumorski promijenjenih stanica imunski sustav dovoljno oslabi, doći će do njihova bijega i daljnjeg nekontroliranog rasta.<sup>73,82</sup>

### 2.3.2. Citokini

Najvažniju ulogu u podržavanju kronične infekcije i posljedičnom razvoju karcinoma imaju različiti citokini, bilo da ih proizvode stanice prirodene imunosti ili luče same tumorske stanice. Razlikujemo proupalne ili tumor-promocijske citokine i protoupalne ili proapoptičke citokine, ovisno o tome potiču li ili zaustavljaju rast tumora (Slika 11).<sup>76,81</sup>





**Slika 11.** Odnos tumorskih i imunskih stanica u tumorskom mikrookolišu

Preuzeto i prilagođeno prema: Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest.* 2007;117(5):1175-83. doi: 10.1172/JCI31537<sup>81</sup>

### 2.3.2.1. Proupalni citokini

Kao poticatelji tumorskog rasta djeluju neki interleukini (IL-6, IL-17, IL-12, IL-23) i TNF-α (engl. *tumour necrosis factor alpha*). Okosnica njihova djelovanja jest signalni put NF-κB. Ovi citokini u tumorskom mikrookolišu imaju dvojak učinak. S jedne strane potiču proliferaciju tumorskih stanica i stvaranje krvožilja, a s druge priječe proces apoptoze. Jedna je od ključnih molekula u nastanku kronične upale i karcinoma TNF-α. U tumorskom mikrookolišu izlučuju ga i stanice domaćina i tumorske stanice, a sudjeluje u nastanku, proliferaciji i metastaziranju različitih vrsta karcinoma te u procesu angiogeneze.<sup>76,81</sup>

Interleukin 6 također ima važnu ulogu u tumorigenezi jer potiče progresiju stanica i koći apoptozu. Proupalni citokini IL-12 i IL-23 pokazuju protutumorski učinak, a IL-17 potiče djelovanje drugih proupalnih citokina, s tim da njegova uloga u nastanku tumora nije u potpunosti istražena.<sup>76,81</sup>

### 2.3.2.2. Protuupalni citokini

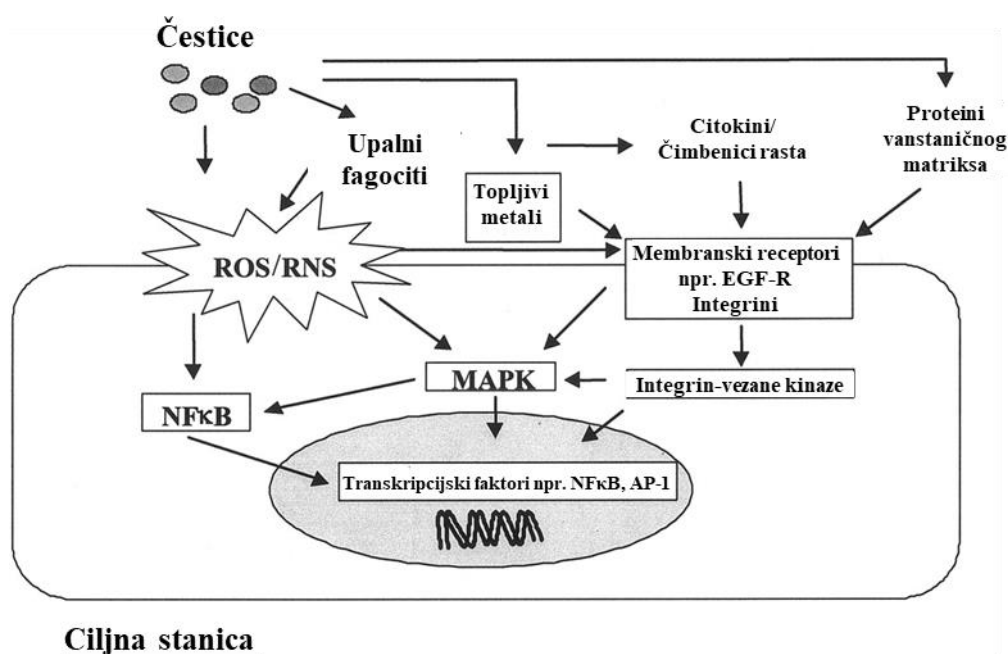
Citokini TRAIL, IL-10 i TGF- $\beta$  jesu citokini s protuupalnim učinkom. Glavni je medijator protutumorske imunosti TRAIL (engl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*). On potiče apoptozu tumorskih stanica, ali samo ako je u tumorskom mikrookolišu postignuta inhibicija signalnog puta NF- $\kappa$ B i pripadajućih citokina, u prvom redu TNF- $\alpha$ . Snažni su imunosupresijski i protuupalni citokini i IL-10 i TGF- $\beta$  (engl. *transforming growth factor beta*), ali u nekim okolnostima mogu poticati rast tumora. Citokin IL-10 djeluje inhibicijski na signalni put NF- $\kappa$ B, sprečavajući stvaranje proupalnih citokina TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-12, što je ujedno mehanizam njegova protutumorskog učinka.<sup>81</sup>

Premda pojedini citokini pokazuju predominantno proupalni ili protuupalni učinak, njihova uloga u upalnim procesima i tumorigenezi znatno je složenija. Naime, nijedna molekula u stanici nije izdvojena i njeno ponašanje uvelike ovisi o okruženju u kojemu se nalazi i međudjelovanjima u koja ulazi. To je osobito izraženo u tumorskom miljeu, gdje i same tumorske stanice luče brojne molekule koje mijenjaju stanični okoliš i preusmjeravaju procese u stanicama.<sup>73,81</sup>

### 2.3.3. Kronična upala i karcinom pluća

Pluća su organ koji je putem udahnutog zraka u direktnom doticaju s vanjskim okolišem. Udahnuti zrak često sadrži različite štetne sastojke, od okolišnog zagađenja preko dima cigareta do različitih patogenih mikroorganizama, što u plućima može potaknuti nastanak reaktivnih kisikovih i dušikovih radikala (engl. *reactive oxygen/nitrogen species*, ROS/RNS). Ove molekule potiču upalni odgovor, dakle izlučivanje citokina, kemokina i drugih medijatora upale te privlačenje imunskih stanica u pluća. Ukoliko se radi o kratkotrajnoj izloženosti štetnom spoju, nakon njegova uklanjanja upalni proces će se zaustaviti i uspostaviti će se ravnotežno stanje.<sup>77,83</sup>

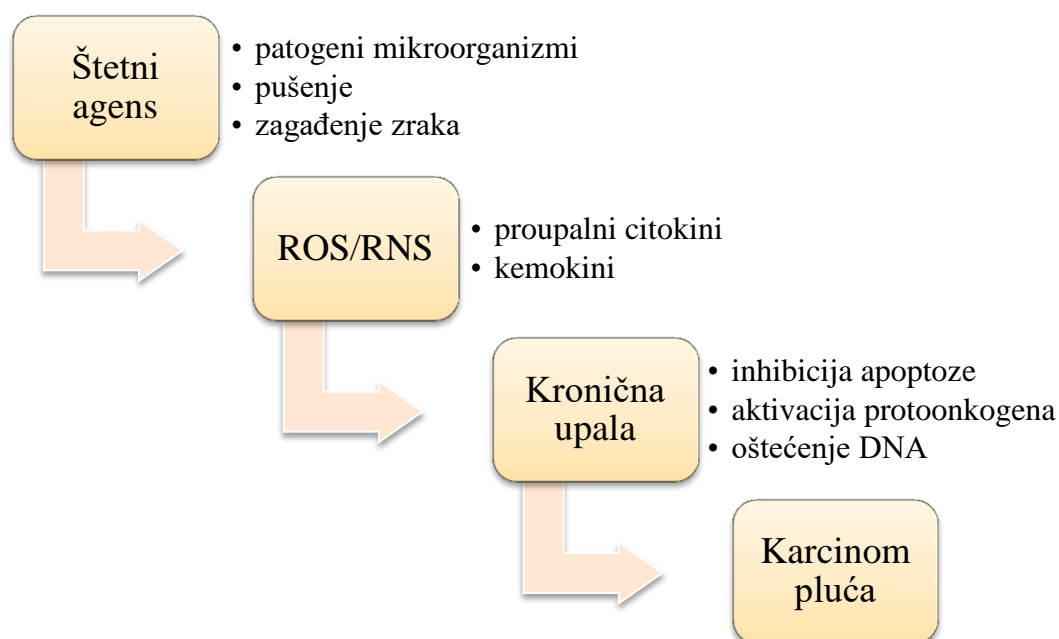
Međutim, opetovana ili dugotrajna izloženost djelovanju bilo kojeg od navedenih štetnih spojeva dovest će do prekomjerne proizvodnje molekula ROS/RNS. Premda u mnogim biološkim procesima ove molekule imaju važnu ulogu kao unutarstanični glasnici, njihova prevelika količina ključna je u razvoju kronične upale u plućima i nastanku karcinoma pluća. Molekule ROS/RNS nestabilne su molekule iz skupine slobodnih radikala. U slučaju njihove prekomjerne produkcije dolazi do poremećaja signalnih mehanizama u stanici (Slika 12), ali i do strukturnih staničnih oštećenja. Najvažniji učinak izravno je oštećenje deoksiribonukleinske kiseline i kromosoma. Do njega dolazi i kod normalnih staničnih procesa, ali u manjoj mjeri, pa se oštećenja mogu popraviti.<sup>77,84</sup>



**Slika 12.** Utjecaj molekula ROS/RNS na signalne puteve u stanici

Preuzeto i prilagođeno prema: Knaapen AM, Borm PJA, Albrecht C, Schins RPF. Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *Int J Cancer*. 2004;109(6):799-809. doi: 10.1002/ijc.11708<sup>84</sup>

Osim oštećenja genetskog materijala, molekule ROS/RNS imaju i druge štetne učinke kao što su: inhibicija apoptoze, poticanje proliferacije stanica, poticanje nekontroliranog lučenja proupalnih citokina i transkripcije gena koji su u normalnim okolnostima utišani. Svi ovi procesi postupno dovode do kronične upale, a u konačnici mogu dovesti i do nastanka karcinoma pluća (Slika 13).<sup>77</sup>



**Slika 13.** Shematski prikaz nastanka kronične upale i karcinoma pluća

Preuzeto i prilagođeno prema: Azad N, Rojanasakul Y, Vallyathan V. Inflammation and lung cancer: Roles of reactive oxygen/nitrogen species. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2008;11(1):1-15. doi: 10.1080/10937400701436460<sup>77</sup>

Kronična upala nastaje kada organizam izgubi sposobnost kontrole nad akutnom infekcijom i jedan je od bitnih preuvjeta karcinogeneze. Najvažnijim događajem pri tome se smatra nestabilnost genoma, odnosno povećani broj mutacija od kojih su u nastanku tumora najvažnije mutacije u onkogenima i tumor-supresijskim genima.<sup>76,77</sup>

Gen *TP53* (engl. *tumor protein P53*) važan je tumor-supresijski gen koji je uključen u brojne signalne puteve u stanici, od kojih je najvažniji pokretanje programirane stanične smrti. Kada je mutiran, dolazi do inhibicije procesa apoptoze. Mutacije ovog gena nađene su u tumorskim stanicama različitih karcinoma, a kod karcinoma pluća to je najčešće mutirani gen. Nalazi se u više od polovice karcinoma pluća, a osobito često kod karcinoma malih stanica i karcinoma pločastih stanica.<sup>77,85</sup>

Karcinom pluća u svom nastanku prolazi nekoliko faza. U prvoj fazi nastaju kromosomske abnormalnosti i oštećenje DNA. Ukoliko se istovremeno poremete reparacijski mehanizmi, nastaju točkaste mutacije ili mutacija *K-ras*, što dovodi do gubitka funkcije tumor-supresijskih gena i/ili aktivacije onkogeni. Slijedi faza klonalne ekspanzije promijenjenih stanica koja u završnoj fazi prelazi u nekontroliranu progresiju.<sup>77</sup>

## 2.4. TOLLU SLIČNI RECEPTORI

Otkriće Tollu sličnih receptora, to jest TLR-a, predstavlja prekretnicu u izučavanju imunskih procesa u čovjeka. Prvi humani TLR otkriven je 1997. godine, gotovo deset godina nakon što je sličan transmembranski protein otkriven u *Drosophila*.<sup>13,86</sup> Do danas ih je u sisavaca otkriveno trinaest, a u kralješnjaka više od dvadeset. Kod čovjeka je sveukupno otkriveno deset funkcionalnih TLR-a.<sup>15,87,88</sup> Pripadaju skupini receptora koji prepoznaju uzorke (engl. *pattern recognition receptors*, PRR) kojima je zajednička osobina prepoznavanje motiva (PAMPs) koji se nisu mijenjali tijekom evolucije, a koji su karakteristični za brojne patogene organizme. Motivi ili uzorci koje ovi receptori prepoznaju mogu biti različite molekule, a uglavnom su to komponente stanične stijenke mikroorganizama koje imaju ključnu ulogu u njihovoj fiziologiji. Sažeto su prikazani u Tablici 2.<sup>15,87</sup>

**Tablica 2.** Receptori koji prepoznaju uzorke i njihove značajke

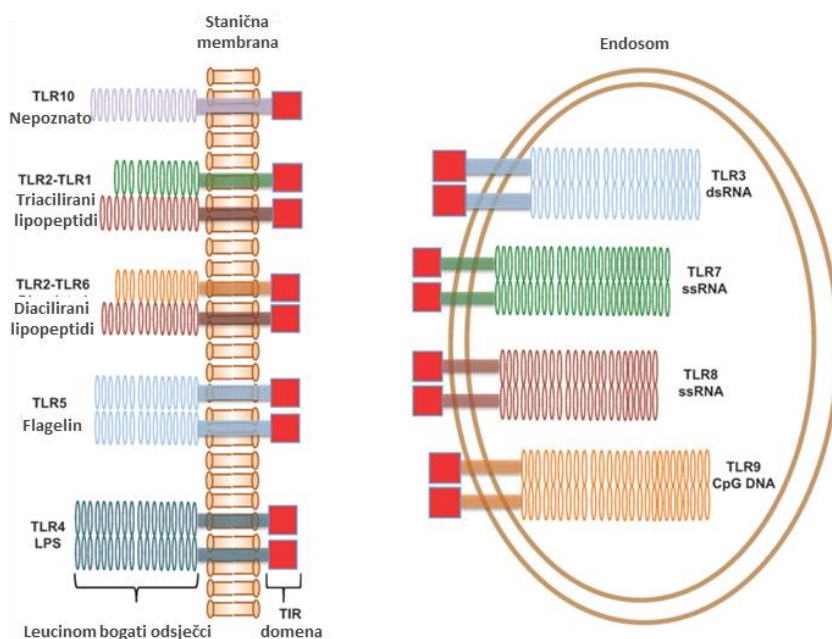
PRR	Položaj u stanici	Ligandi (PAMPs)	Patogeni
TLR	vezani za membrane	RNA, lipopeptidi, LPS, flagelin	virusi, bakterije
CLR	vezani za membrane	glikani, glikoproteini	gljivice, virusi, paraziti, bakterije
NLR	u citoplazmi	peptidoglikani	bakterije
RLR	u citoplazmi	RNA	virusi

Iako sve funkcije TLR-a još uvijek nisu poznate, oni su najbolje istražena grupa receptora koji prepoznaju uzorke, a koji još obuhvaćaju receptore CLR (engl. *C-type lectin receptors*), NLR (engl. *nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)- Leucin Rich Repeats (LRR)-containing receptors*) i RLR (engl. *retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-1) - like receptors*).<sup>88,89</sup>

Skupinu CLR-a čini veliki broj transmembranskih proteina, čija se uloga većinom ne zna. Osim što su kao i TLR-i vezani za membrane, zna se da sudjeluju u prepoznavanju različitih mikroorganizama, između ostalog gljivica, pri čemu im kao ligandi služe glikani iz stanične stijenke gljivica.<sup>89</sup>

Preostale dvije skupine nalaze se u citosolu. Velika obitelj NLR-a od preko dvadeset unutarstaničnih proteina slične građe, ali različitih funkcija, sudjeluje u prepoznavanju unutarstaničnih bakterija, dok su RLR-i zaduženi za prepoznavanje virusne ribonukleinske kiseline. Značajno je napomenuti da se virusna RNA (engl. *ribonucleic acid*) i RNA domaćina koja se može naći u citosolu, to jest prijenosna i glasnička RNA (engl. *transfer ribonucleic acid*, tRNA; *messenger ribonucleic acid*, mRNA), međusobno razlikuju.<sup>88,89</sup>

Budući da su prvi otkriveni, TLR-i su, kao što je navedeno, najbolje istražena skupina receptora koji prepoznaju uzorke. Po strukturi su transmembranski proteini skupine I, a s obzirom na položaj u stanici, dijele se na TLR-e izražene na staničnoj površini (TLR1/2/4/5/6/10) i unutarstanične TLR-e (TLR3/7/8/9) koji su smješteni na membranama endoplazmatskog retikuluma (Slika 14).<sup>88,90</sup>



**Slika 14.** Položaj TLR-a na staničnoj membrani i u endoplazmatskom retikulumu

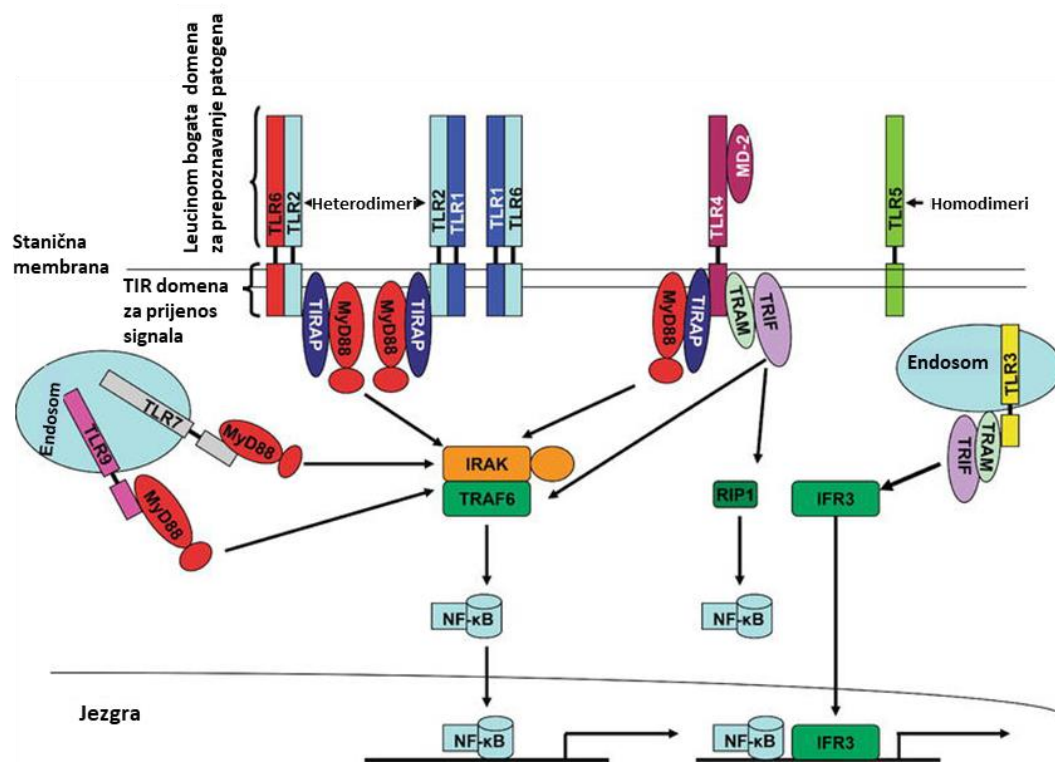
Preuzeto i prilagođeno prema: Godfroy JI 3rd, Roostan M, Moroz YS, Korendovych IV, Yin H. Isolated Toll-like receptor transmembrane domains are capable of oligomerization. PLoS One.

2012;7(11):e48875. doi: 10.1371/journal.pone.0048875<sup>90</sup>



Građeni su od vanjske podjedinice, transmembranskog dijela i unutarstanične domene (Slika 14). Vanjska podjedinica ili ektodomena dio je receptora na koji se veže ligand. Sastoji se od 19-25 kratkih ponavljajućih odsječaka bogatih leucinom (engl. *leucine-rich repeats*, LRR) koji tvore strukturu potkove.<sup>15,90</sup> Ektodomena receptora vezanih za staničnu membranu nalazi se s vanjske strane membrane, a ektodomena receptora vezanih za endoplazmatski retikulum s unutarnje strane membrane (Slika 15).<sup>91</sup>

Transmembranski dio receptora kratki je odsječak proteina koji prolazi kroz membranu. To je najslabije istražen dio TLR-a, no ima iznimno važnu ulogu u dimerizaciji receptora. Naime, prilikom vezanja liganda vanjske podjedinice TLR-a tvore dimere. Kod receptora koji tvore homodimere dvije vanjske podjedinice iste vrste receptora međusobno se približavaju tvoreći džep u koji se veže odgovarajući ligand. Receptori koji tvore heterodimere vežu se s drugim receptorima iz iste podskupine (Slika 14).<sup>15,90</sup>



**Slika 15.** Položaj TLR-a u stanici i pripadajući signalni putevi

Preuzeto i prilagođeno prema: Semlali A, Alnemari R, Almalki E, Alrashed R, Alanazi M. Toll-like receptors gene polymorphism and susceptibility to cancer development. U: Liu Y, ur. Genetic diversity and disease susceptibility [Internet]. London: IntechOpen; 2018 [pristupljeno 17.11.2020.]. doi: 10.5772/intechopen.78029<sup>91</sup>

Unutarstanični dio TLR-a naziva se još i TIR domena (engl. *Toll/interleukin-1 receptor*) zbog sličnosti s citoplazmatskom domenom receptora za interleukin-1. Ona se aktivira nakon vezanja liganda na vanjsku domenu receptora i potom stupa u međudjelovanje s TIR domenom adaptacijske molekule, što dovodi do dimerizacije adaptacijske molekule.<sup>90,91</sup>

Svaki TLR prepoznaje karakteristični ligand, odnosno građevnu jedinicu bakterije ili virusa. Vezanjem liganda na vanjsku domenu receptora mijenja se struktura receptora. To omogućava vezanje adaptacijske molekule na unutarstaničnu domenu. Adaptacijska molekula za većinu TLR-a jest MyD88 (engl. *myeloid differentiation primary response protein 88*). Njezinim vezanjem pokreće se unutarstanični signalni put, što rezultira kaskadnom reakcijom fosforilacije, a time i aktivacije molekula IRAK (engl. *IL-1 receptor associated kinase*), i u konačnici aktivacije NF- $\kappa$ B-a i lučenja upalnih citokina.<sup>12,87</sup>

Transkripcijski faktor NF- $\kappa$ B jedna je od ključnih molekula u stanici koja sudjeluje u regulaciji brojnih procesa kao što su upala, razvoj imunskog sustava, stanični ciklus, proliferacija stanice i stanična smrt. Nalazi se u citoplazmi u inaktivnom obliku u kompleksu s inhibicijskim proteinom I $\kappa$ B (engl. *inhibitor of NF- $\kappa$ B*). Različiti signali mogu aktivirati enzim I $\kappa$ B kinazu (engl. *I $\kappa$ B kinase*, IKK), i tako dovesti do razgradnje podjedinice I $\kappa$ B i aktivacije NF- $\kappa$ B-a. Aktivirani NF- $\kappa$ B prelazi u jezgru, gdje pokreće transkripciju DNA u mRNA koja se prepisuje u protein čime se mijenja funkcija stanice.<sup>12,92</sup>

U početku se mislilo da su TLR-i izraženi samo na imunskim stanicama, pa su proučavani u okviru različitih upalnih i imunskih bolesti. Međutim, vremenom je otkriveno da se TLR-i nalaze i na drugim stanicama kao što su fibroblasti i epitelne stanice i da kao specifične ligande, osim građevnih dijelova mikroorganizama, prepoznaju i dijelove razgrađenih vlastitih stanica, tzv. endogene ligande (engl. *damage-associated molecular patterns*, DAMPs). Kasnije je pojačana ekspresija TLR-a nađen na različitim malignim stanicama, tako da je sve više istraživanja koja povezuju mehanizme prirodene i stečene imunosti s karcinogenezom.<sup>15,87,93</sup>

Temeljem podudarnosti niza (engl. *sequence homology*), TLR-i se u kralješnjaka dijele u šest podskupina. Kod ljudi jedna skupina nedostaje, tako da se mogu razvrstati u pet podskupina: TLR1/2/6/10, TLR3, TLR4, TLR5 i TLR7/8/9.<sup>15,93</sup>



### 2.4.1. TLR1/2/6/10

Receptori iz ove skupine vezani su za staničnu membranu. Najznačajniji je TLR2 koji prilikom prepoznavanja liganda tvori heterodimere s TLR1 ili TLR6. Tako nastali kompleksi prepoznaju lipidne dijelove mikroorganizama kao što su lipoteihoična kiselina i lipopeptidi. Lipoteihoična kiselina sastavni je dio stanične stijenke Gram pozitivnih bakterija tako da njezino prepoznavanje omogućava reakciju imunskog sustava na više različitih patogena putem istog uzorka. Receptor TLR10 najslabije je istražen i za sada nije poznat njegov ligand, no istraživanja upućuju na sličnost s ovom skupinom TLR-a.<sup>15,87</sup>

### 2.4.2. TLR3

Unutarstanični receptor TLR3 smješten je na membrani endoplazmatskog retikuluma. Prepoznaje dvolančanu RNA (engl. *double-stranded ribonucleic acid*, dsRNA) koja je proizvod mnogih virusa te je snažan pokazatelj virusne infekcije. Zanimljivo je da ovaj receptor ne prepoznaje oligonukleotide manje od 40 bp (engl. *base pair*). To se objašnjava time što stanica normalno sadrži kratke odsječke dsRNA te bi vezivanje takvih odsječaka na receptor pokrenulo procese protiv vlastitih staničnih elemenata.<sup>15</sup> Kristalna struktura vanjske domene TLR-a prvi je put opisana upravo kod TLR3.<sup>94</sup> Za razliku od ostalih TLR-a, vezanjem liganda za ovaj receptor, pokreće se MyD88 neovisni, to jest TRIF signalni put (engl. *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*).<sup>15,87</sup>

### 2.4.3. TLR4

Prvi TLR otkriven u čovjeka bio je TLR4.<sup>13</sup> On je vezan za staničnu membranu, gdje je zadužen za prepoznavanje lipopolisaharida koji su osnovna sastavnica stanične stijenke Gram negativnih bakterija. Za razliku od drugih TLR-a, za vezanje liganda koristi koreceptorsku molekulu MD-2 (engl. *myeloid differentiation factor 2*). Jedinstven je i po tome što može aktivirati dva unutarstanična signalna puta. U početku se mislilo da se aktivacija oba puta odvija istovremeno sa stanične membrane. Danas se zna da vezanjem liganda za TLR4 najprije dolazi do aktivacije MyD88 puta i proizvodnje proupalnih citokina. Nakon toga procesom endocitoze receptor biva unesen u stanicu gdje, vezan za endosom, pokreće TRIF put i dovodi do stvaranja interferona tipa I.<sup>15,87</sup>

### 2.4.4. TLR5

Na staničnoj membrani smješten je i TLR5. Jedan je od rijetkih receptora iz ove skupine koji veže proteinski ligand. Njegov jedini do sada otkriveni ligand jest flagelin, kuglasti protein koji je osnovna građevna jedinica biča pokretnih bakterija.<sup>87</sup> Otkriće flagelina kao liganda TLR5 datira u 2001. godinu, dok je strukturna osnova prepoznavanja flagelina u receptoru otkrivena 2012. godine.<sup>19,20</sup> Bič u pokretnim bakterijama predstavlja njihov virulentni dio, a prepoznavanje upravo ovakvog uzorka omogućava ovom receptoru da prepoznaje više različitih mikroorganizama kojima je zajednička osobina pokretljivost. Ovaj receptor izražen je u epitelnim stanicama pluća i crijeva. Osobito je jako izražen u dendritičkim stanicama lamine proprije crijeva gdje sudjeluje u kontroli mikrobiote odnosno sadržaja crijevne flore. Flagelin je snažan imunostimulirajući aktivator, tako da TLR5 s jedne strane djeluje kao imunostimulirajući senzor, a s druge kao receptor za pokretne bakterije.<sup>15,19</sup>

### 2.4.5. TLR7/8/9

Struktura ovih receptora otkrivena je tek prije pet do šest godina.<sup>95,96</sup> Oni, uz TLR3, čine skupinu unutarstaničnih TLR-a, a to su receptori koji prepoznaju nukleinske kiseline. No za razliku od TLR3, za koji se veže dvolančana virusna RNA, za njih se vežu jednolančane nukleinske kiseline.<sup>15,89</sup>

Receptori TLR7 i TLR8 imaju važnu ulogu u virusnim infekcijama. Oni vežu jednolančanu virusnu RNA (engl. *single-stranded ribonucleic acid*, ssRNA). Pri tome je TLR7 jako izražen na plazmacitoidnim dendritičkim stanicama, gdje potiče stvaranje interferona tipa I kao odgovor na virusnu infekciju. Za razliku od njega TLR8 je eksprimiran na monocitima te potiče proizvodnju proupalnih citokina, osobito IL-12.<sup>87,89,96</sup>

Receptor TLR9 prepoznaje virusne i bakterijske uzorke vežući jednolančanu DNA (engl. *single-stranded deoxyribonucleic acid*, ssDNA). Karakteristični TLR9 ligandi nemetilirani su CpG DNA nizovi (engl. *5'-C-phosphate-G-3'*) koji se češće javljaju upravo kod bakterija i virusa. Kao ligandi TLR9 djeluju i sintetski CpG oligonukleotidi (ODN). Ovaj je receptor zajedno s TLR7 jako izražen na dendritičkim stanicama, što omogućava prepoznavanje virusne infekcije i poticanje upalnog odgovora.<sup>15,89,97</sup>

### 2.4.6. Uloga TLR-a u nastanku karcinoma

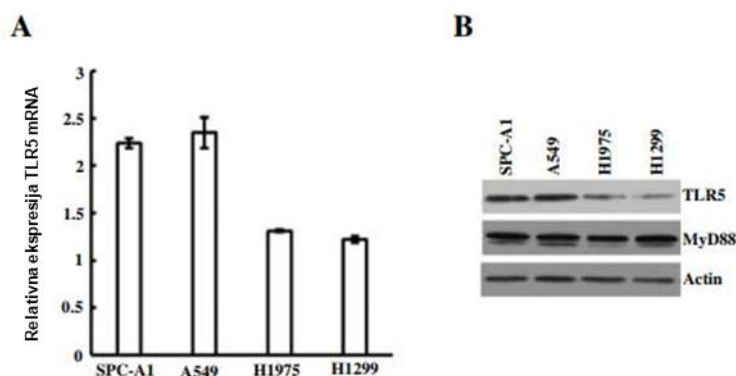
Osim u obrani organizma od infekcije, TLR-i imaju važnu ulogu i u održavanju tkivne homeostaze, sudjelujući u procesima popravka oštećenih tkiva i remodeliranja. Jedna je od pretpostavki da imaju univerzalnu ulogu u karcinogenezi, djelujući kao senzori stanične smrti. Prema novijim istraživanjima TLR-i sudjeluju u procesu karcinogeneze, bilo povećanom ekspresijom na ciljnim stanicama, bilo indukcijom citokina, što za posljedicu može imati proupalni, anti-apoptotički i proliferacijski učinak na tumorske stanice. Iako im brojna istraživanja daju ključno mjesto u staničnim procesima kao što su kronična upala, odgovor na oštećenje tkiva i stanična smrt, uloga ovih molekula u nastanku maligne bolesti još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Ipak, sve veći je broj dokaza koji upućuju na njihovu važnost u biologiji tumora.<sup>98,99</sup>

### 2.4.7. Uloga TLR-a u nastanku karcinoma pluća

U velikoj su mjeri TLR-i izraženi na normalnim plućnim stanicama i stanicama imunskog sustava, osobito epitelnim stanicama bronhalnog stabla i dendritičkim stanicama koje izražavaju gotovo sve humane TLR-e. Svaka od ovih skupina stanica, kao i druge imunosne stanice u tumorskom mikrookolišu, imaju potencijalnu ulogu u nastanku i napredovanju karcinoma pluća, no što je u tom procesu ključno još nije jasno.<sup>100,101</sup>

Nakon što je otkriveno da i tumorske stanice izražavaju TLR-e, njihova uloga u nastanku i razvoju različitih malignih bolesti ispitivana je u brojnim bazičnim, ali i kliničkim istraživanjima. Uloga TLR-a u karcinomu pluća istražuje se tek desetak godina, a dosadašnja istraživanja donekle su oprečna. S jedne strane utvrđeno je da tumorske stanice karcinoma pluća imaju značajno povećanu ekspresiju TLR4, 5, 7, 8 i 9 u odnosu na normalno plućno tkivo. No dok je za povećanu ekspresiju TLR4 i TLR7 nađena pozitivna korelacija s proširenošću i diferencijacijom tumora, metastaziranjem, otpornošću na terapiju i općenito lošim kliničkim ishodom, dotle je za povećanu ekspresiju TLR5 nađena značajna poveznica s boljom prognozom. Kada je proučavan odnos TLR-a prema mehanizmima tumorskog rasta, utvrđeno je da mogu poticati rast stanica tumora pluća putem proliferacijskih i antiapoptotičkih signala. Također je nađeno da sudjeluju u angiogenezi i sposobnosti invazije tumorskih stanica te u ponašanju matičnih stanica tumora.<sup>101</sup>

Prvi rad u kojem je ispitivana ekspresija TLR5 na stanicama karcinoma pluća objavljen je tek 2014. godine. U njemu je istovremeno ispitivana ekspresija TLR5 na uzorcima nemikrocelularnog karcinoma pluća prethodno prikupljenim od oboljelih osoba te na staničnim linijama nemikrocelularnog karcinoma pluća. Imunohistokemijskim bojenjem ekspresija TLR5 potvrđena je u više od 75% uzoraka tkiva pacijenata, s tim da je u više od pola uzoraka ekspresija TLR5 bila visoka. Statističkom analizom nije nađena poveznica ekspresije TLR5 s tumorskim rastom, proširenošću ili drugim odrednicama tumora, osim s metastazama u limfne čvorove. S druge strane, visoka ekspresija TLR5 s velikom statističkom značajnošću bila je povezana s duljim vremenom do progresije bolesti. Ispitivanjem na staničnim linijama utvrđeno je da TLR5 izražavaju sve ispitivane stanične linije karcinoma pluća, s tim da stanice koje jače ekspimiraju TLR5, a to su u ovom slučaju bile SPC-A1 i A549, pokazuju i veću signalnu aktivnost nakon stimulacije specifičnim ligandom flagelinom (Slika 16).<sup>102</sup>



**Slika 16.** Ekspresija TLR5 na stanicama karcinoma pluća: RT-PCR (A), *western blot* (B)

Preuzeto i prilagođeno prema: Zhou H, Chen JH, Hu J, Luo YZ, Li F, Xiao L, i sur. High expression of Toll-like receptor 5 correlates with better prognosis in non-small-cell lung cancer: An anti-tumor effect of TLR5 signaling in non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.*

2014;140(4):633-43. doi: 10.1007/s00432-014-1616-4<sup>102</sup>

Kao i kod drugih malignih bolesti, saznanja o točnoj ulozi TLR-a u nastanku i razvoju karcinoma pluća još uvijek su ograničena, no nedvojben je njihov značaj u tom procesu. Tim više što su rezultati dosadašnjih istraživanja oprečni te ukazuju na moguću protumorsku, ali i protutumorsku ulogu ovih molekula. Osnovne karakteristike pojedinih TLR-a, pripadajući ligandi i adaptacijske molekule sažeto su prikazani u Tablici 3.<sup>101</sup>

**Tablica 3.** Humani TLR-i i njihove karakteristike

<b>TLR</b>	<b>Položaj u stanici</b>	<b>Ligand</b>	<b>Patogen</b>	<b>Adaptacijska molekula</b>
TLR1	stanična membrana	lipopeptidi	bakterije	MyD88
TLR2	stanična membrana	lipopeptidi	G+ bakterije	MyD88
TLR3	endoplazmatski retikulum	dvolančana RNA	virusi	TRIF
TLR4	stanična membrana ili endoplazmatski retikulum	bakterijski lipopolisaharidi	G- bakterije	MyD88 TRIF
TLR5	stanična membrana	flagelin	pokretne bakterije	MyD88
TLR6	stanična membrana	lipopeptidi	bakterije	MyD88
TLR7	endoplazmatski retikulum	jednolančana RNA	virusi	MyD88
TLR8	endoplazmatski retikulum	jednolančana RNA	virusi	MyD88
TLR9	endoplazmatski retikulum	jednolančana DNA	virusi, bakterije	MyD88
TLR10	stanična membrana	-	bakterije	MyD88

### 2.5. POLIMORFIZMI GENA

Projekt istraživanja ljudskog genoma započet je 1990. godine, a dovršen trinaest godina kasnije. Istovremeno s dešifriranjem triju milijardi parova baza u ljudskom genomu otkriveno je i tri milijuna genskih varijanti, a do danas se taj broj višestruko povećao. Stoga se pojavila potreba za istraživanjem značaja prirodno nastalih varijacija u genomu, kao i potreba promjene nazivlja. Naime, pojedini odsječci DNA razlikuju se od jedne do druge osobe. Iako se radi o razlikama u svega 0,1% genoma, upravo su one odgovorne za varijabilnost među živim organizmima, to jest bioraznolikost. Ove varijacije nazvane su polimorfnim varijantama ili polimorfizmima.<sup>103,104,105</sup>

Pojam polimorfizma gena posljednjih je desetljeća u širokoj uporabi. Međutim, ne koristi se jednoznačno te se često u znanstvenoj literaturi pojmovi polimorfizam i mutacija preklapaju, slično kao pojmovi SNP i točkasta mutacija. Do nesuglasja je došlo jer su njihove definicije nastale puno prije nego što je istražena prava priroda ovih genskih promjena. U uobičajenoj ih je praksi katkad teško razlikovati. Zato se sve češće koristi pojam varijante koji podrazumijeva sve navedeno.<sup>106,107,108</sup>

#### 2.5.1. Mutacije

Mutacija je po klasičnoj definiciji bilo koja promjena informacije u DNA. Mutacije mogu nastati u spolnim stanicama, kada se prenose na sljedeću generaciju, i u somatskim stanicama, kada su odgovorne za karcinogenezu i nastanak raka. Ovisno o tome koliki dio DNA zahvaćaju, dijele se na točkaste i kromosomske.<sup>109,110</sup>

Kromosomske mutacije podrazumijevaju promjenu većeg odsječka DNA, odnosno dijela kromosoma koji može biti izbrisan, udvostručen, obrnut, premješten na drugi kromosom ili na drugi način preuređen. Takve mutacije nazivaju se delecijom, duplikacijom, inverzijom i insercijom.<sup>109,110</sup>

Točkaste mutacije predstavljaju promjene u redoslijedu nukleotida u jednom ili nekoliko kodona, a nastaju zamjenom, gubitkom ili umetanjem baze. Postoje tri tipa točkastih mutacija ovisno o njihovu učinku na protein kao što je prikazano u Tablici 4.<sup>109,110</sup>

Točkasta mutacija može promjenom jednog kodona dovesti do ugradnje krive aminokiseline u protein, čime se mijenja njegova funkcija. To je mutacija krivog smisla (engl. *missense mutation*). Ukoliko točkasta mutacija dovede do promjene kodona u STOP kodon, doći će do prijevremenog završetka sinteze proteina koji će zbog toga biti nefunkcionalan. Takva mutacija naziva se besmislenom (engl. *nonsense mutation*). Treća vrsta točkaste mutacije nastaje kada se promjenom jedne nukleinske kiseline mijenja okvir za čitanje, što dovodi do ugradnje pogrešne aminokiseline u protein. Takva mutacija naziva se mutacijom promjene okvira (engl. *frameshift mutation*).<sup>109,110</sup>

**Tablica 4.** Točkaste mutacije

Točkaste mutacije prema načinu nastanka	Točkaste mutacije prema djelovanju na funkciju proteina
Zamjena baze (supstitucija)	Mutacije krivog smisla (engl. <i>missense mutation</i> )
Gubitak baze (delecija)	Besmislene mutacije (engl. <i>nonsense mutation</i> )
Umetanje baze (insercija)	Mutacije promjene okvira (engl. <i>frameshift mutation</i> )

### 2.5.2. Polimorfizmi

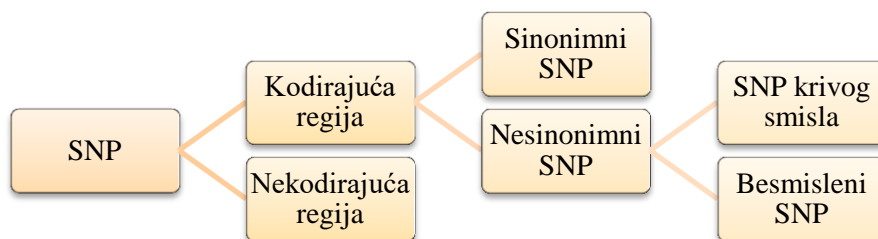
Premda se terminologija u različitim izvorima donekle razlikuje, pod pojmom polimorfizma smatra se svaka varijanta koja se u općoj populaciji pojavljuje učestalošću jednakom ili većom od 1%, dok se varijante koje se pojavljuju rjeđe nazivaju rijetkim varijantama.<sup>107</sup> Ukoliko varijanta dovodi do patološke promjene funkcije gena, naziva se mutacijom, a ukoliko nije jasno značenje varijante, naziva se varijantom nepoznatog značenja (engl. *variant of unknown significance*, VUS). Budući da svega 1-2% ljudskog genoma sadrži odsječke za kodiranje proteina, vladalo je uvjerenje da polimorfizmi ne utječu na aktivnost gena. Međutim, danas se oni, osim za bioraznolikost, smatraju odgovornima i za razlike u osjetljivosti pojedinca na različite okolišne čimbenike, uključujući lijekove, kao i za razlike u osjetljivosti na bolesti.<sup>111</sup>

Postoji nekoliko vrsta polimorfizama. Označavaju se engleskim kraticama: RFLP (engl. *restriction fragment length polymorphism*), VNTR (engl. *variable number of tandem repeats*), SSR (engl. *simple sequence repeat*), SNP (engl. *single nucleotide polymorphism*). U kliničkoj medicini značajne su dvije, SSR i SNP.<sup>107</sup>

### 2.5.2.1. SNP

Polimorfizmi koji nastaju promjenom jednog para baza poznati su pod engleskom kraticom SNP ili SNV (engl. *single nucleotide variant*). Oni su najjednostavnija, ali i najčešća vrsta genskih promjena i čine više od 90% svih varijanti.<sup>108,112</sup> Mogu se naći u kodirajućoj i nekodirajućoj regiji gena, s tim da je uvriježeno mišljenje da u nekodirajućoj regiji nemaju utjecaj na gensku funkciju. U kodirajućoj regiji razlikujemo sinonimne i nesinonimne varijante (Slika 17). SNP koji uzrokuje promjenu redosljeda aminokiselina u proteinu naziva se nesinonimni (engl. *nonsynonymous SNP*), a ukoliko ne dovodi do promjene u funkciji proteina, tihi ili sinonimni (engl. *silent or synonymous SNP*).<sup>112,113</sup>

Nesinonimni polimorfizmi tradicionalno se smatraju odgovornima kako za fenotipske osobine, tako i za druge značajke pojedinaca kao što su metabolizam lijekova, osjetljivost na bolesti i okolišne čimbenike i slično. Donedavno se vjerovalo da većina polimorfizama ne mijenja ekspresiju gena jer je samo jedna četvrtina nesinonimnih, dok preostale tri četvrtine čine tihe mutacije i mutacije u nekodirajućoj regiji. Međutim, i polimorfizmi u nekodirajućoj regiji i tihe mutacije sve više se povezuju s povećanim rizikom od nastanka različitih bolesti.<sup>112,113</sup>

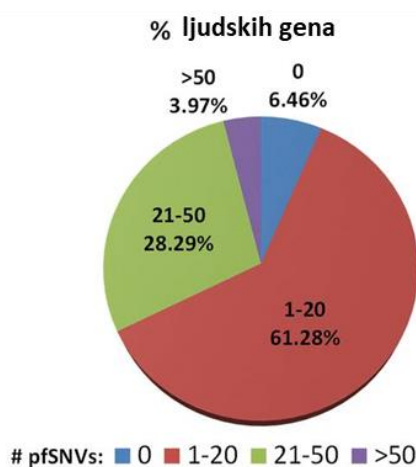


**Slika 17.** Vrste SNP prema položaju u genu i učinku na funkciju proteina

Preuzeto i prilagođeno prema: Chauhan T. An introduction to Single Nucleotide Polymorphism (SNP) [Internet]. [s.l.]: GeneticEducation; c2021 [pristupljeno 17. 11. 2020.]. Dostupno na: <https://geneticeducation.co.in/an-introduction-to-single-nucleotide-polymorphism-snp/><sup>113</sup>



Smatra se da se jedan SNP u prosjeku pojavljuje na svakih tisuću nukleotida, iz čega proizlazi da ih svaki pojedinac u svom genomu ima četiri do pet milijuna. Do danas ih je u različitim populacijama otkriveno više od sto milijuna. Istraživanja su pokazala da više od 93% gena u ljudskom genomu sadrži bar jedan potencijalno funkcionalan SNP (Slika 18). Zanimljivo je da se polimorfizmi iznimno rijetko nalaze u genima koji sudjeluju u bazičnim biološkim procesima, dok su geni koji sudjeluju u imunosnim procesima izrazito polimorfni. Za zaključiti je da su geni ključni za opstanak na neki način zaštićeni, dok se geni koji omogućavaju prilagodbu organizma mijenjaju u skladu s utjecajem okoline.<sup>111,112</sup>



**Slika 18.** Postotak ljudskih gena koji sadrže različit broj moguće funkcionalnih varijanti  
Preuzeto i prilagođeno prema: Jin Y, Wang J, Bachtiar M, Chong SS, Lee CGL. Architecture of polymorphisms in the human genome reveals functionally important and positively selected variants in immune response and drug transporter genes. *Hum Genomics*. 2018;12(1):43. doi: 10.1186/s40246-018-0175-1<sup>111</sup>

Polimorfne varijante u različitim se bazama podataka različito označavaju. Radi lakše komunikacije, NCBI (engl. *National Center for Biotechnology Information*) je uveo jedinstvenu oznaku za svaku varijantu koja se sastoji od kratice rs (engl. *reference SNP; refSNP*) i odgovarajućeg broja.<sup>114</sup> Unatoč tomu, i dalje se koriste HGVS oznake (engl. *Human genome variation society*), vjerojatno stoga što daju više informacija. Naime, svaka varijanta označena je malim slovom, brojem, jednim od triju simbola (<;>=) i velikim slovima. Malo slovo (c, g ili p) odnosi se na sekvenciju gena, kodirajuću DNA ili protein. Broj označava poziciju nukleotida, simboli nastalu promjenu, a velika slova zamijenjene nukleotide. U Tablici 5 primjeri su označavanja varijante ispitivane u ovom radu.<sup>115</sup>

**Tablica 5.** Primjer različitog označavanja polimorfizma gena (varijanta N592S)

cDNK položaj nukleotida	gDNK položaj nukleotida	refSNP ID	SNP položaj aminokiselina
c.1775A>G	g.2417A>G	rs2072493	p.Asn592Ser

### 2.5.2.2. Polimorfizmi gena za TLR-e

U genima za TLR-e otkriveni su brojni potencijalno funkcionalni polimorfizmi. Neki od njih povezuju se s različitim bolestima, uglavnom infekcijama i karcinomima. Prvi dokaz o povezanosti polimorfizma jednog od ovih gena s nekom bolesti objavljen je 2003. godine. U nositelja čestog polimorfizma stop kodona gena *TLR5*, odnosno varijante A392T, dokazana je povećana osjetljivost za upalu pluća uzrokovanu patogenom *Legionella pneumophila*.<sup>25</sup> Nakon toga otkrića nađene su poveznice velikog broja bolesti, prvenstveno infekcija, a potom i karcinoma, s različitim polimorfnim varijantama ovih gena. Tako se varijante gena *TLR1* povezuju s invazivnom aspergilozom, Crohnovom bolešću, malarijom, sepsom te karcinomima želuca i prostate. Kod nekih polimorfizama gena *TLR2* nađena je povećana sklonost infektivnom endokarditisu i tuberkuloznom meningitisu, dok su neke varijante gena *TLR3* nađene kod oboljelih od astme. Iako poveznice s različitim bolestima postoje za polimorfizme svih ovih gena, njihovo značenje tek treba istražiti.<sup>29,116</sup>

#### 2.5.2.2.1. Polimorfizmi gena *TLR5*

Prema podacima objavljenima 2006. godine, genskim mapiranjem u genu *TLR5* nađeno je 18 varijanti, od toga pet tihih i 13 varijanti krivog smisla (engl. *missense SNP*). Ispitivanjem funkcije mutiranih tipova gena *TLR5*, samo tri varijante nisu odgovorile na stimulaciju flagelinom, dok su sve ostale imale istu funkciju kao divlji tip.<sup>31</sup> Prema najnovijim podacima NCBI baze, u genu *TLR5*, kao i u čitavom genomu, broj otkrivenih varijanti višestruko se povećao, tako da je sada u *TLR5* poznato više od 500 varijanti krivog smisla. O većini ovih varijanti nema detaljnih informacija, pa se ne zna ni njihov klinički značaj. Za svega šest objavljenih su publikacije, a jedina koja se pokazala mogućim rizičnim čimbenikom jest varijanta koja je predmet našeg istraživanja.<sup>26</sup>

U genu *TLR5* otkriveno je i 36 besmislenih varijanti, među kojima je za sada klinički značaj nađen samo kod jedne. Radi se o već spomenutoj varijanti rs5744168/A392stop, kod čijih je nositelja nađena povećana osjetljivost za razvoj upale pluća uzrokovane bakterijom *Legionella pneumophila*.<sup>25,26</sup>

Osim s legionarskom bolešću, polimorfizmi gena *TLR5* povezuju se između ostalog sa sistemskim lupusom, upalnim bolestima crijeva, cističnom fibrozom te karcinomima želuca i kolona, s tim da kod nekih bolesti imaju moguću protektivnu ulogu. U svakom slučaju, razumijevanje njihova značenja u bilo kojoj od navedenih bolesti zahtijeva daljnja istraživanja.<sup>29,32,116,117</sup>

### 2.5.2.2.2. Polimorfna varijanta N592S

Varijanta rs2072493/N592S jedna je od češće istraživanih varijanti gena *TLR5* iako se spominje u malom broju literaturnih podataka. Prvi je put opisana 2003. godine kada je u ispitivanoj populaciji nađena kao heterozigot u 35%, a kao homozigot u 5% ispitanika. U drugom ispitivanju učestalost heterozigota ove varijante bila je 30%, dok homozigoti nisu nađeni. Radi se o funkcionalnoj varijanti, što znači da odgovara na aktivaciju flagelinom kao i divlji tip, ali dovodi do smanjenog provođenja signala.<sup>25,31</sup>

Ispitivana je kod oboljelih od legionarske bolesti, ulceroznog kolitisa, karcinoma dojke i debelog crijeva. U istom istraživanju u kojemu je dokazana povezanost varijante rs5744168/A392stop s legionarskom bolešću, to je potvrđeno i za varijantu rs2072493/N592S. Za oboljele od ulceroznog kolitisa nađena je povezanost nekoliko varijanti gena *TLR4* i *TLR5* s bolešću, među njima i varijante N592S, s tim da su istovremeni nosioci više varijanti imali teži oblik bolesti.<sup>21,25</sup>

Što se tiče malignih bolesti, utvrđen je utjecaj ove varijante na specifično i ukupno preživljenje od kolorektalnog karcinoma, pri čemu su nositelji varijante imali statistički značajno manje preživljenje od oboljelih s divljim tipom gena. U istraživanju oboljelih s karcinomom dojke nije nađena veza ove varijante s rizikom za nastanak karcinoma dojke.<sup>32,118</sup>

### 2.5.2.2.3. Polimorfizmi gena za TLR-e kod karcinoma

Danas se zna da su TLR-i izraženi ne samo na stanicama imunskog sustava, već i na stanicama različitih karcinoma, kao i to da signalni putevi u kojima ovi receptori sudjeluju imaju važnu ulogu u nastanku i razvoju malignih bolesti. Međutim, njihova uloga u karcinogenezi još uvijek je predmet istraživanja.<sup>101</sup>

Polimorfizmi gena za TLR-e u kontekstu malignih bolesti istražuju se svega deset do petnaest godina. Unatoč tomu, objavljen je popriličan broj radova i istražen utjecaj velikog broja varijanti na različite karcinome. Polimorfizmi gotovo svih gena iz ove skupine istraživani su kod različitih karcinoma kao što su karcinom dojke, kolona, želuca, štitnjače, jetre, cerviksa, jajnika i pluća. Najviše istraživanja odnosi se na karcinom dojke i debelog crijeva.<sup>91,119,120</sup>

Vrlo je malo objavljenih radova o polimorfizmima gena za TLR-e kod karcinoma pluća. Poveznica s karcinomom pluća istraživana je samo za varijante rs49866790 i rs4986791 na genu *TLR4*. Za varijantu rs49866790 nije nađena korelacija s karcinomom pluća, dok je za nositelje varijante rs4986791 nađen povećan rizik za razvoj karcinoma pluća.<sup>30</sup>

### 3. MATERIJALI I METODE

U ovom radu korištena je stanična linija WI-38 porijeklom iz zdravih pluća te dvije stanične linije, A549 i H1299, porijeklom iz karcinoma pluća. U predložene stanične linije uneseni su plazmidni konstrukti ili adenovirusni vektori s ispitivanim genima, divljim tipom i varijantom rs2072493/N592S gena *TLR5*. Zajedno s konstruktima u stanice je unesen i reporterski sustav za mjerenje aktivacije transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B. Stanice su stimulirane flagelinom, specifičnim ligandom receptora TLR5, u trajanju od 24 sata. U zadanim vremenskim točkama mjerena je sposobnost prijenosa signala u stanicama, proliferacijska i migracijska sposobnost stanica te razina ekspresije specifičnih proteina. Divlji tip i ispitivana varijanta na zdravim i karcinomskim stanicama međusobno su uspoređeni, a ispitan je i utjecaj varijante rs2072493/N592S na vijabilnost stanica i staničnu pokretljivost. Podatci su statistički obrađeni.

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Stanice

###### 3.1.1.1. Humane stanice

- WI-38 stanična linija humanih fibroblasta porijeklom iz zdravih pluća (ATCC<sup>®</sup> CCL-75<sup>™</sup>, SAD)
- A549 stanična linija adenokarcinoma pluća (ATCC<sup>®</sup>, CCL-185<sup>™</sup>, SAD)
- H1299 stanična linija metastatskog karcinoma pluća ne-malih stanica (ATCC<sup>®</sup>, CRL-5803<sup>™</sup>, SAD)

###### 3.1.1.2. Bakterijske stanice

- bakterijska kultura soja *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Thermo Scientific, SAD)

### 3.1.2. Hranjivi mediji

- tekuća podloga za uzgoj stanica *Dulbecco's modified Eagle's medium*, DMEM (Sigma Aldrich, Njemačka)
- tekuća podloga za uzgoj stanica *Minimum Essential medium*, MEM (Sigma Aldrich, Njemačka)
- tekuća podloga za uzgoj bakterija *Luria-Bertani*, LB (Sigma Aldrich, Njemačka)
- OptiMEM medij (Gibco, Thermo Scientific, SAD)

### 3.1.3. Plazmidi

- pcDNA3.1 plazmid obilježen s HA privjeskom i divljim tipom *TLR5* (TLR5-WT-HA)
- pcDNA3.1 plazmid obilježen s HA privjeskom i rs2072493/N592S varijantom (TLR5-N592S-HA)
- pGL3 plazmid obilježen s GFP privjeskom
- pCI plazmid

### 3.1.4. Komercijalni kompleti

- kitovi za izolaciju plazmidne DNA: *Plasmid Mini Kit* i *Plasmid Midi Kit* (Promega, SAD)
- reagens za transfekciju stanica *Lipofectamin 2000* (Thermo Scientific, SAD)
- kit za određivanje luciferazne aktivnosti *Signal Reporter Assay (Luc) Kit NF-κB* (Qiagen, Njemačka)
- kit za kemiluminiscenciju *Clarity™ Western ECL Substrate* (Bio-Rad, SAD)
- kit za utvrđivanje koncentracije citokina IL6, IL8, IL1β i TNFα (eBioscience, SAD)
- antitijela za *western blot* IκB (sc-371), ERK1 (sc-271269), ph-ERK (sc-7383), p38 (sc-390984), ph-p38 (sc-166182), vinkulin (sc-73614) i IgGκ-HRP (sc-516102) (Santa Cruz, SAD)
- kit za određivanje migracijskog potencijala stanica - komore/inserti za nasađivanje stanica (Corning® Costar®, SAD)

### 3.1.5. Kemikalije i biološki materijal

- otopina  $\text{CaCl}_2$ , 50 mM (Kemika, Hrvatska)
- antibiotik ampicilin (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- pufer za lizu stanica *Passive Lysis Buffer* (Promega, SAD)
- reagens za određivanje koncentracije proteina *Pierce BCA Protein Assay* (Thermo Scientific, SAD)
- reagens za određivanje proliferacije stanica 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolij-bromid = metil tiazolil tetrazolijeva sol, MTT (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- dimetil sulfoksid, DMSO (Kemika, Hrvatska)
- boja *Crystal Violet* (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- citostatici cisplatina, karboplatina i paklitaksel
- PBS-T pufer (Sigma Aldrich, Njemačka)
- *Dulbecco's phosphate -buffered saline*, DPBS pufer (Sigma Aldrich, Njemačka)
- flagelin (Invivogen, SAD)
- fetalni goveđi serum *Fetal Bovine Serum*, FBS (Sigma Aldrich, Njemačka)
- agar (Sigma Aldrich, Njemačka)
- glicerol (Kemika, Hrvatska)
- izopropanol (Kemika, Hrvatska)
- etanol, 95% (Kemika, Hrvatska)
- metanol (Kemika, Hrvatska)
- enzim tripsin (Sigma Aldrich, Njemačka)
- otopina *Ponceau S* (Sigma Aldrich, Njemačka)

### 3.1.6. Pribor

- mikrotitarske pločice s 24 jažice
- mikrotitarske pločice s 96 jažica
- pipete, serološke pipete
- staklene epruvete
- staklena tikvica

### 3.1.7. Aparatura

- centrifuga *Sorvall Lynx 4000* (Thermo Scientific, SAD)
- centrifuga *Eppendorf™ 5810R* (Eppendorf, Njemačka)
- tresilica (Eppendorf, Njemačka)
- inkubator za stanične kulture *Heracell-VIOS 160i* (Thermo Scientific, SAD)
- inkubator za bakterijske stanice *Jouan n°1995/3777* (Gemini BV, Nizozemska)
- vakuumski razvodnik *Eluator™ vacuum elution device* (Promega, SAD)
- spektrofotometar *Multiskan EX* (Thermo Scientific, SAD)
- luminometar *Tecan Infinite 200* (Tecan, Švicarska)
- set za SDS elektroforezu *Mini-PROTEAN Tetra* (Bio-Rad, SAD)
- brojač stanica *Z2 Coulter Counter* (Beckman Coulter, SAD)
- *IKA Vortex 2* (IKA, Kina)
- *Trans-Blot Turbo* uređaj (Bio-Rad, SAD)
- *Uvitec Imager* (Uvitec, UK)



### 3.2. METODE

#### 3.2.1. Uzgoj staničnih linija

Stanice su prvi put uspješno izdvojene iz tkiva prije stotinjak godina. Tako izdvojene stanice uzgojene u umjetnom okolišu i u kontroliranim uvjetima nazvane su kulturom stanica. U sljedećih pola stoljeća znanstvenici su uspjeli uzgojiti različite kulture stanica primjenjive za daljnja istraživanja. Kulture stanica izdvojene izravno iz tkiva nazvane su primarnim kulturama, a kulture dobivene od primarnih staničnim linijama. Mnoge stanice u staničnim linijama imaju svojstvo adherencije ili prijanjanja za posudice u kojima se uzgajaju. Konfluentnost stanica u staničnoj liniji predstavlja postotak površine posudice prekriven adherentnim stanicama.<sup>121,122</sup>

Stanična linija WI-38 upotrebljava se u znanstvenim istraživanjima već više od pedeset godina. Razvijena je u ranim šezdesetim godinama prošlog stoljeća i jedna je od prvih staničnih linija iz tkiva zdravih pluća. Izvedena je iz humanih fibroblasta porijeklom iz zdravog plućnog tkiva dobivenog iz tromjesečnog ženskog fetusa bijele rase.<sup>123</sup>

Stanična linija A549 razvijena je iz odstranjenog karcinoma pluća i sadrži adenokarcinomski promijenjene stanice alveolarnog bazalnog epitela. Dobivena je iz tkiva tumora odstranjenog pedesetosmogodišnjoj bjelkinji u siječnju 1972. godine. Stanice su naknadno opetovano kultivirane kroz tri godine te je izmijenjeno otprilike tisuću staničnih generacija. Time su transformirane u staničnu liniju prema kriterijima *in vitro* rasta (lat. na staklu).<sup>124</sup>

Sedamdesetih godina prošlog stoljeća razvijen je veći broj staničnih linija karcinoma pluća malih stanica, a u sljedećem desetljeću i karcinoma nemalih stanica. Stanična linija H1299 razvijena je iz tkiva metastatskog karcinoma pluća nemalih stanica. Tkivo je dobiveno biopsijom limfnog čvora od četrdesetogodišnjeg bolesnika s karcinomom pluća.<sup>125,126</sup>

Jedan od najvećih problema u radu sa staničnim linijama jest zagađenje. Da bi se ono izbjeglo potrebni su oprez i sterilni uvjeti pri rukovanju stanicama, a također je važno stanične linije nabavljati samo od provjerenih dobavljača. Osnovne karakteristike upotrijebljenih staničnih linija navedene su u Tablici 6.<sup>125,126</sup>

**Tablica 6.** Stanične linije korištene u istraživanju i njihove karakteristike

Naziv	Tkivo	Tip stanice	Bolest	Organizam	Dob	Etnička pripadnost
A549	pluća	epitel	karcinom	čovjek	58 godina	bjelkinja
WI-38	pluća	fibroblast	-	čovjek	fetus 3 mjeseca	bjelkinja
H1299	limfni čvor	epitel	metastaza NSCLC	čovjek	43 godine	bijelac

Preuzeto i prilagođeno sa stranice: ATCC. Lung cancer and normal cell lines [Internet]. Manassas, VA: American Type Culture Collection (ATCC); 2021- [pristupljeno 2. 2. 2017.]. Dostupno na: <https://www.atcc.org/en/search#q=lungcancerandnormalcelllines&sort=relevancy&numberOfResults=12><sup>125</sup>

### **Postupak:**

Stanice WI-38 (ATCC® CCL-75™, SAD) uzgojene su u tekućoj podlozi za uzgoj stanica *Minimum Essential medium*, MEM (Sigma Aldrich, Njemačka) obogaćenoj s 10% fetalnog goveđeg seruma *Fetal Bovine Serum*, FBS (Sigma Aldrich, Njemačka). Stanice A549 (ATCC® CCL-185™, SAD) i H1299 (ATCC® CRL-5803™, SAD) uzgojene su u tekućoj podlozi *Dulbecco's modified Eagle's medium*, DMEM (Sigma Aldrich, Njemačka) obogaćenoj s 10% FBS-a. Stanice su rasle u inkubatoru za stanične kulture *Heracell-VIOS 160i* (Thermo Scientific, SAD), u sterilnim plastičnim posudama na temperaturi od 37 °C, u vlažnoj atmosferi s 5% CO<sub>2</sub>. U radu sa stanicama korištene su sterilne serološke pipete i nastavci s filterom za pipete, čime je mogućnost zagađenja kultura svedena na minimum.

### **3.2.2. Uzgoj i transformacija bakterija i izolacija plazmidne DNA**

Bakterije imaju sposobnost transformacije, to jest preuzimanja genetskog materijala iz okoline. Proces se rijetko događa spontano, ali je ključan u biotehnološkim istraživanjima. Metode umjetne transformacije bakterija mogu biti kemijske, fizikalne i električne, a najčešće je korištena ona s kalcijevim kloridom, čijim djelovanjem stanična membrana bakterija postaje propusna za DNA. Takve, kompetentne bakterije mogu se čuvati na vrlo niskim temperaturama ili transformirati dodatkom plazmidnih vektora.<sup>127,128</sup>

Plazmidi su male dvolančane DNA molekule koje imaju sposobnost umnažanja. U stanicama se nalaze izvan kromosoma. Obično su cirkularne iako katkad mogu biti linearne. Prvi plazmid otkriven je 1953. godine, a njegovo otkriće bilo je ključno za razvoj tehnologije rekombinantne DNA. Dvadesetak godina kasnije znanstvenici su plazmide počeli koristiti kao vektore za prijenos genetskog materijala, najprije u bakterijskim stanicama, a nakon što su usavršeni i u staničnim linijama eukariotskih stanica.<sup>128,129,130</sup>

Plazmidi se danas upotrebljavaju kao važan alat u kloniranju gena i kao vektori za prekomjernu ekspresiju gena, što omogućava proizvodnju velike količine proteina. Nakon postupka transformacije, plazmidi se u bakterijskoj stanici repliciraju čime se povećava količina genetskog materijala ugrađenog u plazmidnu DNA. Kao bakterija domaćin najčešće se rabi *Escherichia coli* jer zadovoljava sve potrebne uvjete: lako se transformira, uzgaja i lizira. Izolacija plazmidne DNA iz kulture bakterija bazira se na alkalnoj lizi i najčešće se radi pomoću komercijalnih kompleta. Njihova su prednost zadani protokoli koji omogućavaju ponavljanje postupka pod istim kontroliranim uvjetima.<sup>129,131,132</sup>

Mutageneza je promjena genetskog materijala organizma nastala kao posljedica mutacije. U prirodi se događa spontano ili djelovanjem mutagena, a u laboratoriju se može namjerno izazvati za potrebe istraživanja. Između ostalog se koristi za stvaranje ciljanih promjena u plazmidnoj DNA. Naime, plazmidi koji se koriste kao vektori za kloniranje višestruko su izmijenjeni i prilagođeni za različite namjene te su komercijalno dostupni.<sup>133</sup>

### **Postupak:**

Za umnažanje plazmidnih konstrukata korištena je bakterijska kultura soja *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Thermo Scientific, SAD). Bakterije su uzgojene preko noći u 100 mL tekućeg medija *Luria-Bertani*, LB (Sigma Aldrich, Njemačka), na temperaturi 37 °C, uz trešnju na tresilici (Eppendorf, Njemačka) na 250 rpm. Sljedeći dan suspenzija je prebačena u polipropilenske epruvete i ostavljena na ledu pola sata, potom je centrifugirana (6000 x g, 5 min., 4 °C) u centrifugi tip *Sorvall Lynx 4000* (Thermo Scientific, SAD). Talog bakterija resuspendiran je u autoklaviranoj otopini CaCl<sub>2</sub> (50 mM CaCl<sub>2</sub>), centrifugiran (6000 x g, 5 min, 4 °C) i potom resuspendiran u 10 mL prethodno pripremljene otopine CaCl<sub>2</sub> i glicerola (50 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mL glicerola, 20 mL mq H<sub>2</sub>O - Kemika, Hrvatska). Alikvoti po 100  $\mu$ L ovako pripremljenih bakterija pohranjeni su na -80 °C do uporabe.

Bakterije pripremljene na opisani način uzgojene su bez plazmidnih konstrukata te su kasnije transformirane željenim konstruktima. Plazmidna DNA korištena za potrebe ovog istraživanja (konstrukti divljeg i mutiranog tipa) poklon su prof. dr. sc. Alexandra Webera (Institute for Immunology, Tuebingen, Njemačka), stoga nismo radili mutagenezu.

Ukratko, suspenzija od 100  $\mu$ L bakterija pomiješana je s 5  $\mu$ L plazmidne DNA koja nosi gen od interesa i gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin. U našem slučaju geni od interesa bili su divlji gen za TLR5 i varijanta rs2072493/N592S. Dobivena smjesa inkubirana je na ledu 30 minuta, potom izložena temperaturi od 42 °C tijekom 30 sekundi, nakon čega je suspenzija bakterija ponovno hladena na ledu dvije minute. Bakterijskoj smjesi zatim je dodano 900  $\mu$ L tekućeg LB medija te su bakterije inkubirane jedan sat u inkubatoru za bakterijske stanice *Jouan n°1995/3777* (Gemini BV, Nizozemska) na temperaturi 37 °C, uz trešnju na tresilici (250 rpm). Nakon inkubacije, 100  $\mu$ L bakterijske suspenzije nasađeno je na krutu podlogu: 5 g agar + 400 mL tekućeg LB medija (Sigma Aldrich, Njemačka), uz dodatak 100  $\mu$ g/mL antibiotika ampicilina (Sigma-Aldrich, Njemačka) i ponovno inkubirano tijekom noći na 37 °C. Sljedeći dan pojedinačne kolonije prebačene su u staklene epruvete s 3 mL tekuće LB podloge kojoj je dodan antibiotik ampicilin te su bakterije inkubirane tijekom noći na 37 °C uz trešnju na 250 rpm.

Plazmidna DNA izolirana je iz kulture bakterija pomoću komercijalnih kompleta *Plasmid Mini Kit* i *Plasmid Midi Kit* (Promega, SAD) prema uputi proizvođača. Ovako izolirana plazmidna DNA dalje je korištena za unos ispitivanog gena u stanice.

### **3.2.2.1. Izolacija plazmidne DNA pomoću komercijalnog kompleta *Plasmid Mini Kit***

*Plasmid mini kit* komercijalni je komplet za izolaciju plazmidne DNA visoke čistoće. Protokol je jednostavan i brz. Vrijeme potrebno za izolaciju iznosi deset minuta, a koristi se od 600  $\mu$ L do 3 mL bakterijske suspenzije.<sup>134</sup>

#### **Postupak:**

Za izolaciju plazmidne DNA pomoću komercijalno dostupnog kita *Plasmid mini kit* (Promega, SAD) korišteno je 600  $\mu$ L bakterijske suspenzije koja je uzgojena na prethodno opisani način. Postupak je izveden prema priloženom protokolu za miniprep.

Bakterijska suspenzija prebačena je u epruvetu zapremine 1,5 mL, uz dodatak 100  $\mu$ L pufera za lizu stanica *Cell lysis buffer*, CLC (Promega, SAD). Smjesa je promiješana okretanjem epruvete šest puta, pri čemu se boja otopine promijenila iz neprozirne u bistro plavu, naznačujući kompletnu lizu. Da bi se spriječila denaturacija plazmidne DNA, u smjesu je odmah dodano 350  $\mu$ L neutralizacijske otopine *Neutralization solution*, NSC (Promega, SAD), prethodno ohlađene na 4 - 8 °C. Dobivena smjesa temeljito je promiješana okretanjem epruvete. Po završetku neutralizacije uzorak je požutio, a na dnu se stvorio žuti talog. Smjesa je dodatno promiješana okretanjem epruvete tri puta da bismo bili sigurni da je proces neutralizacije potpun, a potom je centrifugirana na najvećoj brzini u trajanju od tri minute, centrifuga *Eppendorf™ 5810R* (Eppendorf, Njemačka).

Približno 900  $\mu$ L dobivenog supernatanta prebačeno je u kolonicu *PureYield™ minicolumn* (Promega, SAD). Za prijenos supernatanta korištena je pipeta da se ne zahvate stanični ostatci. Kolonica je postavljena u *PureYield™ collection tube* (Promega, SAD) i centrifugirana 15 sekundi na najvećoj brzini. Tekućina koja je prošla kroz sistem je bačena, a minikolonica je postavljena u istu *PureYield™ collection tube*. U minikolonici je dodano 200  $\mu$ L sredstva za uklanjanje endotoksina *Endotoxin removal wash*, ERB (Promega, SAD) te je centrifugirana 15 sekundi na najvećoj brzini. U minikolonici potom je dodano 400  $\mu$ L tekućine za ispiranje *Column wash solution*, CWC (Promega, SAD) te je centrifugirana 30 sekundi na najvećoj brzini. Minikolonica je potom prebačena u čistu epruvetu zapremine 1,5 mL, uz dodatak 30  $\mu$ L pufera za ispiranje *Elution buffer*, EBB (Promega, SAD) direktno u matricu minikolonice. Epruveta je ostavljena jednu minutu na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirana 15 sekundi na najvećoj brzini da bi se odvojila plazmidna DNA. Epruveta je na kraju zatvorena i pohranjena zajedno s plazmidnom DNA na -20 °C.

### 3.2.2.2. Izolacija plazmidne DNA pomoću komercijalnog kompleta *Plasmid Midi Kit*

*Plasmid midi kit* komercijalni je komplet za izolaciju veće količine plazmidne DNA iz bakterijskih kultura. Vrijeme potrebno za izolaciju iznosi trideset minuta, a koristi se od 50 do 250 mL bakterijske suspenzije.<sup>134</sup>

### Postupak:

Iz opisane bakterijske suspenzije 1 mL bakterija prebačen je u staklenu tikvicu sa 100 mL LB medija uz dodatak 100 µg/mL antibiotika ampicilina. Suspenzija bakterija inkubirana je preko noći na 37 °C uz trešnju (250 rpm). Sljedeći je dan bakterijska suspenzija prebačena u plastične epruvete i centrifugirana na 5000 x g u trajanju od deset minuta. Supernatant je bačen, a epruvete su ocijeđene na papirnati ručnik kako bi se odstranio suvišak medija. Talog stanica resuspendiran je u otopini za resuspenziju *Cell resuspension solution*, CRA (Promega, SAD). Potom je dodana otopina za lizu stanica *Cell lysis solution*, CLA (Promega, SAD), nakon čega je lizat nježno promiješan okretanjem epruveta od tri do pet puta. Smjesa je inkubirana tri minute na sobnoj temperaturi. Liziranim stanicama tada je dodana neutralizacijska otopina *Neutralization solution*, NSB (Promega, SAD), epruvete su zatvorene, a smjesa je nježno promiješana okretanjem epruveta od pet do deset puta. Nakon toga lizat je centrifugiran na sobnoj temperaturi, 15.000 x g kroz 15 minuta. Time je izbačen veći dio staničnih ostataka. Preostali stanični debris uklonjen je pomoću kolonica *PureYield™ clearing columns* (Promega, SAD).

Kolonice su povezane umetanjem plave *PureYield™ clearing column*, na vrh bijele *PureYield™ binding column*, a tako sastavljene kolonice postavljene su na vakuumski razvodnik *Eluator™ vacuum elution device* (Promega, SAD) kako je prikazano u protokolu. Očišćeni lizat pretočen je u plavu kolonicu pazeći da istaloženi debris ne upadne u nju. Zatim je primijenjen vakuum. Lizat je prošao kroz propusnu membranu u plavu kolonicu, a DNA se vezala za membranu u bijeloj kolonici. Nastavljeno je usisavanje dok sva tekućina nije prošla kroz obje kolonice. Potom je vakuum polako odvojen od uređaja za filtriranje, plava kolonica je uklonjena, a bijela ostavljena na vakuumskom razvodniku. U kolonicu je dodano 5,0 mL deterdženta za uklanjanje endotoksina *Endotoxin removal wash* (Promega, SAD) kojemu je prethodno dodan izopropanol (Kemika, Hrvatska) te je otopina vakuumom provučena kroz kolonicu. Na kraju je dodano 20 mL otopine za ispiranje kolonica *Column wash* (Promega, SAD), kojoj je prethodno dodan 95%-tni etanol (Kemika, Hrvatska), sve prema uputi proizvođača. Ova je otopina vakuumom provučena kroz kolonicu. Membrana je zatim osušena primjenom vakuuma od 30 sekundi do jedne minute. Ukoliko je površina membrane bila vlažna ili se osjetio miris etanola, korak je ponavljen dodatnih 30 sekundi. Bijela kolonica uklonjena je s vakuumskog razvodnika, a vrhom kolonice dodirnut je papirnati ručnik čime je uklonjen suvišak etanola.

Kolonica je odložena u novu jednokratnu plastičnu epruvetu od 50 mL (npr. Corning ili Falcon™, SAD). Epruveta za mikrocentrifugu od 1,5 mL postavljena je u podnožje uređaja *Eluator™ vacuum elution device* (Promega, SAD), držeći poklopac epruvete otvorenim. Bijela kolonica umetnuta je u uređaj. Tako sastavljeni sklop uređaja *Eluator™ Device* postavljen je na vakuumski razvodnik kako je prikazano u protokolu. Dodano je od 400 do 600 µL vode bez nukleaza *Nuclease-free water* (Promega, SAD) u bijelu kolonicu. Primijenjen je maksimalan vakuum dok sva tekućina nije prošla kroz kolonicu. Tada je epruveta izvađena i pospremljena za DNA kvantifikaciju i gel analizu.

### 3.2.3. Transfekcija stanica i mjerenje signalnog potencijala varijante

Transfekcija stanica metoda je kojom se molekule strane DNA unose u eukariotsku stanicu. Metoda je komplementarna metodi transformacije bakterija, s tim da postoje određene razlike (Tablica 7). Transfekcijom se nukleinska kiselina može u stanicu unijeti privremeno ili trajno. U prvom slučaju govorimo o prolaznoj transfekciji (engl. *transient transfection*), a u drugom o postojanoj ili stabilnoj transfekciji (engl. *stable transfection*). Kod stabilne transfekcije unesena se DNA trajno ugrađuje u genom stanice.<sup>135</sup>

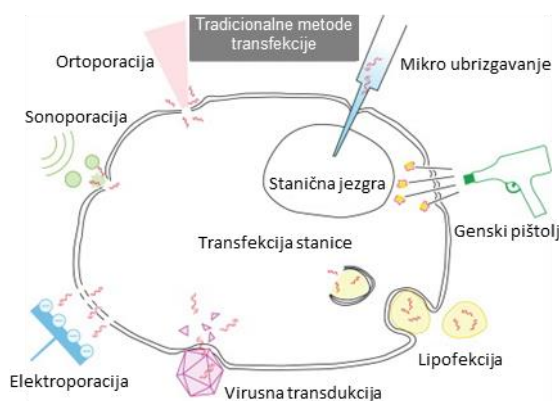
**Tablica 7.** Razlike između postupka transformacije i transfekcije

Transformacija	Transfekcija
Unos genetskog materijala u kompetentne bakterije	Unos genetskog materijala u eukariotske stanice
Pod utjecajem kemijskih, fizikalnih ili električnih čimbenika	Uz pomoć liposoma ili virusnih vektora
Genetski materijal se ugrađuje u bakterijski genom ili ostaje u stanici kao plazmid	Genetski materijal se ugrađuje u genom ili se razgrađuje
Omogućava proizvodnju velikih količina potrebnih proteina ili enzima	Omogućava istraživanja na eukariotskim stanicama u koje je unesen gen od interesa



Postoje različite metode unosa genetskog materijala u eukariotske stanice: fizikalne, kemijske i pomoću genetski modificiranih virusa koji služe kao vektori (Slika 19). Postupak u kojem se koriste virusni vektori naziva se transdukcijom, dok se pojam transfekcije obično rabi za nevirusne metode. Najučinkovitija i najčešće korištena metoda jest lipofekcija. Zasniva se na činjenici da kationski lipidi u vodenoj otopini tvore liposome, odnosno vezikule omotane dvostrukom lipidnom ovojnicom. U doticaju s nukleinskom kiselinom liposomi stvaraju komplekse koji mogu ući u stanicu procesom endocitoze.<sup>135,136</sup>

Kada se takav endosom nađe u stanici, biva razgrađen, a unesena nukleinska kiselina oslobađa se u citoplazmu (Slika 19). Za uspješnu transfekciju DNA važna je faza staničnog ciklusa u kojoj se transfekcija odvija. Da bi ostvarila svoj biološki učinak, DNA mora ući u jezgru, a to je moguće jedino za vrijeme diobe stanice kada se razgrađuje jezgrina ovojnica. Iako djeluje jednostavno, lipofekcija je kompleksan proces i mora biti precizno izvedena.<sup>135,137</sup>



**Slika 19.** Metode transfekcije

Preuzeto i prilagođeno prema: Ding W, Bergeron E, Lachaine R, Meunier M. Nanomaterial-assisted light-induced poration and transfection of mammalian cells. U: Hamblin MR, Avci P, ur. Applications of Nanoscience in Photomedicine. [Amsterdam]: Chandos Publishing; 2015. Str. 331-76. doi: 10.1533/9781908818782.331<sup>137</sup>

Adenovirusi su jedna od najbolje proučenih vrsta DNA virusa. Označavaju se kraticom Ad, a prvi put su izolirani 1953. godine iz ljudskih adenoida po čemu su dobili ime. Mogu inficirati mnogo različitih tipova stanica, jednostavni su za rukovanje i lako se pročišćavaju u visokom titru što ih čini pogodnim nosačima.<sup>138,139</sup>



Još jedna važna osobina ovih virusa jest da se nakon ulaska u jezgru stanice njihova DNA ne ugrađuje u genom domaćina pa ne postoji opasnost od insercijske mutageneze. Zbog toga su se već od osamdesetih godina prošlog stoljeća počeli koristiti kao vektori za prijenos gena. Adenovirusi koji se koriste u molekularnoj biologiji genetski su modificirani tako da nisu patogeni. Važan su alat i u terapiji tumora i izradi cjepiva. U ljudi je prepoznato više od 50 serotipova ovih virusa, a najbolje istraženi i najčešće korišteni su Ad5 i Ad2.<sup>138,139</sup>

Adenovirusni vektori u stanicu ulaze procesom endocitoze prethodno se vežući za receptor CAR (engl. *Coxsackie/Adenovirus receptor*), nakon čega slijedi aktivni prijenos u jezgru. Nakon infekcije virus se u stanici replicira, ali samo ako stanica stabilno eksprimira E1, stanični protein iz skupine ciklina koji ima važnu ulogu u staničnom ciklusu.<sup>140,141</sup>

### 3.2.3.1. Luciferazni test *Dual-glo*

Za mjerenje transkripcijske aktivnosti i signalnog potencijala gena od interesa u molekularnoj se biologiji upotrebljavaju reporterski sustavi. Zovu se reporterima jer stanicama koje ih izražavaju daju mjerljiva obilježja kao što je emitiranje svjetlosti ili luminiscencija. Reporter se u stanicu unosi zajedno s konstruktom koji nosi gen od interesa. Najčešće korišten reporterski sustav sadrži konstrukte s genom za luciferazu.<sup>142</sup>

Luciferaza je enzim koji se nalazi u organizmima sa svojstvom bioluminiscencije kao što su krijesnice. Ovaj enzim u krijesnicama katalizira reakciju pretvaranja luciferina u oksiluciferin čime nastaje mjerljiva svjetlost. Prilikom proučavanja funkcije nekog receptora, odnosno transkripcijske aktivnosti odgovarajućeg gena, mjeri se aktivacija gena za luciferazu to jest reporterskog gena.<sup>142</sup>

Budući da aktivacija reportera može nastati zbog nespecifičnih učinaka kao što su smrt stanice ili inhibicija staničnog rasta, potrebno je imati kontrolni reporterski sustav. Ako je količina oslobođene svjetlosti veća u proučavanom uzorku nego u kontroli, to je posljedica povećanja ekspresije osnovnog reporterskog gena. Ukoliko je došlo do povećanja luminiscencije i u jednom i u drugom sustavu, radi se o nespecifičnom učinku.<sup>142</sup>

Luciferazni test *Dual-glo* (engl. *dual-glo luciferase assay*) komercijalni je komplet koji se sastoji od dvaju različitih supstrata za enzime luciferazu iz krijesnice (*Photinus pyralis*) i morske maćuhice (*Renilla reniformis*).<sup>142</sup>

Luciferaza iz krijesnice katalizira oksidaciju luciferina u oksiluciferin, a luciferaza iz morske maćuhice oksidaciju koelenterazina u koelenteramid. Pri tome se u prvoj reakciji oslobađa svjetlost valne duljine 550-570 nm, a u drugoj 480 nm. Dodavanjem supstrata ovim enzimima oslobađa se svjetlost koja se mjeri na luminometru. Prednosti su ovog testa mogućnost korištenja u različitim staničnim kulturama i dva reporterska gena u istom uzorku. Pri tome aktivnost osnovnog reportera (luciferaze iz krijesnice) korelira sa specifičnim učinkom, a aktivnost kontrolnog reportera (luciferaze iz morske maćuhice) s nespecifičnim učinkom i služi kao interna kontrola.<sup>142</sup>

Upotreba kontrole nužna je da bismo razlikovali učinak transfekcijskog reagensa i nukleinskih kiselina. Osim interne kontrole u transfekciji se koriste najmanje još dvije kontrole, pozitivna i negativna. Pozitivna je kontrola gen s već utvrđenim učinkom i nužna je na početku transfekcije radi postizanja optimalnog transfekcijskog protokola, a negativna se koristi da se isključi utjecaj samog postupka transfekcije.<sup>143</sup>

### **Postupak:**

Postupkom transfekcije u stanične linije WI-38 i A549 unesena je plazmidna DNA s divljim genom ili varijantom rs2072493/N592S gena *TLR5*. Time su dobivene četiri vrste stanica u kojima je postignuta prekomjerna ekspresija gena. Postupak je izveden tako da je na pločice s 96 jažica nasadeno 20.000 stanica po jažici u 100  $\mu$ L medija. Stanice su inkubirane preko noći na 37 °C, uz 5% CO<sub>2</sub> i u vlažnoj atmosferi. Stanice konfluentnosti 80% transfecirane su prema uputama proizvođača. Najprije je 0,6  $\mu$ L transfekcijskog reagensa *Lipofectamine 2000* (Thermo Scientific, SAD) pomiješano s 25  $\mu$ L *OptiMEM* medija (Gibco, Thermo Scientific, SAD) bez seruma i inkubirano pet minuta na sobnoj temperaturi. U novu tubicu dodano je 100 ng reporterskog plazmida NF-kB i 100 ng *TLR5* WT ili varijante rs2072493/N592S u 25  $\mu$ L *OptiMEM* medija. Smjese *Lipofectamina* i DNA potom su pomiješane i ostavljene daljnjih 20 minuta na sobnoj temperaturi. Stanicama je dodano 50  $\mu$ L transfekcijske smjese. Nakon šest sati smjesa je uklonjena iz jažica i zamijenjena sa 100  $\mu$ L staničnog medija s 10% FBS-a. Stanice su inkubirane preko noći u odgovarajućim uvjetima. Sljedeći dan stanice su stimulirane s *TLR5* specifičnim ligandom flagelinom u finalnoj koncentraciji od 50 ng/mL. Nakon 24 sata stimulacije stanicama je uklonjen stanični medij te su stavljene jedan sat u zamrzivač na -80 °C.

Stanice su potom resuspendirane u 75  $\mu$ L staničnog medija i 75  $\mu$ L reagensa *Dual-Glo® Substrate 1* (Qiagen, Njemačka). Stanice su inkubirane deset minuta na sobnoj temperaturi i potom prebačene u pločicu za očitavanje. Nakon dodatne inkubacije od deset minuta izmjerena je luminiscencija *firefly* luciferaze. Potom je dodano 75  $\mu$ L medija s 0,75  $\mu$ L reagensa *Dual-Glo® Stop & Glo® Substrate 2* (Qiagen, Njemačka). Nakon inkubacije od 20 minuta izmjerena je luminiscencija *Renilla* luciferaze. Kao pozitivna kontrola korišten je miks plazmidnog konstrukta koji konstitutivno eksprimira GFP (engl. *green fluorescent protein*), *firefly* luciferazu i *Renilla* luciferazu u omjeru 40:1:1. Također je kao kontrolni plazmid korišten plazmid pCI.

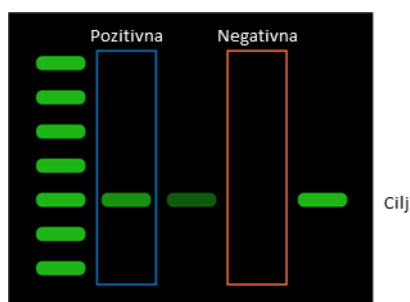
Pokusi su rađeni u triplikatima kao tri nezavisna ponavljanja, pri čemu su u svakom ponavljanju napravljene tri tehničke replike. Izmjerene vrijednosti luminiscencije korištene su za računanje vrijednosti luciferazne aktivnosti pomoću omjera očitanih vrijednosti *firefly* i *Renilla* luciferaze. Za računanje statističke značajnosti korišten je *t*-test za nezavisne uzorke, a rezultati su prikazani u stupčastim grafovima s istaknutom standardnom devijacijom tehničkih replika.

### 3.2.4. Izolacija proteina iz ispitivanih staničnih linija i analiza metodom *western blot*

Izolacija proteina iz staničnih kultura provodi se dodatkom pufera za lizu stanica. Postoje brojne metode, a koja će biti upotrijebljena ovisi o vrsti uzorka, vrsti proteina i njihovom smještaju u stanici, kao i daljnjim postupcima. Prvi je korak liza stanica za koju su se tradicionalno koristile fizikalne metode, dok je danas općeprihvaćena uporaba deterdženata koji djeluju kao puferi i prilagođeni su vrsti stanica. Liza dovodi do poremećaja regulacijskih procesa u stanici, što može aktivirati stanične enzime i uzrokovati razgradnju proteina od interesa. Da bi se to izbjeglo, u smjesu se dodaju inhibitori staničnih enzima, proteaza i fosfataza. Stanični lizati najčešće su korišteni uzorci za analizu *western blot*. Ukupna koncentracija proteina u lizatu određuje se spektrofotometrom, instrumentom koji mjeri intenzitet apsorbirane svjetlosti prilikom prolaska kroz otopinu, iz čega se izračunava masa proteina.<sup>144,145</sup> *Western blot* jedna je od najčešće korištenih analitičkih metoda za određivanje vrste i količine pojedinih proteina u ispitivanom uzorku. Naziv metode nastao je 1981. godine kao igra riječi od naziva *Southern blot*, što je metoda detekcije DNA nazvana po svom izumitelju, engleskom biologu Edwinu Southernu.<sup>145,146</sup>

Uzorcima dobivenim lizom stanica dodaje se pufer, nakon čega se smjesa zagrijava s ciljem denaturacije proteina. Slijedi elektroforeza na gelu poliakrilamida uz prisutnost natrij dodecil sulfata (SDS), čime se proteini razdvajaju ovisno o svojoj molekularnoj masi tako što proteini manje molekulske mase pod djelovanjem električnog polja putuju brže, a proteini veće molekulske mase sporije. Razdvojeni proteini prenose se na nitroceluloznu membranu pod djelovanjem istosmjerne električne struje. Membrana se inkubira primarnim protutijelima koja prepoznaju specifične proteine za koje se vežu. Proteini se detektiraju indirektno vezanjem obilježenih, sekundarnih protutijela na primarna. Sekundarna protutijela mogu se vizualizirati, na primjer imunofluorescencijom. Jačina pruga na membrani određuje se pomoću računala, a dobiveni su podatci semikvantitativni. Nespecifično vezanje protutijela za membranu sprečava se uporabom albumina govedeđeg seruma ili obranog mlijeka u prahu prije dodatka primarnih protutijela.<sup>145</sup>

Radi potvrde rezultata i povećanja specifičnosti metode, koriste se kontrole. Pozitivna kontrola omogućava identifikaciju ispitivanog proteina. Obično je to pročišćeni poznati protein ili stanični lizat koji eksprimira ispitivani protein. Postojanje signala u negativnoj kontroli znak je nespecifičnog vezanja (Slika 20), dakle ona služi kao potvrda specifičnosti rezultata. Iako je sam postupak *western blota* jednostavan, mogući su različiti problemi koji obično dovode do neodgovarajućih rezultata kao što su slabe pruge, nedostatak pruga, neočekivane pruge i slično, a koji se mogu riješiti pažljivim izvođenjem metode, pri čemu je od osobite važnosti pravilno ispiranje uzorka.<sup>145,147</sup>



**Slika 20.** Princip detekcije proteina od interesa metodom *western blota*

Preuzeto i prilagođeno sa stranice: Li-Cor. Positive and negative controls [Internet]. Lincoln, NE:

Li-Cor; c2021 [pristupljeno 10. 2. 2022.]. Dostupno na:

[https://www.licor.com/bio/guide/westerns/control\\_samples](https://www.licor.com/bio/guide/westerns/control_samples)<sup>147</sup>

Vinkulin je citoplazmatski protein molekulske mase 116 kDa. Dio je kompleksa koji povezuje stanice s izvanstaničnim matriksom i susjednim stanicama i nema enzimsku aktivnost.<sup>148</sup>

Proteini ERK1 i ERK2 (engl. *extracellular signal-regulated kinase*) evolucijski su nepromijenjene izvanstanične serin-treonin kinaze. To su proteini molekulske mase 44 i 42 kDa i važan su dio MAPK/ERK (engl. *mitogen-activated protein kinase*) signalnog puta. Taj signalni put ključni je regulator staničnih procesa kao što su proliferacija, apoptoza i odgovor na stres. Ekspresija, a osobito hiperaktivacija ERK signalnog puta, ima važnu ulogu u nastanku i razvoju karcinoma.<sup>149</sup>

Molekula p38 sastoji se od četiriju izoformi proteina koji također pripadaju MAPK obitelji i imaju važnu ulogu u odgovoru organizma na stres. Protein p38 $\alpha$  ima molekulsku masu 38 kDa. Prvi je izoliran te se za njega često koristi oznaka p38. Fosforilirani, odnosno aktivirani oblici ovih proteina označavaju se kraticom ph-ERK i ph-p38.<sup>150,151</sup>

Protein I $\kappa$ B $\alpha$  (engl. *inhibitor of NF- $\kappa$ B, alpha*) jedan je od regulacijskih staničnih proteina čija je uloga inhibicija transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B, s kojim je vezan u kompleks. Aktivacija enzima I $\kappa$ B kinaze, kao što je navedeno, dovodi do razgradnje podjedinice I $\kappa$ B i aktivacije NF- $\kappa$ B-a.<sup>92</sup>

### **Postupak:**

Za potrebe analize proteinske ekspresije metodom *western blot* korišteni su adenovirusni vektori (Ad5) pripremljeni u Laboratoriju za naprednu genomiku prije izrade ove disertacije. Korištena su dva adenovirusna vektora, jedan s divljim tipom, a drugi s varijantom rs2072493/N592S gena *TLR5*. U Laboratoriju za naprednu genomiku prethodno je ispitana i učinkovitost transdukcije WI-38 i H1299 staničnih linija adenovirusom (Ad5) te je određen potreban broj virusnih čestica po stanici za uspješnu transdukciju stanica virusom. Ukratko, stanične linije WI-38 i H1299 nasađene su u pločice sa šest jažica. Po jažici je nasađeno 400.000 stanica. Stanice su inkubirane tijekom 24 sata na 37 °C, u vlažnoj atmosferi, uz 5% CO<sub>2</sub>.

Sljedeći dan stanice su tripsinizirane dodatkom enzima tripsina (Sigma Aldrich, Njemačka), izbrojane na brojaču stanica *Z2 Coulter Counter* (Beckman Coulter, SAD) te su dodani adenovirusni vektori divljeg tipa gena *TLR5* ili varijante rs2072493/N592S. Dodano je 10.000 adenovirusnih konstrukata po stanici. Stanice su inkubirane s virusom jedan sat u inkubatoru za stanične kulture, nakon čega je medij s adenovirusnim konstruktima uklonjen i dodan je medij sa specifičnim TLR5 ligandom flagelinom u koncentraciji 50 ng/mL. Stanice su stimulirane flagelinom u vremenima od 15, 30, 60 i 120 minuta, a jedan od uvjeta bile su i nestimulirane stanice. Nakon protoka određenog vremena stanice su lizirane u 300 µL po jažici *Laemmli* pufera pripremljenog u laboratoriju (pH 6,8, 1 M Tris-HCl, 48% glicerol, 6% SDS, 9% β-merkaptetanol i 0,003% boja bromfenol plavo), prethodno zagrijanog na 95 °C. Takav stanični lizat zatim je podvrgnut sonifikaciji te su uzorci vorteksirani u uređaju *IKA Vortex 2* (IKA, Kina) i zagrijani pet minuta na 95 °C. Na 10%-tni SDS-PAGE gel nanoseno je po 20 µL takvih staničnih lizata te su uzorci podvrgnuti elektroforezi u svrhu razdvajanja proteina u uređaju za vertikalnu elektroforezu *Mini-PROTEAN Tetra* (Bio-Rad, SAD) pri 150 V, u trajanju od 45 minuta. Nakon toga slijedio je prijenos proteina s gela na PVDF membranu koja je prethodno pet minuta aktivirana u metanolu (Kemika, Hrvatska). Filter papiri su ekvilibrirani u puferu za prijenos proteina (48 mM Tris-Base, 39 mM glicin, 20% metanol, 0,3% SDS). Plastični okvir za prijenos složen je tako da je stavljen prvo donji sloj filter papira, zatim PVDF membrana na koju je položen gel i zatim gornji sloj filter papira.

Prijenos proteina s gela na membranu proveden je na *Trans-Blot Turbo* uređaju za brzi prijenos (Bio-Rad, SAD), u trajanju od sedam minuta. Nakon prijena proteina membrana je inkubirana u otopini *Ponceau S* (Sigma Aldrich, Njemačka) od jedne do dvije minute u svrhu provjere uspješnosti transfera proteina na membranu. Višak boje adsorbiran na membranu ispiran je destiliranom vodom dok proteinske vrpce nisu postale jasno uočljive. Nakon vizualizacije prenesenih proteina membrana je ispirana u PBS-T puferu (Sigma Aldrich, Njemačka) u sastavu: 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,1% Tween 20, dok se boja nije potpuno uklonila. Slijedilo je blokiranje membrane u otopini za blokiranje (5%-tna otopina mlijeka u PBS-T puferu) u trajanju od jedan sat. Nakon toga membrana je inkubirana u otopini odgovarajućeg primarnog protutitijela na 4 °C preko noći uz miješanje na tresilici.

Korištena su primarna protutijela za IκB (sc-371), ph-ERK (sc-7383), ph-p38 (sc-166182) i vinkulin (sc-73614) proizvođača Santa Cruz, SAD. Sljedeći dan membrana je ispirana u PBS-T puferu tri puta po 15 minuta, nakon čega je inkubirana u otopini sekundarnog protutitijela IgGκ-HRP (sc-516102, Santa Cruz), u trajanju od jedan sat. Slijedilo je ispiranje membrane tri puta po 15 minuta u puferu PBS-T. Vizualizacija je provedena pomoću komercijalno dostupnog kita za kemiluminiscenciju *Clarity™ Western ECL Substrate* (Bio-Rad, SAD). Kit sadrži dvije otopine, luminol i vodikov peroksid, koje se miješaju u omjeru 1:1. Na membrane je stavljeno 700 μL tako pripremljenog reagensa. Nakon inkubacije od pet minuta proteini su vizualizirani pomoću *Uvitec Imager* uređaja (Uvitec, UK).

Za analizu endogene ekspresije proteina korištene su stanice WI-38 i A549, koje su pripremljene na opisani način, ali bez koraka infekcije. Također, korištena su ranije navedena protutitijela, uz dodatak ERK1 (sc-271269, Santa Cruz) i p38 (sc-390984, Santa Cruz) protutitijela.

Pokusi su rađeni u tri nezavisna ponavljanja, odnosno u tri biološke replike. Ekspresija proteina vizualizirana je pomoću kemiluminiscencijskog reagensa i *Uvitec* uređaja, a razlika u ekspresiji kvantificirana je pomoću *ImageJ* programa.

### 3.2.5. Test ELISA

Test ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) analitička je biokemijska metoda visoke osjetljivosti za određivanje prisutnosti i koncentracije specifičnih proteina pomoću protutijela. Prvi je put opisana 1971. godine, a danas je u širokoj upotrebi za kontrolu kvalitete u industriji te kao dijagnostički test u medicini. Metoda se izvodi na polistirenskoj mikrotitarskoj ploči koja se tretira specifičnim primarnim protutijelom, potom se na njenu površinu vežu antigeni iz uzorka koje želimo ispitati, a zatim specifično detekcijsko protutijelo. Ono je kovalentno vezano na enzim i stvara kompleks s antigenom. Nakon inkubacije ploča se ispiri deterdžentom, čime se uklanjaju proteini koji nisu specifično vezani, i na kraju razvija dodatkom enzimskog supstrata da bi se dobio vidljivi signal koji ukazuje na količinu antigena u uzorku. Danas su u upotrebi komercijalni kompleti, a četiri osnovna testa su: izravni, neizravni, natjecateljski i *sandwich* test ELISA.<sup>152,153,154</sup>



### 3.2.5.1. Test ELISA za provjeru endogene aktivnosti TLR5

Test ELISA korišten je kao dodatna potvrda endogene aktivnosti TLR5 u testiranim stanicama. U tu svrhu određena je koncentracija humanih citokina IL-6 i IL-8. Cilj je bio odrediti koncentraciju citokina u supernatantima uzgojenih stanica stimuliranih flagelinom i tako utvrditi odgovaraju li stanice na specifičnu stimulaciju.

#### **Postupak:**

Stanice WI-38, A549 i H1299 nasađene su na pločice sa šest jažica. Nasađeno je 400.000 stanica po jažici. Stanice su ostavljene 24 sata da se oporave i adheriraju na površinu pločice te su sljedeći dan tretirane flagelinom u koncentracijama 50 ng/mL i 100 ng/mL u trajanju od 24 sata. Supernatanti su prikupljeni i pohranjeni na -20 °C do analize. ELISA esej proveden je prema uputama proizvođača (eBioscience, SAD) s 50 µL prikupljenih staničnih supernatanata.

Ukratko, ELISA mikrotitarska ploča (*Corning Costar 9018* ili *Nunc Maxisorp™*) prekrivena je sa 100 µL po jažici primarnog protutijela u odgovarajućem puferu (*IX Coating Buffer*). Ploča je zatvorena i inkubirana preko noći na temperaturi od 4 °C. Sadržaj jažica potom je aspiriran, a jažice su ispirane tri puta s puferom za ispiranje (*Wash Buffer*) u količini >250 µL po jažici. Učinkovitost ispiranja povećana je tako da su za vrijeme svakog ispiranja jažice ostavljene da se namaču približno jednu minutu. Ploča je obrisana upijajućim papirom da se ukloni ostatak pufera, a *5X ELISA/ELISPOT Diluent* razrijeđen je s deioniziranom vodom (engl. *deionized, DI water*) u omjeru 1:4. Ploča je blokirana s 200 µL *IX ELISA/ELISPOT* razrjeđivača po jažici i inkubirana na sobnoj temperaturi jedan sat.

Standardi su razrijeđeni pomoću *IX ELISA/ELISPOT* razrjeđivača prema uputama proizvođača i to tako da se postigne najveća koncentracija standarda. Tako dobiveni standardi dodani su u odgovarajuće jažice u količini od 100 µL po jažici. Zatim su napravljena dvostruka serijska razrjeđenja najveće koncentracije standarda da se dobije standardna krivulja od osam točaka. U odgovarajuće jažice potom je dodan ispitivani uzorak u količini od 100 µl po jažici, ploča je zatvorena i inkubirana na sobnoj temperaturi kroz dva sata. Sadržaj jažica je zatim aspiriran, a jažice su ispirane tri do pet puta na već opisani način.



U nastavku je u jažice dodano detekcijsko protutijelo prethodno razrijeđeno u *IX ELISA/ELISPOT* razrjeđivaču prema uputama proizvođača. Ploča je zatvorena i inkubirana na sobnoj temperaturi kroz jedan sat. Zatim je postupak aspiracije i ispiranja ponavljen tri do pet puta. U jažice je dodan *Avidin-HRP* u količini 100  $\mu$ L po jažici, prethodno razrijeđen s *IX ELISA/ELISPOT* razrjeđivačem prema uputama. Ploča je zatvorena i inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi. Sadržaj jažica je aspiriran, a jažice su isprane kao što je navedeno ranije, s tim da su namočene u puferu *Wash Buffer* jednu do dvije minute prije aspiracije. Ispiranje je ponovljeno pet do sedam puta. U svaku je jažicu potom dodano 100  $\mu$ L otopine *IX TMB Solution*, a ploča je inkubirana 15 minuta na sobnoj temperaturi. Na kraju je u svaku jažicu dodano 50  $\mu$ L otopine *Stop Solution*, a ploča je očitana na 570 nm.

Pokusi su rađeni u triplicatima kao tri nezavisna ponavljanja, pri čemu su u svakom napravljene tri tehničke replike. Kao interna kontrola uspješnosti testa ELISA korištena su serijska razrjeđenja standarda citokina poznate koncentracije. Prikazani su reprezentativni rezultati jednog ponavljanja, u stupčastim grafovima s izraženom standardnom devijacijom.

### **3.2.5.2. Test ELISA za provjeru utjecaja infekcije adenovirusnim konstruktom na signalne puteve nizvodno od TLR5**

Test ELISA upotrijebljen je i za provjeru utjecaja infekcije stanica različitim brojem adenovirusnih konstrukata obilježenih GFP privjeskom (Ad5-GFP) na aktivaciju signalnih puteva nizvodno od TLR5. U tu svrhu određena je koncentracija humanih citokina IL-6 i IL-8. Cilj je bio odrediti koncentraciju citokina u supernatantima uzgojenih nestimuliranih stanica WI-38 i H1299 kojima je dodan adenovirusni konstrukt bez umetnutog gena te usporediti razine izlučenih citokina s razinama citokina u neinficiranim stanicama i stanicama koje su transfecirane s pGL3 plazmidom obilježenim s GFP privjeskom.

#### **Postupak:**

Za provjeru utjecaja transfekcije na razinu izlučenih citokina nasađeno je 100.000 stanica WI-38 i H1299 na pločice s 24 jažice. Za provjeru utjecaja infekcije adenovirusnim vektorom na razinu izlučenih citokina nasađeno je 50.000 stanica WI-38 i H1299 na pločice sa šest jažica.

## Materijali i metode

---

Stanice su inkubirane preko noći na 37 °C, u vlažnoj atmosferi, uz 5% CO<sub>2</sub>. Sljedeći dan stanicama su transfekcijom dodani pGL3 plazmid obilježen s GFP privjeskom, prazni plazmid pCI bez gena ili infekcijom adenovirusni vektor, također obilježen GFP privjeskom (1250, 2500, 5000 ili 7500 adenovirusnih vektora po stanici).

Za potrebe transfekcije u jednu tubicu dodano je 50 ng plazmida pGL3 eGFP i 750 ng praznog plazmida pCI u 50 µL *OptiMEM* medija bez FBS-a. U drugu tubicu dodano je 2,4 µL transfekcijskog reagensa *Lipofectamina 2000* u 50 µL *OptiMEM* medija bez FBS-a, uz inkubaciju od pet minuta na sobnoj temperaturi. Sadržaji dviju tubica potom su pomiješani (ukupni volumen 100 µL), inkubirani 20 minuta na sobnoj temperaturi i dodani stanicama. Nakon šest sati uklonjen je medij za transfekciju i zamijenjen je medijem za rast stanica (MEM ili DMEM medij s 10% FBS-a).

Za potrebe infekcije stanice su prvo tripsinizirane i njihov je broj provjeren na brojaču stanica *Z2 Coulter Counter* (Beckman Coulter, SAD) te je izračunato koliko µL adenovirusnog štoka treba dodati stanicama da bi ih inficirali s 1250, 2500, 5000 ili 7500 adenovirusa po stanici. Za izračun je korištena sljedeća formula:

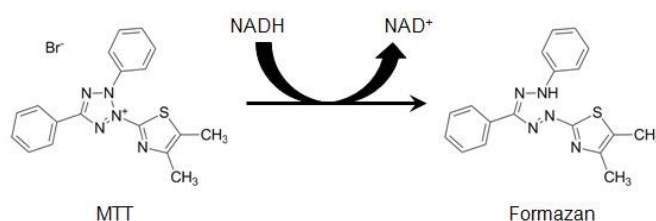
$$\frac{\text{Broj izbrojenih stanica} \times \text{željeni broj adenovirusnih čestica za infekciju} \times \text{broj jažica}}{\text{Koncentracija adenovirusnog štoka} (2 \times 10^9 \text{ virusa}/\mu\text{L})}$$

Izračunati volumen adenovirusnog štoka dodan je u 1 mL MEM medija s 10% FBS-a za staničnu liniju WI-38 ili DMEM medija s 10% FBS-a za staničnu liniju H1299. Medij u kojemu su stanice nasadene potom je zamijenjen medijem koji sadrži viruse. Stanice su inkubirane u optimalnim uvjetima jedan sat, nakon čega je medij s virusima uklonjen i zamijenjen medijem za rast stanica.

Transfecirane i inficirane stanice potom su inkubirane tijekom 48 sati u inkubatoru na 37 °C, u vlažnoj atmosferi, uz 5% CO<sub>2</sub>. Treći dan od nasađivanja stanica pripremljena je pločica za ELISA-u s primarnim protutijelima za IL-6 i IL-8 razrijeđenim 250 puta u *Coating* pufferu. Na pločice je stavljeno 50 µL razrijeđenih protutijela te je pločica inkubirana tijekom noći u hladnjaku na +4 °C. Nakon isteka 48-satne inkubacije (četvrti dan od nasađivanja stanica) prikupljen je medij stanica u tubice, a 50 µL prikupljenog medija dodano je na pločice s pripremljenim primarnim protutijelima. Pločice su potom tretirane na ranije opisani način, sukladno preporukama proizvođača.

### 3.2.6. Test vijabilnosti stanica

Za procjenu vijabilnosti stanica u kulturi koriste se različiti testovi. Tetrazolijeve soli i njihovi produkti, formazani, pokazali su brojne prednosti pred drugim metodama te su u upotrebi dugi niz godina. Naime, u ovim testovima ne upotrebljavaju se radioaktivni izotopi, što je bio veliki nedostatak ranijih metoda. Jedan od najčešće korištenih jest metil tiazolil tetrazolij test, skraćeno MTT. To je kolorimetrijska metoda kojom se ispituje metabolička aktivnost stanica. Vijabilne ili žive stanice imaju sposobnost reducirati tetrazolijevu sol (MTT) u netopljive kristale formazana (Slika 21). Formazan se otapa dodatkom različitih otapala na primjer dimetil sulfoksida (DMSO).<sup>155,156</sup>



**Slika 21.** Redukcija MTT-a u formazan

Preuzeto i i prilagođeno prema: Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, i sur. Cell Viability Assays. U: Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda, MD: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004- [ažurirano 1. 7. 2016.; pristupljeno 10. 3. 2017.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/><sup>156</sup>

Za razliku od MTT-a koji je blijedo žute boje, otopljeni kristali stvaraju ljubičastu otopinu. Intenzitet obojenja mjeri se spektrofotometrom pri 570 nm, izražava kao optička gustoća (engl. *optical density*, OD), a jače obojenje proporcionalno je broju živih stanica. Metoda je precizna i jednostavno se izvodi, a omogućava brzu i točnu procjenu količine živih stanica. Osim procjene vijabilnosti, koristi se za procjenu sposobnosti proliferacije, citotoksičnosti te kemo i radiosenzitivnosti stanica *in vitro*. Često se koristi za određivanje toksičnosti medicinskih proizvoda. Test se radi u mraku, budući da je MTT osjetljiv na svjetlost.<sup>155,156</sup>

Unatoč prednostima, i ova metoda ima svoje manjkavosti. Naime, iako dulje izlaganje stanica MTT-u povećava osjetljivost metode, ono je ograničeno citotoksičnošću kemikalije. Nadalje, MTT ima sposobnost spontane redukcije pri izlaganju izravnoj svjetlosti ili u doticaju s drugim kemikalijama, o čemu treba voditi računa. Osim toga test MTT prvenstveno je metoda procjene stanične vijabilnosti i ukoliko se koristi za procjenu sposobnosti proliferacije stanica potrebno je koristiti odgovarajuće kontrole. Zbog toksičnosti, preporučuje se upotreba ovog testa na kraju istraživanja.<sup>155,156</sup>

Citostatici cisplatina, karboplatina i paklitaksel, korišteni za ispitivanje utjecaja mutacije rs2072493/N592S na vijabilnost stanica H1299 u uvjetima kostimulacije citostaticima i flagelinom, poklon su prof. dr. sc. Marka Jakopovića (Klinika za plućne bolesti Jordanovac, KBC Zagreb, Hrvatska). Navedenim citostaticima su prije provjere združenog učinka sa specifičnim ligandom, u uvjetima prisutnosti/odsutnosti mutacije, određene vrijednosti IC50. To je kratica za koncentraciju koja rezultira s 50%-tnom inhibicijom rasta stanica (engl. *half-maximal inhibitory concentration*) i koristi se kao mjera učinkovitosti lijekova. Definirane IC50 koncentracije, određene za potrebe drugog istraživanja, korištene su i u ovim istraživanjima.

### **Postupak:**

Test MTT koristili smo kako bi utvrdili ima li ispitivana varijanta rs2072493/N592S gena *TLR5*, utjecaj na vijabilnost stanica u uvjetima kostimulacije flagelinom i citostaticima. Za potrebe ove analize korištena je stanična linija metastatskog tumora pluća H1299. Na pločice s 96 jažica nasadeno je 5000 stanica po jažici u volumenu 100  $\mu$ L hranjivog DMEM medija s 10% FBS-a. Stanice su potom inkubirane preko noći na 37 °C, u vlažnoj atmosferi, uz 5% CO<sub>2</sub>. Sljedeći dan stanicama su dodani adenovirusni vektori s divljim tipom gena *TLR5* ili varijantom N592S. Za infekciju stanica korišteno je 10.000 virusnih čestica po stanici. Nakon inkubacije od sat i pol vremena stanicama je uklonjen medij s virusima i dodan je DMEM medij s 10% FBS-a. Stanice su ostavljene u inkubatoru preko noći. Sljedeći dan stanice su tretirane kostimulacijom flagelina i citostatika (cisplatina, karboplatina ili paklitaksel). U hranjivi medij (DMEM, 10% FBS) dodan je flagelin koncentracije 50 ng/mL i citostatici u koncentracijama navedenima u Tablici 8.

**Tablica 8.** Koncentracije citostatika za potrebe kostimulacije H1299 stanica

Koncentracija	Cisplatina	Karboplatina	Paklitaksel
c1	35 $\mu$ M	150 $\mu$ M	2 nM
c2	45 $\mu$ M	170 $\mu$ M	2.5 nM
c3	70 $\mu$ M	200 $\mu$ M	4 nM

Stanice su inkubirane 72 sata u optimalnim uvjetima. Potom im je uklonjen hranjivi medij i dodano 40  $\mu$ L MTT-a otopljenog u mediju. Stanice su inkubirane četiri sata u inkubatoru, nakon čega je dodano 170  $\mu$ L dimetil sulfoksida, DMSO (Kemika, Hrvatska) i inkubirano 15 minuta uz laganu trešnju. Apsorbancija je izmjerena na 570 nm. Kao bazalna razina apsorbancije korištena je apsorbancija medija bez stanica u koji je dodan MTT i DMSO. Rezultati apsorbancije na stanicama potom su umanjeni za vrijednost bazalne apsorbancije i prikazani u stupčastim grafovima.

Radi utvrđivanja utjecaja flagelina na proliferaciju, odnosno vijabilnost stanica koje endogeno ekspimiraju TLR5, proveden je MTT proliferacijski test i na stanicama koje endogeno ekspimiraju TLR5, a koje su stimulirane flagelinom. Za analizu su korištene stanične linije WI-38 i A549. Uspoređen je utjecaj različitih koncentracija flagelina na preživljenje stanica u uvjetima stimulacije u trajanju od 24, 48 ili 72 sata (Tablica 9).

**Tablica 9.** Koncentracije flagelina korištene za stimulaciju WI-38 i A549 stanica

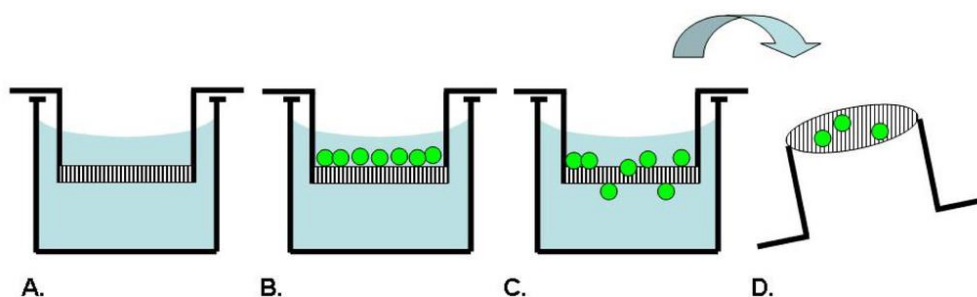
	Koncentracija flagelina
c1	50 ng/mL
c2	100 ng/mL
c3	500 ng/mL
c4	1 $\mu$ g/mL

Ukratko, nasadeno je 5000 stanica A549 i 10.000 stanica WI-38 po jažici na pločice s 96 jažica u volumenu 100  $\mu$ L hranjivog medija sa serumom. Stanice su inkubirane preko noći na 37 °C, u vlažnoj atmosferi uz 5% CO<sub>2</sub>. Sljedeći dan stanicama je uklonjen medij i dodano je 100  $\mu$ L medija s 10% FBS-a i navedenim koncentracijama flagelina.

Stanice su ostavljene u inkubatoru tijekom 24, 48 ili 72 sata. Potom im je uklonjen medij i dodano 40  $\mu\text{L}$  MTT-a otopljenog u mediju. Stanice su inkubirane četiri sata u inkubatoru, nakon čega je dodano 170  $\mu\text{L}$  dimetil sulfoksida i inkubirano 15 minuta uz laganu trešnju. Apsorbancija je izmjerena na 570 nm.

### 3.2.7. Migracijski test

Migracijski test (engl. *transwell cell migration assay*) koristi se za mjerenje stanične pokretljivosti, odnosno sposobnosti migracije stanica kroz permeabilnu membranu pod utjecajem gradijenta testne tvari. Prolazeći kroz membranu stanice se oboje, nakon čega se mogu pobrojati pod mikroskopom.<sup>157,158</sup> Test je prvi upotrijebio doktor Stephen Boyden 1961. godine zbog čega se ova metoda naziva i test Boydenovom komorom.<sup>159</sup> Radi se o jednostavnoj metodi u kojoj se koriste dvije komore različite veličine. U većoj se nalaze tvari koje imaju sposobnost privlačenja stanica (kemoatraktanti), kao što su kemokini, faktori rasta i slično. Manja komora uronjena je u veću i na sebi ima polupropusnu membranu. Stanice čija se pokretljivost ispituje stavljaju se u manju komoru koja se potom uranja u veću (Slika 22). Osim za ispitivanje stanične pokretljivosti, metoda se koristi i za ispitivanje invazivnosti stanica što je od osobite važnosti u istraživanjima malignih bolesti.<sup>160,161</sup> Za postizanje točnih rezultata važno je odabrati odgovarajuću gustoću otopine s adekvatnom koncentracijom kemoatraktanta, odgovarajuću veličinu pora na membrani i primjereno vrijeme inkubacije. Glavna prednost ovog testa njegova je osjetljivost.<sup>157,158</sup>



**Slika 22.** Shematski, pojednostavljeni prikaz migracijskog testa

Preuzeto i prilagođeno prema: Hulkower KI, Herber RL. Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. *Pharmaceutics*. 2011;3(1):107-24. doi: 10.3390/pharmaceutics3010107<sup>160</sup>

### **Postupak:**

Migracijski test koristili smo za usporedbu stanične pokretljivosti stanica koje nose divlji tip odnosno varijantu rs2072493/N592S gena *TLR5*. Za potrebe ove analize korištena je stanična linija metastatskog tumora pluća H1299. Na pločice sa šest jažica nasadeno je 350.000 stanica po jažici. Stanice su potom inkubirane do sutradan u optimalnim uvjetima. Sljedeći dan stanice su inficirane adenovirusnim vektorom koji nosi divlji tip gena *TLR5* ili varijantu N592S. Za infekciju je korišteno 10.000 virusnih čestica po stanici. Nakon inkubacije od jednog sata medij s adenovirusnim vektorima uklonjen je sa stanica, a stanice su stimulirane flagelinom u koncentraciji 50 ng/mL, tijekom 24 sata. Potom je uklonjen medij s flagelinom i stanicama je dodan medij bez seruma, u svrhu izgladnjivanja stanica. Sljedeći dan stanicama je uklonjen medij, potom su isprane s DPBS puferom *Dulbecco's phosphate-buffered saline* (Sigma Aldrich, Njemačka) i odlijepljene s površine jažica s 1 mL enzima tripsina. Nakon tripsinizacije, 40.000 stanica u 100  $\mu$ L medija nasadeno je u inserte za migracijski test. U dno jažica dodano je 650  $\mu$ L medija s 10% FBS-a i stanice su potom inkubirane 24 sata u optimalnim uvjetima. Sljedeći dan inserti su isprani u DPBS puferu, a potom fiksirani u boji *Crystal violet* (Sigma-Aldrich, Njemačka) kroz deset minuta. Posušeni inserti slikani su na mikroskopu.

### **3.2.8. Statistička obrada podataka**

Dobivene rezultate za divlji tip i varijantu rs2072493/N592S gena *TLR5* statistički smo obradili. Za obradu podataka koristili smo metode deskriptivne statistike. Varijable su izražene kao aritmetička sredina +/- standardna devijacija. Razlike srednjih vrijednosti između skupina računali smo uz pomoć *t*-testa za nezavisne uzorke ili pomoću analize varijancija (ANOVA testa). Značajnost je izražena kao *p*-vrijednost, a za sve testove *p*-vrijednost  $\leq 0,05$  smatrana je značajnom. Statistička analiza napravljena je pomoću GraphPad Prism programa.

### 4. REZULTATI

#### 4.1. Endogena aktivnost receptora TLR5 u staničnim linijama zdravih pluća i tumora pluća

Signalni put nizvodno od TLR5 aktivira se vezanjem specifičnog liganda flagelina na receptor. Uslijed toga receptor se dimerizira i potiče regrutaciju adaptacijske molekule MyD88. Nizvodno dolazi do aktivacije molekula IRAK1, IRAK4, TRAF6 (engl. *tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 6*) i IKK te u konačnici do translokacije NF- $\kappa$ B-a u jezgru, transkripcije i lučenja proupalnih citokina: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$ .

Budući da je glavni cilj ovog istraživanja bio ispitati ulogu varijante gena *TLR5* u nastanku karcinoma pluća u *in vitro* uvjetima, najprije su provedeni testovi provjere endogene aktivnosti ovog gena u korištenim staničnim modelima. Učinjenim analizama ispitana je razina endogene aktivnosti TLR5 u staničnoj liniji fibroblasta zdravih pluća (WI-38) te staničnim linijama primarnog adenokarcinoma pluća (A549) i metastaze karcinoma pluća izolirane iz limfnog čvora (H1299).

U tu svrhu stanice su stimulirane specifičnim TLR5 ligandom flagelinom u koncentraciji 50 ng/mL ili 100 ng/mL kroz 24 sata ili su ostavljene nestimulirane. Tako pripremljene stanice bi, ukoliko dođe do aktivacije TLR5 signalnog puta, trebale lučiti proupalne citokine u stanični medij zbog aktivacije signalnih puteva nizvodno od TLR5. Za potrebe analize nisu određivane apsolutne koncentracije testiranih citokina (IL-6 i IL-8), već je mjerena promjena razine apsorbancije, čije je povećanje u korelaciji s promjenom odnosno povećanjem koncentracije citokina.

##### 4.1.1. Endogena aktivnost receptora TLR5 u staničnim linijama WI-38, H1299 i A549, određena testom ELISA

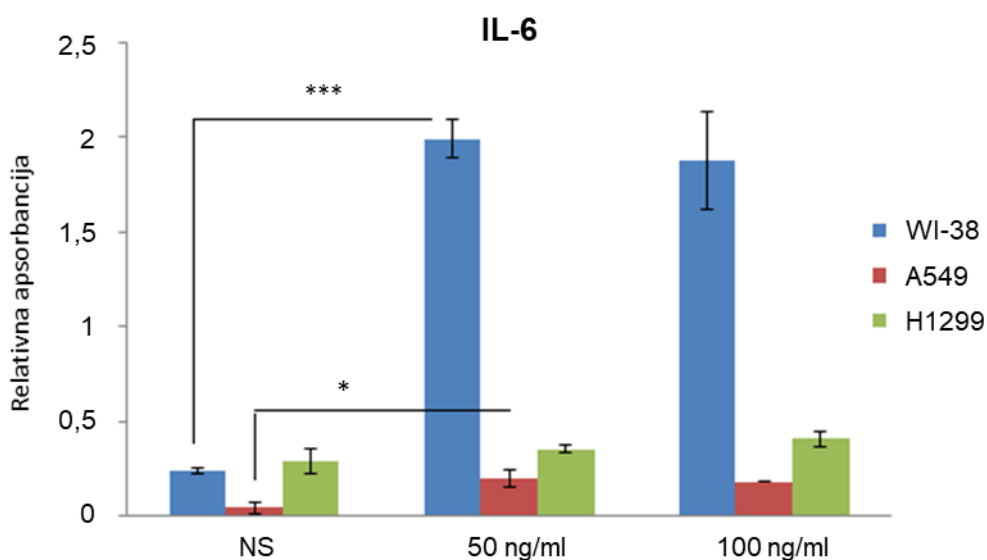
Rezultati testa ELISA specifičnog za humani IL-6 pokazali su da zdrave stanice fibroblasta pluća (WI-38), nakon tretmana flagelinom tijekom 24 sata, odgovaraju na stimulaciju specifičnim ligandom i to u obje testirane koncentracije flagelina. Detektirane razine izlučenog IL-6 u staničnom supernatantu stanica tretiranih s 50 ng/mL flagelina i 100 ng/mL flagelina, izražene kao vrijednost apsorbancije, bile su statistički značajno povišene u odnosu na razinu IL-6 u nestimuliranim stanicama WI-38 ( $p < 0,001$ ) - Slika 23.



## Rezultati

Rezultati su također pokazali da stanice adenokarcinoma pluća (A549) u stimuliranim uvjetima pokazuju blagi porast razine izlučenog proupalnog citokina IL-6 u odnosu na nestimulirane stanice. Razina izlučenog IL-6 u stanicama A549 tretiranim s 50 ng/mL flagelina bila je statistički značajno povišena u odnosu na stanice koje nisu tretirane ( $p=0,02$ ). Isto vrijedi i za stanice tretirane sa 100 ng/mL flagelina ( $p=0,04$ ) - Slika 23.

Stimulirane stanice metastatskog karcinoma pluća (H1299) nisu pokazale značajan trend porasta razine izlučenog citokina IL-6 u odnosu na nestimulirane stanice, neovisno o koncentraciji flagelina korištenoj za stimulaciju stanica (Slika 23).



**Slika 23.** Određivanje razine proupalnog citokina IL-6 iz staničnih supernatanata metodom ELISA testa

Prikazani su rezultati jednog pokusa s trima tehničkim replikama i izraženim standardnim devijacijama. Izražene su  $p$  vrijednosti za stimulirane uvjete u odnosu na nestimulirane stanice:

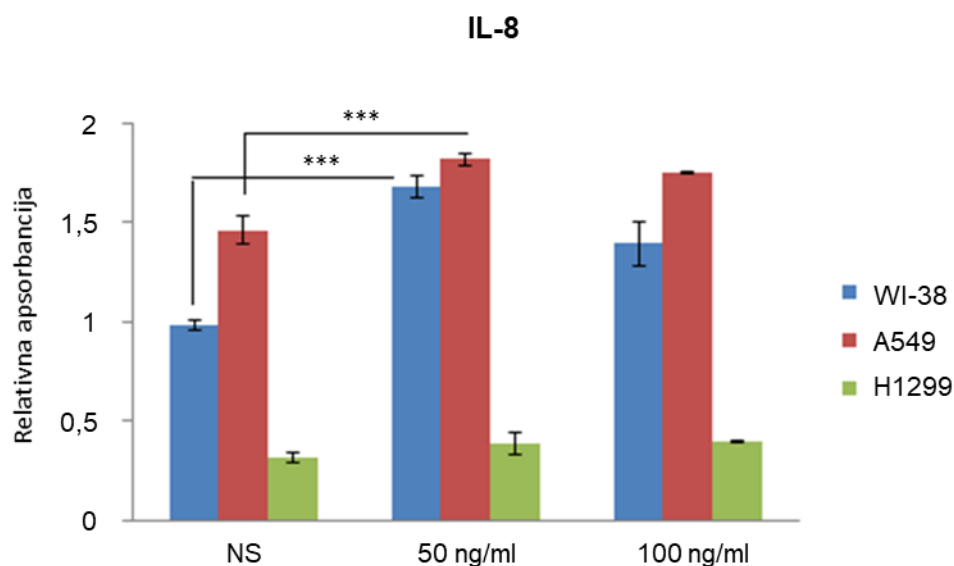
\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ . NS = nestimulirane stanice

Rezultati testa ELISA specifičnog za humani IL-8 pokazali su da stanice WI-38 odgovaraju na 24-satnu stimulaciju flagelinom i to u obje testirane koncentracije flagelina. Razine izlučenog IL-8 u staničnom supernatantu stanica WI-38 tretiranih s 50 ng/mL flagelina i 100 ng/mL flagelina, izražene kao vrijednost apsorbancije, bile su statistički značajno povišene u odnosu na njegovu razinu u nestimuliranim stanicama WI-38 ( $p < 0,001$ ) - Slika 24.

## Rezultati

Slični rezultati dobiveni su za stanice adenokarcinoma pluća (A549) koje također u stimuliranim uvjetima pokazuju porast razine izlučenog proupalnog citokina IL-8 u odnosu na nestimulirane stanice. Razine izlučenog IL-8 u stanicama A549 tretiranim s 50 ng/mL flagelina i 100 ng/mL flagelina bile su statistički značajno povišene u odnosu na razinu istog citokina u stanicama koje nisu tretirane ( $p < 0,001$ ) - Slika 24.

Stimulirane stanice metastatskog karcinoma pluća (H1299) nisu pokazale značajan trend porasta razine izlučenog proupalnog citokina IL-8 u odnosu na nestimulirane stanice, neovisno o koncentraciji flagelina korištenoj za stimulaciju stanica (Slika 24).



**Slika 24.** Određivanje razine proupalnog citokina IL-8 iz staničnih supernatanata metodom ELISA testa

Prikazani su rezultati jednog pokusa s trima tehničkim replikama i standardnim devijacijama.

Izražene su p vrijednosti za stimulirane uvjete u odnosu na nestimulirane stanice:

\*\*\* $p < 0,001$ . NS = nestimulirane stanice

Zaključno možemo reći da izmjerene vrijednosti apsorbancija nakon tretmana testiranih staničnih linija pokazuju da se, za razliku od stanične linije H1299, stanične linije WI-38 i A549 daju stimulirati flagelinom, što ukazuje na određeni nivo endogene ekspresije receptora TLR5.

No vrijednost apsorbancije u staničnoj liniji A549, u odnosu na apsorbanciju izmjerenu u staničnoj liniji WI-38, ukazuje da stanice A549 slabije odgovaraju na stimulaciju flagelinom. Naime, neovisno o testiranim koncentracijama, porast razine izlučenog IL-6 bio je relativno niži u toj staničnoj liniji (Slika 23). Što se tiče stanica H1299, vidljivo je da ne postoji značajan trend porasta lučenja ni citokina IL-6 niti IL-8 u uvjetima stimulacije flagelinom.

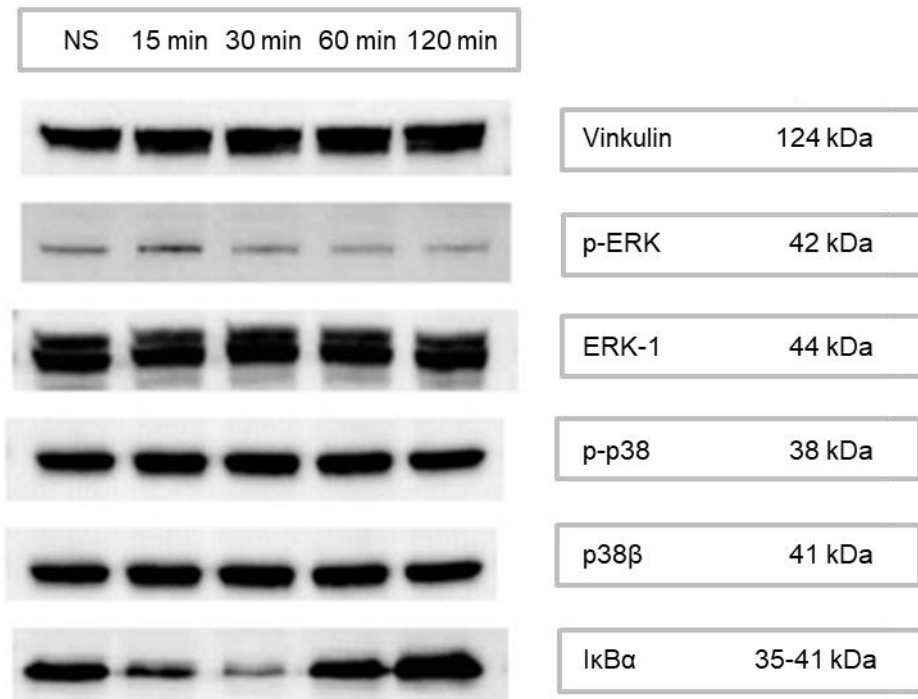
#### **4.1.2. Endogena aktivnost receptora TLR5 u staničnim linijama WI-38 i A549, određena metodom *western blot***

Osim ispitivanja endogene ekspresije TLR5 mjerenjem krajnje točke aktivacije, to jest koncentracije izlučenih proupalnih citokina, u staničnim linijama WI-38 i A549 provjerili smo i stupanj aktivacije nizvodnih signalnih molekula koje sudjeluju u prijenosu signala nakon aktivacije TLR5. Naime, vezanjem liganda flagelina na izvanstaničnu domenu receptora TLR5 dolazi do aktivacije proteina nizvodno od TLR5, kao što su I $\kappa$ B $\alpha$ , p38, JNK (engl. *c-Jun N-terminal kinase*) i ERK. Aktivacija ovih proteina u konačnici dovodi ili do aktivacije transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B ili do aktivacije transkripcijskog faktora AP-1 (engl. *activator protein-1*).

Aktivaciju nizvodnih proteina pratili smo u različitim vremenskim točkama pomoću metode *western blot*. U ovim analizama pratili smo aktivaciju proteina ERK i p38 na način da smo mjerili razinu njihovog fosforiliranog oblika, dok je aktivacija transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B mjerena promjenom stupnja degradacije inhibitora transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B to jest molekule I $\kappa$ B $\alpha$ .

Rezultati analize stupnja aktivacije nizvodnih signalnih molekula pokazali su da stimulacija stanica WI-38 flagelinom već nakon 15 minuta dovodi do fosforilacije proteina ERK1 (p-ERK), nakon čega se uočava slabljenje signala. Nadalje, rezultati su pokazali da je p38 u staničnoj liniji WI-38 aktivan neovisno o vremenu trajanja stimulacije flagelinom, odnosno neovisno o samoj stimulaciji jer nije uočena razlika u stupnju aktivacije p38 između nestimuliranih stanica i stanica stimuliranih flagelinom. Konačno, uočena je aktivacija NF- $\kappa$ B-a, odnosno povećanje stupnja degradacije inhibitora aktivacije NF- $\kappa$ B-a, proteina I $\kappa$ B $\alpha$ , i to tijekom 30 minuta, nakon čega je signal počeo jačati (Slika 25).

WI-38



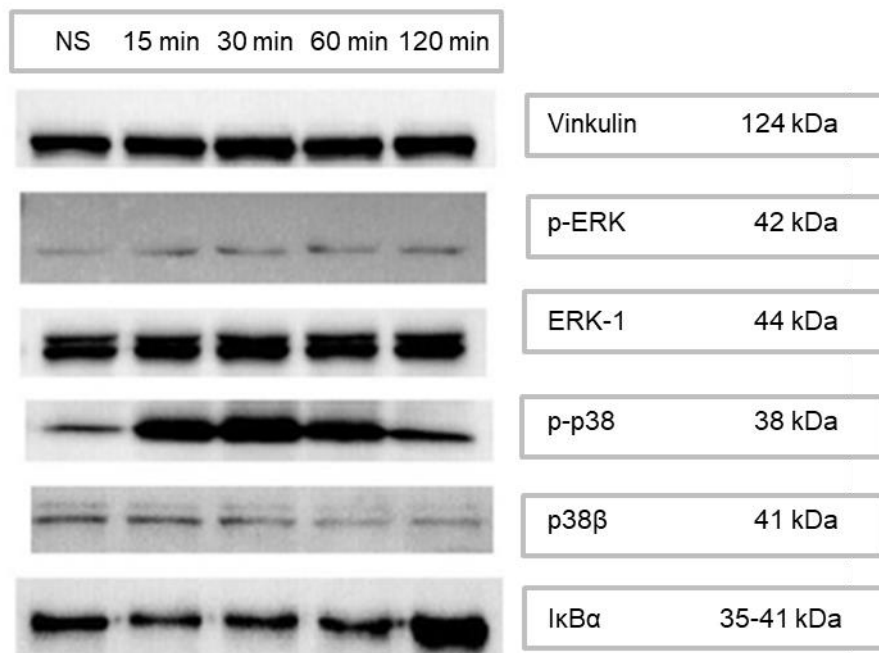
**Slika 25.** Aktivacija TLR5 nizvodnih signalnih puteva uslijed stimulacije flagelinom u staničnoj liniji WI-38

Prikazan je rezultat reprezentativne biološke replike. NS = nestimulirane WI-38 stanice

Rezultati iste analize pokazali su da, u odnosu na nestimulirane uvjete, i stimulacija stanica A549 flagelinom nakon 15 minuta dovodi do blage aktivacije proteina ERK1 fosforilacijom. Nadalje, utvrđena je i znatno izražena aktivacija proteina p38 već nakon 15 minuta stimulacije flagelinom u odnosu na nestimulirane uvjete, a signal je počeo slabiti nakon 60 minuta. Također je uočen i slabiji signal proteina IκBα već nakon 15 minuta stimulacije, a ponovno jačanje signala uočeno je nakon dvosatne stimulacije flagelinom (Slika 26).

U odnosu na stanice WI-38, u kojima je aktivacija NF-κB-a bila najizraženija 30 minuta nakon stimulacije, u A549 stanicama uočeno je da se aktivnost molekule NF-κB značajno ne mijenja, odnosno primijećen je tek blagi pad signala IκBα 15 minuta nakon stimulacije (Slika 26).

A549



**Slika 26.** Aktivacija TLR5 nizvodnih signalnih puteva uslijed stimulacije flagelinom u staničnoj liniji A549

Prikazan je rezultat reprezentativne biološke replike. NS = nestimulirane A549 stanice

U konačnici, možemo reći da je i u kontekstu praćenja aktivacije nizvodnih signalnih molekula moguće zaključiti da stanični modeli korišteni u ovom istraživanju, to jest stanične linije WI-38 i A549, posjeduju određenu endogenu razinu ekspresije gena *TLR5* i da se daju stimulirati specifičnim ligandom flagelinom. Međutim, stupanj aktivacije pojedinih molekula razlikuje se između dvije stanične linije.

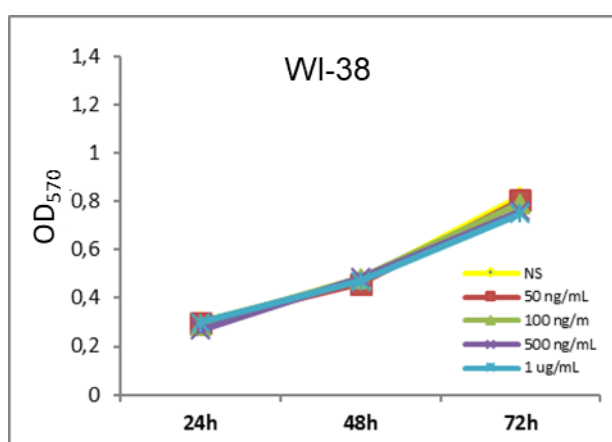
### 4.1.3. Proliferacijski kapacitet staničnih linija WI-38 i A549, stimuliranih TLR5 ligandom flagelinom, određen testom MTT

U sklopu analiza kojima smo provjeravali endogenu aktivnost TLR5 i aktivnost nizvodnih signalnih puteva, ispitivali smo i utjecaj flagelina na proliferacijski kapacitet odabranih staničnih linija. Učinak različitih koncentracija flagelina na preživljavanje stanica tijekom 24, 48 i 72 sata pratili smo metodom MTT proliferacijskog eseja.

## Rezultati

Rezultati ove analize pokazali su da stimulacija stanica različitim koncentracijama flagelina nema utjecaja na proliferacijski kapacitet stanične linije zdravih pluća WI-38. Uočen je sličan proliferacijski kapacitet nestimuliranih stanica WI-38 i stanica WI-38 stimuliranih različitim koncentracijama flagelina (Slika 27).

Rezultati su pokazali da je proliferacijski kapacitet stanica WI-38 neovisan o koncentracijama flagelina odabranima za stimulaciju (50 ng/mL, 100 ng/mL, 500 ng/mL i 1 µg/mL). Naime,  $p > 0,05$  za sve testirane uvjete u odnosu na nestimulirane stanice, u svim trima odabranim vremenskim točkama (24, 48 i 72 sata).

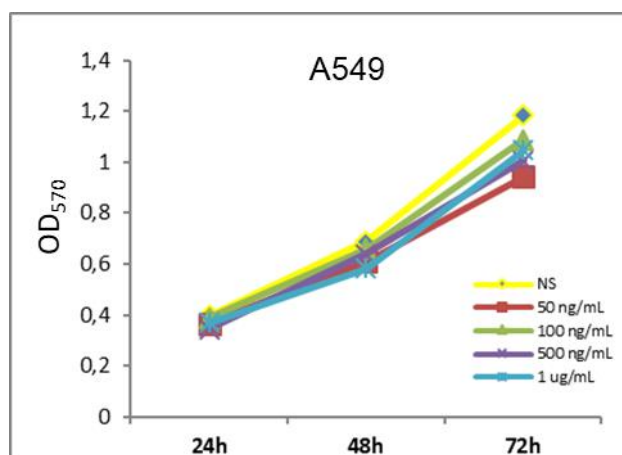


**Slika 27.** Proliferacijski kapacitet stanica WI-38 tretiranih TLR5 specifičnim ligandom flagelinom u različitim koncentracijama u trima vremenskim točkama

Prikazan je rezultat jedne biološke replike.

NS = nestimulirane WI-38 stanice; OD<sub>570</sub> = optička gustoća pri valnoj duljini 570 nm

Rezultati metode MTT na staničnoj liniji A549 također su pokazali da stimulacija flagelinom nema utjecaja na proliferacijski kapacitet ove stanične linije. Iako je uočena blaga razlika između nestimuliranih stanica i stanica tretiranih flagelinom koncentracije 50 ng/mL tijekom 72 sata, ta razlika nije bila statistički značajna. Stanice A549 tretirane većim koncentracijama flagelina (100 ng/mL, 500 ng/mL i 1 µg/mL) pokazale su sličan proliferacijski kapacitet kao i nestimulirane stanice u svim testiranim vremenima stimulacije (24, 48 i 72 sata) - Slika 28.



**Slika 28.** Proliferacijski kapacitet stanica A549 tretiranih TLR5 specifičnim ligandom flagelinom u različitim koncentracijama u trima vremenskim točkama

Prikazan je rezultat jedne biološke replike.

NS = nestimulirane A549 stanice; OD<sub>570</sub> = optička gustoća pri valnoj duljini 570 nm

## 4.2. Mjerenje signalnog potencijala varijante

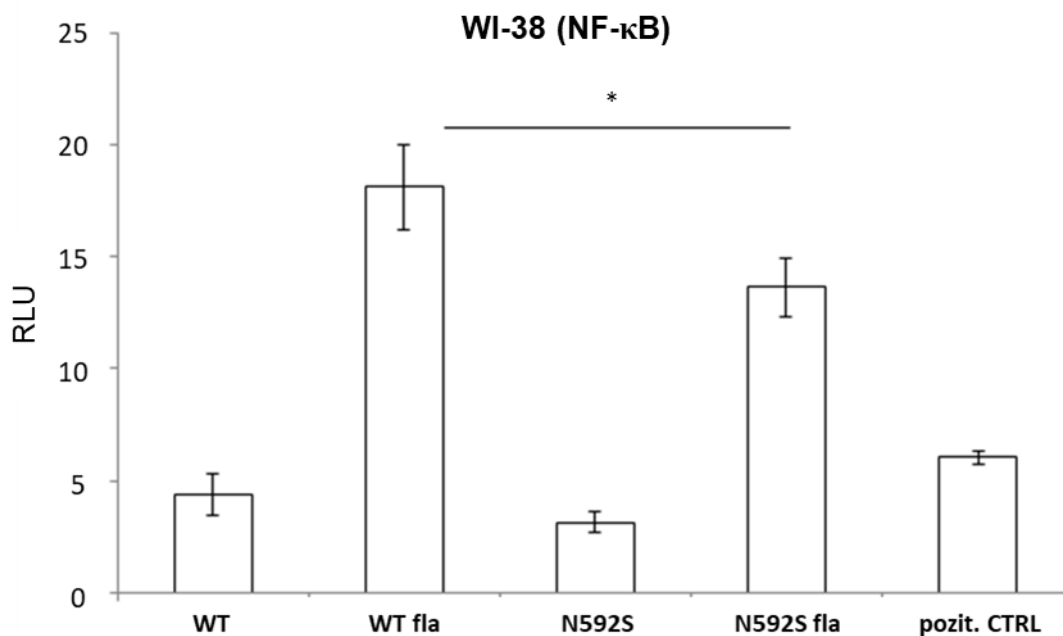
### 4.2.1. Utjecaj varijante rs2072493/N592S gena *TLR5* na aktivaciju transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B, određen luciferaznim esejom

Kako je predmet ovog istraživanja analiza funkcionalne aktivnosti varijante rs2072493/N592S gena *TLR5*, cilj luciferaznog esejaja bio je ispitati učinak prisutnosti proučavane varijante na provođenje signala preko TLR5 u stimuliranim i nestimuliranim uvjetima, odnosno ispitati učinak varijante na aktivaciju transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B. U funkcionalnu analizu uključena je proučavana varijanta rs2072493/N592S i divlji tip gena *TLR5* (engl. *TLR5 wild type*, *TLR5-WT*) te kontrolni plazmid pCI bez ugrađenog gena od interesa. Kao pozitivna kontrola korištena je smjesa plazmidnih konstrukata koji konstitutivno ekspimiraju GFP, *firefly* luciferazu i *Rennila* luciferazu u omjeru 40:1:1.

Rezultati luciferaznog esejaja pokazali su da stanice fibroblasta zdravih pluća WI-38 u uvjetima stimulacije flagelinom pokazuju značajan porast aktivacije transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B, neovisno o tome je li u njih unesen plazmid s divljim tipom gena *TLR5* ili s ispitivanom varijantom rs2072493/N592S.

## Rezultati

Međutim, porast razine aktivacije transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B bio je statistički značajno manji u stanicama u koje je unesen plazmid s ispitivanom varijantom rs2072493/N592S u odnosu na stanice s divljim tipom *TLR5* ( $p=0,04$ ) - Slika 29.



**Slika 29.** Luciferazni esej za određivanje aktivacije transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B u staničnoj liniji WI-38

Prikazan je rezultat jedne biološke replike sa standardnim devijacijama.

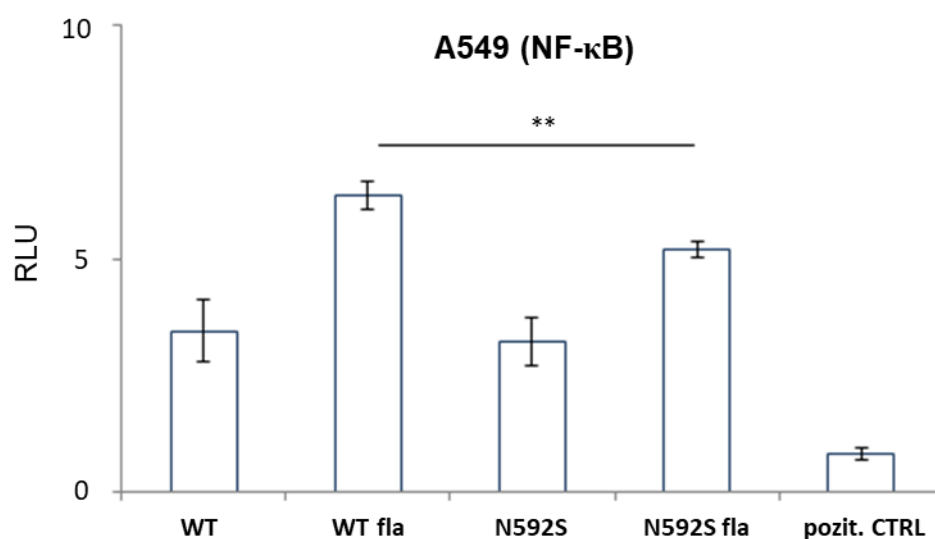
Izražena je p vrijednost za stimulirane stanice *TLR5*-WT u odnosu na N592S: \* $p = 0,04$

RLU = relativna svjetlosna jedinica (engl. *relative luciferase/light unit*)

Slični rezultati luciferaznog esejja dobiveni su u stanicama adenokarcinoma pluća A549. U uvjetima stimulacije flagelinom stanice u koje je unesen plazmid s ispitivanom varijantom N592S, u odnosu na stanice s *TLR5* WT, pokazale su statistički značajno manji porast razine aktivacije transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B ( $p=0,002$ ) - Slika 30.

Zaključno možemo reći da je porast razine aktivacije transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B u uvjetima stimulacije flagelinom statistički značajno manji u stanicama u koje je postupkom transfekcije prethodno unesena ispitivana varijanta rs2072493/N592S, nego u stanicama s prekomjernom ekspresijom divljeg tipa gena *TLR5*, i to u obje korištene stanične linije, s tim da je ta razlika u staničnoj liniji karcinoma pluća (A549) veća.





**Slika 30.** Luciferazni esej za određivanje aktivacije transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B u staničnoj liniji A549

Prikazan je rezultat jedne biološke replike s izraženim standardnim devijacijama.

Izražena je  $p$  vrijednost za stimulirane stanice *TLR5-WT* u odnosu na *N592S*:  $**p = 0,002$

RLU = relativna svjetlosna jedinica

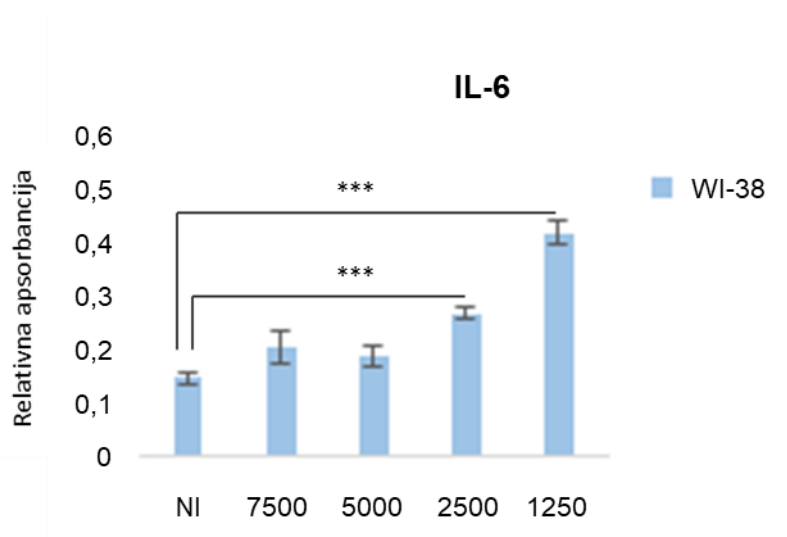
S obzirom da je cilj ovog istraživanja bio ispitati ulogu varijante gena *TLR5* na razvoj karcinoma pluća, planirano je u istraživanje uključiti i stanice metastaze karcinoma pluća H1299. Međutim, paralelna istraživanja u Laboratoriju za naprednu genomiku pokazala su da je postupak transfekcije ovih stanica nedovoljno učinkovit. Kako bi se prevladao problem nedovoljno uspješne transfekcije stanica H1299, a i kako bismo bili što sigurniji u rezultate mjerenja signalnog potencijala varijante rs2072493/N592S u odnosu na divlji tip *TLR5*, u daljnjim pokusima za ubacivanje strane DNA korišteni su adenovirusni konstrukti s genom *TLR5* divljeg tipa ili ispitivanom varijantom rs2072493/N592S. Konstrukti su prethodno pripremljeni u Laboratoriju za naprednu genomiku za potrebe prijašnjih pokusa.

Istraživanja u istom laboratoriju pokazala su i da je uspješnost infekcije pripremljenim adenovirusnim konstruktima veća u staničnoj liniji metastatskog karcinoma pluća H1299 u odnosu na staničnu liniju A549. Zbog toga je u daljnjim pokusima korištena samo stanična linija H1299.

### 4.2.2. Utjecaj infekcije staničnih linija adenovirusnim konstruktom, na aktivaciju signalnih puteva nizvodno od receptora TLR5, određen testom ELISA

U svrhu određivanja utjecaja ispitivane varijante na sposobnost provođenja signala nizvodno od TLR5 u stimuliranim uvjetima, za daljnje pokuse korišteni su adenovirusni vektori s *TLR5* WT ili varijantom rs2072493/N592S. Prije upotrebe adenovirusnih konstrukata s ispitivanim genima provjeren je utjecaj samog postupka infekcije na aktivaciju signalnih puteva nizvodno od TLR5. Naime, praćen je učinak infekcije stanica WI-38 i H1299 različitim brojem virusnih čestica na razine izlučenih citokina IL-6 i IL-8 u stanični medij metodom ELISA. Za infekciju stanica korišten je prethodno pripremljen adenovirusni konstrukt obilježen GFP-privjeskom bez umetnutog gena.

Rezultati su pokazali da su razine izlučenog citokina IL-6 u stanični medij značajno povišene u slučajevima infekcije stanica WI-38 manjim brojem adenovirusnih čestica. Tako infekcija stanica WI-38 s 1250 ( $p < 0,001$ ) ili 2500 ( $p < 0,001$ ) virusnih čestica po stanici značajno utječe na razine izlučenog IL-6 u odnosu na neinficirane stanice, dok se u slučaju infekcije s 5000 ( $p > 0,05$ ) ili 7500 ( $p > 0,05$ ) virusnih čestica po stanici razina izlučenog IL-6 ne mijenja značajno u odnosu na neinficirane stanice (Slika 31).



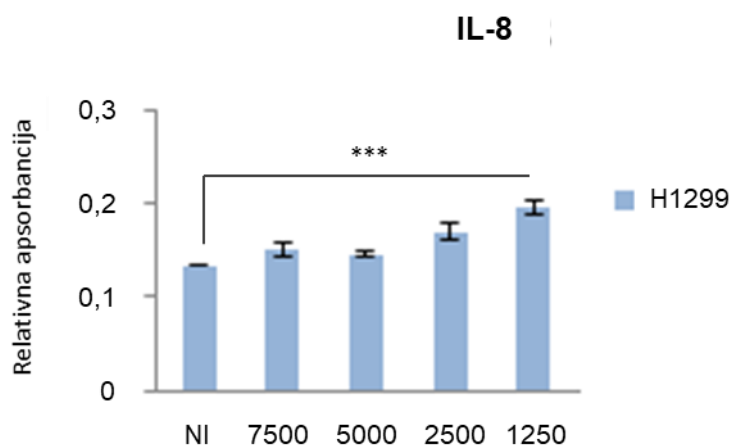
**Slika 31.** ELISA za određivanje razine izlučenog citokina IL-6 u stanični medij u uvjetima infekcije stanica WI-38 različitim brojem adenovirusnih vektora

Prikazan je rezultat jedne biološke replike s izraženim standardnim devijacijama.

Izražena je  $p$  vrijednost za neinficirane stanice u odnosu na stanice inficirane manjim brojem adenovirusnih vektora (1250, 2500):  $***p < 0,001$ ; NI = neinficirane stanice WI-38

## Rezultati

Rezultati za staničnu liniju H1299 pokazali su da su razine izlučenog citokina IL-8 u stanični medij u odnosu na neinficirane stanice značajno povišene samo u uvjetima infekcije stanica H1299 s 1250 adenovirusnih čestica po stanici ( $p < 0,001$ ). Veći broj korištenog adenovirusnog vektora za infekciju nije utjecao na promjenu u razini detektiranog IL-8 (Slika 32).



**Slika 32.** ELISA za određivanje razine izlučenog citokina IL-8 u stanični medij u uvjetima infekcije stanica H1299 različitim brojem adenovirusnih vektora

Prikazan je rezultat jedne biološke replike s izraženim standardnim devijacijama.

Izražena je  $p$  vrijednost za neinficirane stanice u odnosu na stanice inficirane manjim brojem adenovirusnih vektora (1250):  $***p < 0,001$ ; NI = neinficirane stanice H1299

S obzirom da su rezultati testa ELISA zbirno pokazali da postupak infekcije adenovirusnim vektorom može utjecati na aktivaciju signalnih puteva nizvodno od TLR5, ali samo ako se za infekciju koristi manji broj adenovirusnih konstrukata po stanici (1250 ili 2500), u daljnjim pokusima za infekciju smo koristili 10.000 virusnih čestica po stanici.

### 4.2.3. Utjecaj varijante rs2072493/N592S na aktivaciju molekula nizvodno od receptora TLR5, određen metodom *western blot*

Za ispitivanje funkcionalne aktivnosti varijante rs2072493/N592S gena *TLR5*, u smislu njezinog potencijala aktivacije nizvodnih molekula signalnog puta na proteinskoj razini, korištena je metoda *western blot*.

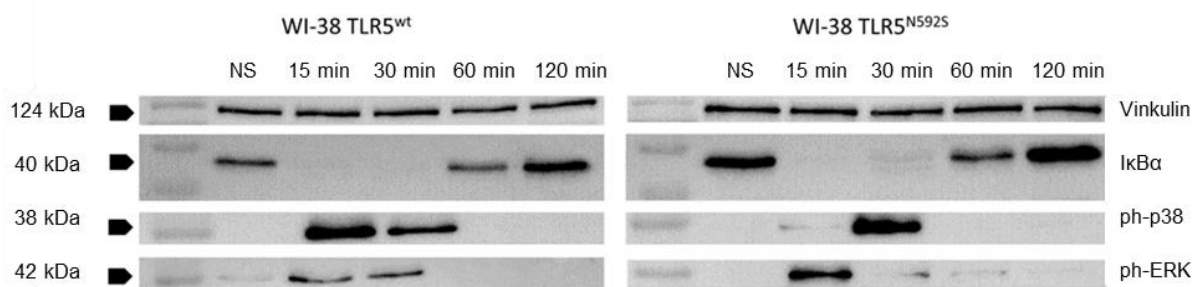
Slično kao i u prethodno prikazanim rezultatima, u uvjetima endogene ekspresije gena *TLR5* cilj je bio ispitati učinak prisutnosti proučavane varijante rs2072493/N592S gena *TLR5* na provođenje signala u stimuliranim i nestimuliranim uvjetima, odnosno ispitati učinak varijante na aktivaciju transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B prateći stupanj degradacije proteina I $\kappa$ B $\alpha$ .

Također, praćen je utjecaj prisutnosti varijante na stupanj aktivacije proteina p38 i ERK kvantificiranjem njihovih aktivnih fosforiliranih oblika. U funkcionalnu analizu uključena je proučavana varijanta rs2072493/N592S (Ad5-N592S) i divlji tip gena *TLR5* (Ad5-WT) koji su postupkom infekcije uneseni u stanice WI-38 i H1299. Stanice su stimulirane flagelinom koncentracije 50 ng/mL, u naznačenim vremenskim intervalima. U pokusu su korištene i nestimulirane stanice s *TLR5* WT ili varijantom N592S. Kao endogena kontrola, to jest kontrola količine nanesenih proteina, korišten je protein vinkulin.

### 4.2.3.1. Aktivacijski potencijal varijante rs2072493/N592S u staničnoj liniji WI-38

Rezultati ove analize pokazali su da u staničnoj liniji fibroblasta zdravih pluća (WI-38), uslijed stimulacije flagelinom dolazi do smanjene detekcije (povećane degradacije) proteina I $\kappa$ B $\alpha$ , odnosno do aktivacije transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B, i to neovisno o prisutnosti mutacije. U oba uvjeta prekomjerne ekspresije, s divljim tipom ili varijantom, aktivacija transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B (degradacija I $\kappa$ B $\alpha$ ) nastupa tijekom 15-minutne stimulacije i uočava se tijekom 30 minuta. Nakon 60-minutne stimulacije dolazi do djelomične restoracije inhibicijskog učinka I $\kappa$ B $\alpha$  na NF- $\kappa$ B, odnosno povratka potpune inhibicijske sposobnosti uslijed 120-minutne stimulacije flagelinom (Slika 33).

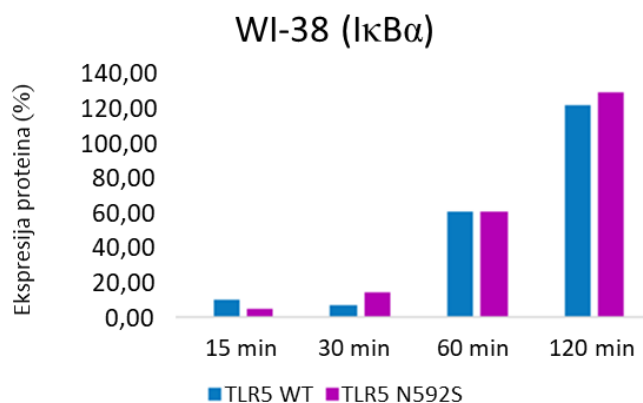
Navedeni rezultati ukazuju da na proteinskoj razini varijanta rs2072493/N592S nema utjecaj na provođenje signala i aktivaciju transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B u uvjetima stimulacije flagelinom stanica WI-38, odnosno da prisustvo varijante ne utječe značajno na aktivaciju NF- $\kappa$ B-a u odnosu na divlji tip gena *TLR5*.



**Slika 33.** Utjecaj varijante rs2072493/N592S na aktivaciju TLR5 nizvodnih signalnih puteva uslijed stimulacije flagelinom u staničnoj liniji WI-38

Prikazan je rezultat reprezentativne biološke replike. NS = nestimulirane stanice WI-38

U svrhu boljeg prikaza rezultata, intenziteti dobivenih signala kvantificirani su pomoću programa ImageJ i rezultati te analize prikazani su na slici 34.

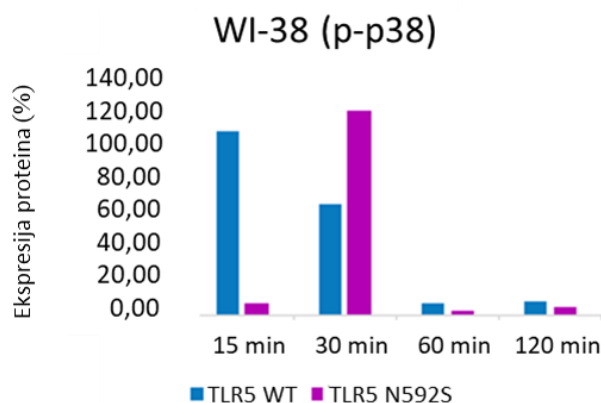


**Slika 34.** Kvantifikacija utjecaja varijante rs2072493/N592S na aktivaciju NF-κB-a  
Za određivanje intenziteta signala korišten je program ImageJ. Prikazana je ekspresija proteina izražena u postotku (%) normalizirana na endogenu kontrolu (vinkulin). Prikazan je rezultat reprezentativne biološke replike.

Nadalje, rezultati analize aktivacijskog potencijala ispitivane varijante u staničnoj liniji WI-38 pokazali su da uslijed stimulacije flagelinom dolazi do pojačane aktivacije proteina p38 jer je uočen pojačani signal fosforiliranog oblika p38 (p-p38), također neovisno o prisutnosti mutacije (Slika 33).

Iako je aktivacija p38 uočena u oba uvjeta, primijećeno je da prisutnost mutacije N592S dovodi do kasnije aktivacije p38 u odnosu na divlji tip *TLR5*. Naime, do povećane aktivacije p38, u uvjetima prekomjerne ekspresije divljeg tipa *TLR5*, dolazi već nakon 15-minutne stimulacije flagelinom. Nakon 30-minutne stimulacije p38 je još uvijek primjetno prekomjerno aktiviran u odnosu na nestimulirane stanice, ali slabije nego nakon 15-minutne stimulacije. Nakon 60-minutne stimulacije razine aktivnosti padaju na razinu nestimuliranih stanica i ne povećavaju se nakon 120 minuta (Slika 35).

S druge strane, u uvjetima infekcije varijantom N592S uočen je pomak u vremenu aktivacije p38 u odnosu na *TLR5* divljeg tipa. Do fosforilacije p38 dolazi nakon 30 minuta stimulacije, signal nestaje nakon 60-minutne stimulacije i ostaje na razini nestimuliranih stanica i nakon 120 minuta (Slika 35). Možemo zaključiti da u prisutnosti mutacije N592S dolazi do kašnjenja u aktivaciji signalne molekule p38.

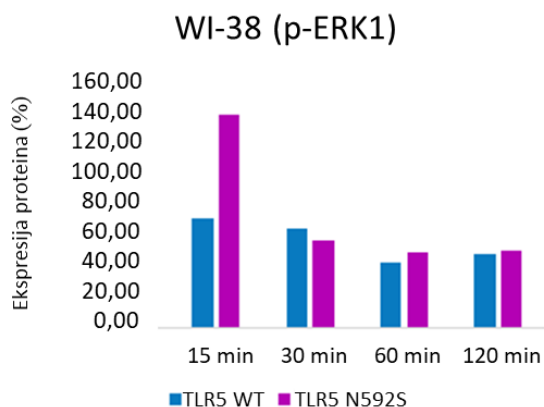


**Slika 35.** Utjecaj varijante rs2072493/N592S na aktivaciju proteina p38

Praćena je razina fosforilacije proteina p38 u stanicama WI-38 stimuliranim flagelinom. Prikazana je ekspresija proteina izražena u postotku (%) normalizirana na endogenu kontrolu (vinkulin). Prikazan je rezultat reprezentativne biološke replike.

Rezultati analize *western blot* u staničnoj liniji WI-38 pokazali su da dolazi i do pojačane aktivacije proteina ERK1 uslijed stimulacije flagelinom jer je uočena povećana fosforilacija ERK1 (p-ERK1), neovisno o prisutnosti mutacije. U oba testirana uvjeta uočena je fosforilacija proteina ERK1 nakon 15-minutne stimulacije, a produljenim izlaganjem flagelinu smanjila se razina ekspresije proteina p-ERK1, odnosno njegov signalni potencijal (Slika 33).

Ipak, rezultati kvantifikacije signala pokazuju da 15 minuta nakon stimulacije flagelinom dolazi do značajnijeg porasta aktivacije ERK1 u prisutnosti mutacije, u odnosu na divlji tip (Slika 36).



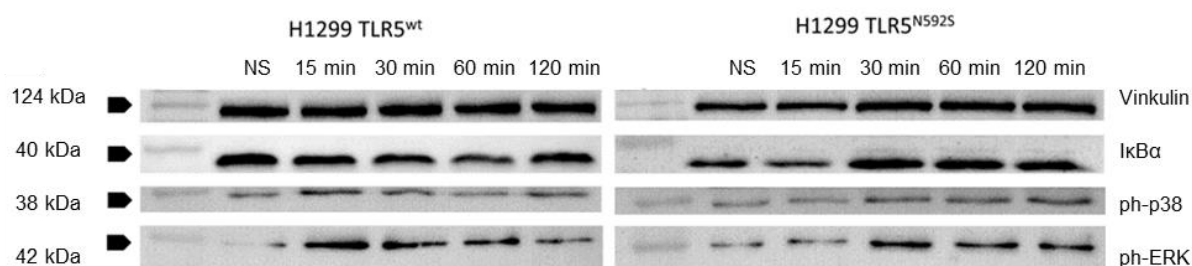
**Slika 36.** Utjecaj varijante rs2072493/N592S na aktivaciju proteina ERK1

Praćena je razina fosforilacije proteina ERK1 u stanicama WI-38 stimuliranim flagelinom. Prikazana je ekspresija proteina izražena u postotku (%) normalizirana na endogenu kontrolu (vinkulin). Prikazan je rezultat reprezentativne biološke replike.

#### 4.2.3.2. Aktivacijski potencijal varijante rs2072493/N592S u staničnoj liniji H1299

Rezultati analize stupnja degradacije  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  u staničnoj liniji H1299 pokazali su da u uvjetima prekomjerne ekspresije divljeg tipa gena *TLR5* dolazi do blage degradacije nakon 30-minutne stimulacije flagelinom, a inhibicijski učinak  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  ponovno jača nakon dugotrajnije izloženosti flagelinu (120 minuta).

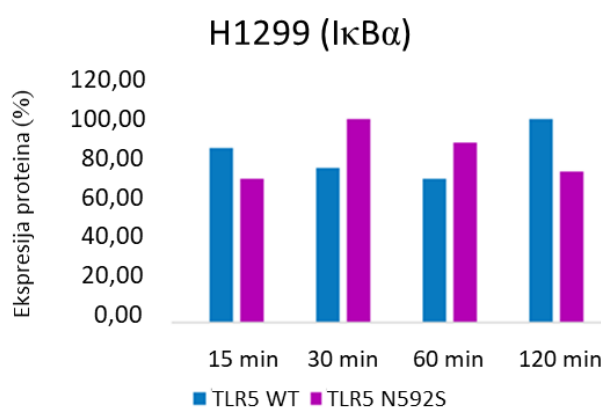
U uvjetima prekomjerne ekspresije mutirane varijante gena *TLR5* primijećena je aktivacija NF- $\kappa$ B nakon 15-minutne stimulacije, nakon čega dolazi do restoracije inhibicijskog učinka  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  (u 30-oj minuti stimulacije). Dugotrajnijom stimulacijom inhibicijski učinak ponovno polako slabi nakon 120 minuta u odnosu na 30-minutnu stimulaciju flagelinom (Slika 37 i Slika 38).



**Slika 37.** Utjecaj varijante rs2072493/N592S na aktivaciju TLR5 nizvodnih signalnih puteva uslijed stimulacije flagelinom u staničnoj liniji H1299

Prikazan je rezultat reprezentativne biološke replike. NS = nestimulirane stanice H1299

Zaključno možemo reći da je u staničnoj liniji H1299 zabilježena produžena degradacija I $\kappa$ B $\alpha$  u prisutnosti mutacije N592S, odnosno da je aktivacija NF- $\kappa$ B-a u prisutnosti mutacije sveukupno dugotrajnija u odnosu na aktivnost NF- $\kappa$ B-a u prisutnosti divljeg tipa gena *TLR5*.



**Slika 38.** Utjecaj varijante rs2072493/N592S na aktivaciju NF- $\kappa$ B-a

Praćena je degradacija proteina I $\kappa$ B $\alpha$  u stanicama H1299 stimuliranim flagelinom.

Prikazana je ekspresija proteina izražena u postotku (%) normalizirana na endogenu kontrolu (vinkulin). Prikazan je rezultat reprezentativne biološke replike.

Rezultati ove analize također su pokazali da se u uvjetima prekomjerne ekspresije divljeg tipa *TLR5* signalni potencijal p38 povećao nakon 15-minutne stimulacije flagelinom. Naime, tada je uočena povećana ekspresija fosforiliranog aktivnog oblika p38.

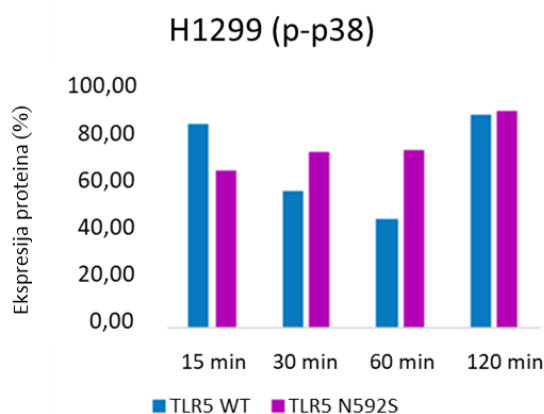


## Rezultati

Stimulacija u trajanju od 30 minuta pokazala je da je signalni put još uvijek aktivan, ali manje nego prilikom kraće stimulacije. Nakon 60 minuta aktivnost p-p38 se izgubila, ali je uočeno ponovno jačanje signala nakon dugotrajnije stimulacije u trajanju od 120 minuta (Slika 37 i Slika 39).

U uvjetima prekomjerne ekspresije varijante N592S uočen je uzlazni trend aktivacije p38 u odnosu na nestimulirane stanice. Primijećeno je da kratkotrajno izlaganje flagelinu tek neznatno povisuje razine fosforiliranog p38, dok je ono bilo najizraženije nakon 120 minuta stimulacije (Slika 39).

Možemo zaključiti da u prisutnosti mutacije N592S dolazi do blage postupne aktivacije proteina p38, koja pokazuje uzlazni trend, za razliku od divljeg tipa *TLR5* kod kojeg se aktivacija proteina p38 odvija kratkotrajno i u dva vala.

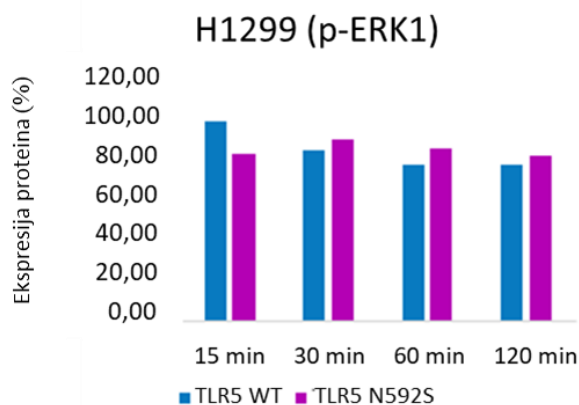


### Slika 39. Utjecaj varijante rs2072493/N592S na aktivaciju proteina p38

Praćena je razina fosforilacije proteina p38 u staničnoj liniji H1299 stimuliranoj flagelinom. Prikazana je ekspresija proteina izražena u postotku (%) normalizirana na endogenu kontrolu (vinkulin). Prikazan je rezultat reprezentativne biološke replike.

Rezultati analize pokazali su i da se u uvjetima prekomjerne ekspresije divljeg tipa *TLR5* signalni potencijal proteina ERK1 snažno povećao kratkotrajnom stimulacijom flagelinom kroz 15 minuta. Nakon 30 minuta primijećen je blagi pad razine aktivnosti, a pad se nastavio i nakon 60-minutne stimulacije i zaustavio se na istoj razini dugotrajnijom stimulacijom u trajanju od 120 minuta (Slika 37 i Slika 40).

U slučaju varijante N592S uočena je također aktivacija ERK1 nakon 15-minutne stimulacije, a najizraženija nakon 30-minutne izloženosti flagelinu. Dugotrajnijom stimulacijom signalni potencijal proteina ERK1 polako je pao u odnosu na 30-minutnu stimulaciju, ali se nije vratio na razinu prije stimulacije (Slika 40).



**Slika 40.** Utjecaj varijante rs2072493/N592S na aktivaciju proteina ERK1.

Praćena je razina fosforilacije proteina ERK1 u stanicama H1299 stimuliranim flagelinom. Prikazana je ekspresija proteina izražena u postotku (%) normalizirana na endogenu kontrolu (vinkulin). Prikazan je rezultat reprezentativne biološke replike.

Zaključno, u prisutnosti divljeg tipa gena *TLR5* ili mutacije N592S, aktivacija proteina ERK1 nastupa nakon kratkotrajne stimulacije. U oba uvjeta blaža aktivnost proteina ERK1 ostaje prisutna za vrijeme dulje stimulacije.

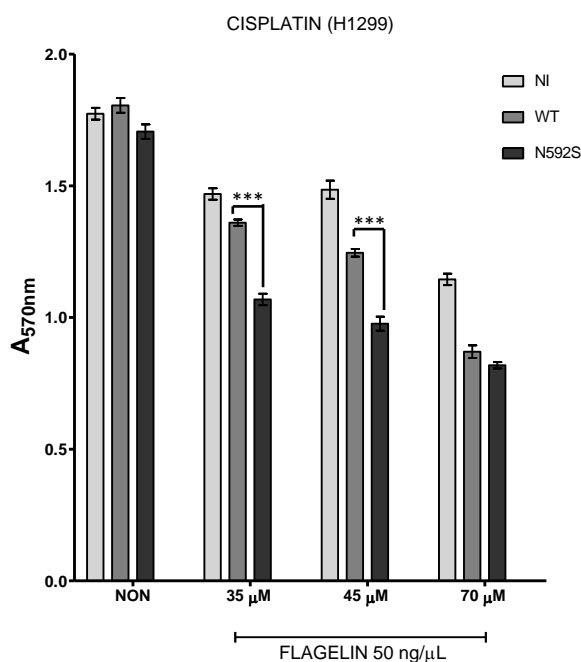
### 4.3. Proliferacijski kapacitet tumorskih stanica s divljim i mutiranim genom *TLR5*

Kako bi se utvrdio potencijalni prediktivni učinak prisutnosti mutacije rs2072493/N592S na tretman citostaticima u uvjetima kostimulacije flagelinom, kao i njezin utjecaj na vijabilnost stanica, korišten je test MTT. Za potrebe ove analize korištena je stanična linija metastatskog karcinoma pluća H1299 i adenovirusni konstrukti divljeg tipa gena *TLR5* i ispitivane varijante. Stanice su stimulirane flagelinom koncentracije 50 ng/mL i tretirane različitim koncentracijama različitih citostatika: cisplatine, karboplatine ili paklitaksela. Kao kontrola korištene su nestimulirane i netretirane stanice u koje su uneseni konstrukti divljeg tipa *TLR5* ili varijante rs2072493/N592S.

## Rezultati

Rezultati testa MTT pokazali su da prekomjerna ekspresija bilo divljeg tipa *TLR5*, bilo varijante N592S, sama po sebi u nestimuliranim i netretiranim uvjetima, ne utječe na vijabilnost stanica H1299 ( $p>0,05$ ) u odnosu na stanice bez unesenog gena. Istovjetni rezultati dobiveni su u uvjetima korištenim za provjeru svih triju citostatika.

U uvjetima kostimulacije flagelinom i cisplatinom prekomjerna ekspresija *TLR5* WT značajno je smanjila preživljenje stanica u odnosu na neinficirane stanice u dvjema testiranim koncentracijama cisplatine (35  $\mu\text{M}$  i 45  $\mu\text{M}$ ). Prekomjerna ekspresija varijante u navedenim je uvjetima također značajno smanjila vijabilnost stanica u odnosu na kontrolne stanice, neovisno o koncentraciji citostatika ( $p<0,001$  za sve testirane koncentracije). Konačno, primijećen je značajan utjecaj ispitivane varijante na smanjenu vijabilnost stanica u odnosu na stanice s *TLR5* WT u uvjetima kostimulacije flagelinom i cisplatinom u koncentracijama 35  $\mu\text{M}$  i 45  $\mu\text{M}$  cisplatine ( $p<0,001$  u oba uvjeta), dok kostimulacija sa 70  $\mu\text{M}$  podjednako djeluje na vijabilnost stanica, neovisno o vrsti unesenog gena *TLR5* ( $p>0,05$ ), - Slika 41.



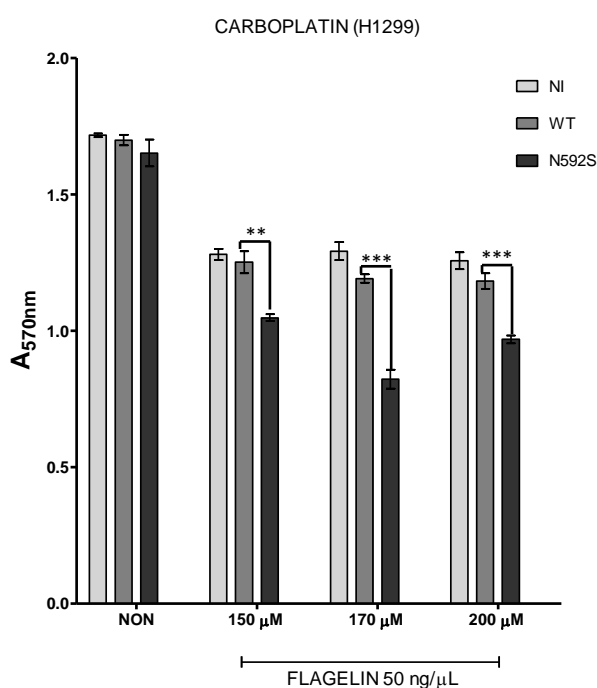
**Slika 41.** Utjecaj varijante rs2072492/N592S na vijabilnost stanica H1299 u uvjetima kostimulacije flagelinom i citostatikom cisplatinom

Prikazan je rezultat jedne biološke replike sa standardnim devijacijama. Izražena je  $p$  vrijednost za

WT u odnosu na N592S: \*\*\* $p < 0,001$ . NON = nestimulirane i netretirane stanice H1299; NI = neinficirane stanice; WT/N592S = stanice u koje je unesen konstrukt *TLR5* WT ili varijanta N592S

## Rezultati

Rezultati testa MTT pokazali su da prekomjerna ekspresija ispitivane varijante u uvjetima kostimulacije flagelinom i karboplatinom značajno smanjuje preživljenje stanica u odnosu na neinficirane stanice, neovisno o primijenjenoj koncentraciji karboplatine ( $p < 0,001$  za sve testirane koncentracije). Rezultati su također pokazali značajan utjecaj varijante na smanjenje vijabilnosti stanica u odnosu na stanice s *TLR5* WT u svim uvjetima kostimulacije ( $p < 0,01$  za koncentraciju karboplatine  $150 \mu\text{M}$ ,  $p < 0,001$  za preostale dvije koncentracije). Najveći utjecaj na smanjenje broja vijabilnih stanica s varijantom N592S primijećen je pri stimulaciji flagelinom i karboplatinom u koncentraciji  $170 \mu\text{M}$  (Slika 42).



**Slika 42.** Utjecaj varijante rs2072492/N592S na vijabilnost stanica H1299 u uvjetima kostimulacije flagelinom i citostatikom karboplatinom

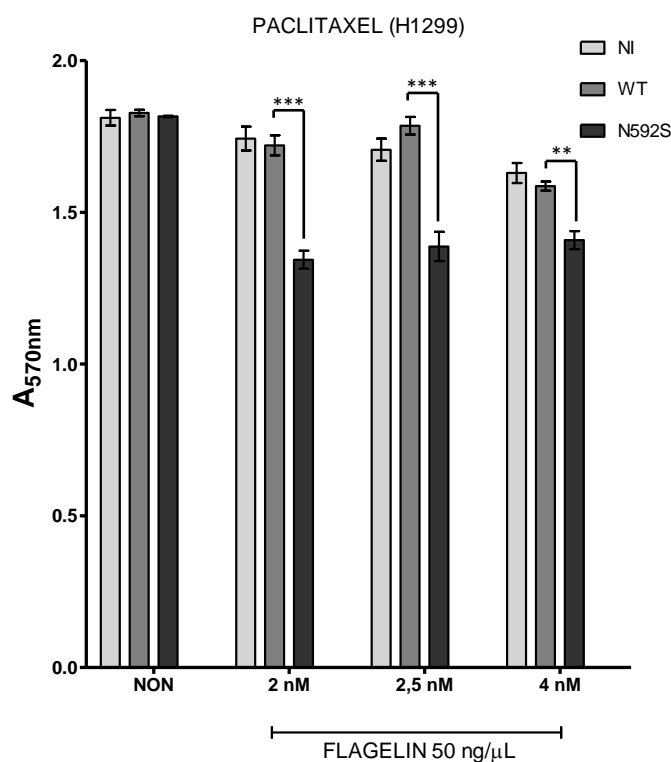
Prikazan je rezultat jedne biološke replike sa standardnim devijacijama. Izražena je  $p$  vrijednost za WT u odnosu na N592S: \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . NON = nestimulirane i netretirane stanice H1299; NI = neinficirane stanice; WT/N592S = stanice u koje je unesen *TLR5* WT ili N592S

I konačno, rezultati testa MTT pokazali su da prekomjerna ekspresija varijante, u uvjetima kostimulacije flagelinom i citostatikom paklitakselom, značajno smanjuje preživljenje stanica u odnosu na stanice bez unesenog gena, neovisno o primijenjenim koncentracijama paklitaksela ( $p < 0,001$  za sve testirane koncentracije).

## Rezultati

Rezultati nadalje ukazuju da prekomjerna ekspresija ispitivane varijante značajno utječe na smanjenje vijabilnosti stanica u odnosu na stanice s prekomjernom ekspresijom divljeg tipa gena *TLR5* i to u svim uvjetima kostimulacije. Podjednako značajan utjecaj na smanjenje broja vijabilnih stanica s varijantom N592S primijećen je kod koncentracije paklitaksela 2 nM i 2,5 nM ( $p < 0,001$ ), dok je smanjenje, iako statistički jako značajno, bilo najmanje primjetno kod koncentracije paklitaksela 4 nM ( $p < 0,01$ ) - Slika 43.

Zaključno možemo reći da prisutnost mutacije N592S značajno utječe na otpornost stanica H1299 na tretman testiranim kemoterapeutikima u uvjetima kostimulacije sa specifičnim TLR5 ligandom, na način da smanjuje njihovu otpornost na tretman.

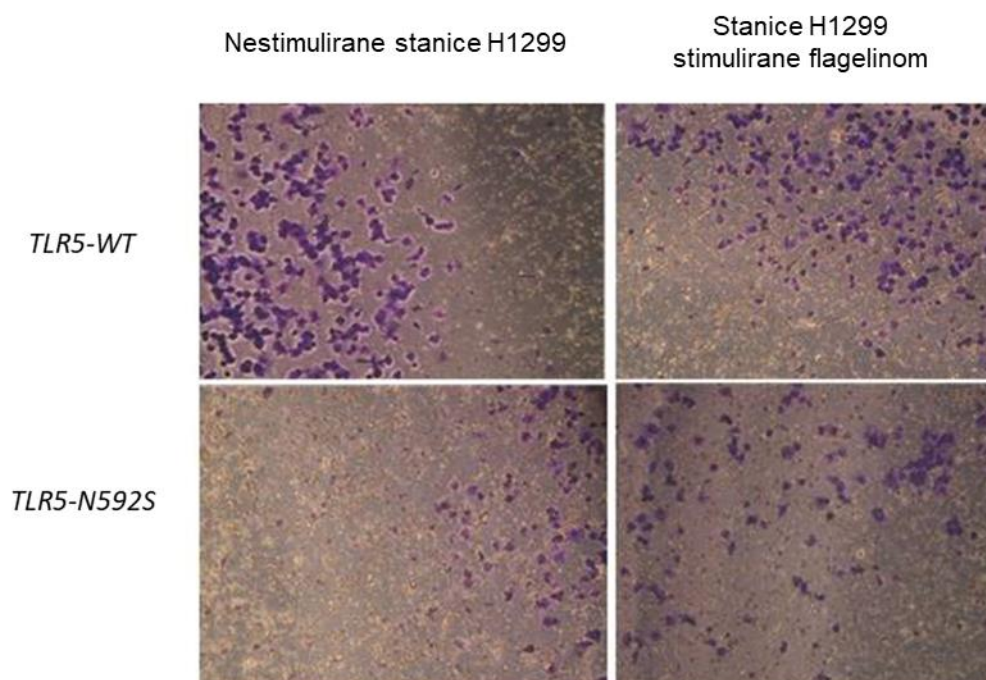


**Slika 43.** Utjecaj varijante rs2072492/N592S na vijabilnost stanica H1299 u uvjetima kostimulacije flagelinom i citostatikom paklitakselom

Prikazan je rezultat jedne biološke replike s izraženim standardnim devijacijama. Izražena je  $p$  vrijednost za WT u odnosu na N592S: \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . NON = nestimulirane i netretirane stanice H1299; NI = neinficirane stanice; WT/N592S = stanice u koje je unesen adenovirusni konstrukt *TLR5* divljeg tipa ili varijante rs2072492/N592S

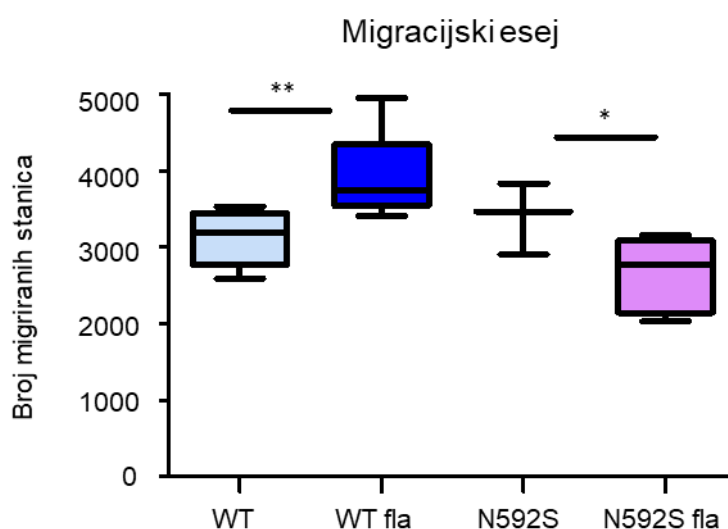
### 4.4. Migracijski potencijal varijante

Kako bi utvrdili migracijske potencijale stanica koje prekomjerno eksprimiraju divlji tip gena *TLR5* ili ispitivanu varijantu rs2072493/N592S, u uvjetima nestimuliranim i stimuliranim flagelinom, korišten je migracijski esej. Za potrebe ove analize korištena je stanična linija metastatskog tumora pluća H1299 i adenovirusni konstrukti divljeg tipa *TLR5* i ispitivane varijante. Stanice su nakon infekcije stimulirane flagelinom koncentracije 50 ng/mL ili su ostavljene nestimulirane. Migrirane stanice su fiksirane i obojane bojom *Crystal Violet* te su potom slikane na mikroskopu, a broj migriranih stanica određen je pomoću programa *ImageJ* (Slika 44). Pokus je napravljen kao tri neovisna ponavljanja.



**Slika 44.** Migracijski potencijal stanica H1299 inficiranih genom *TLR5* divljeg tipa i varijantom N592S u nestimuliranim uvjetima i uvjetima stimulacije flagelinom Na lijevoj strani slike prikazane su nestimulirane stanice s *TLR5* WT ili N592S varijantom, a na desnoj je strani prikaz migracije stanica u stimuliranim uvjetima. Prikazani su rezultati jedne biološke replike.

Rezultati ove analize ukazali su na postojanje trenda pojačane migracije stanica H1299 u uvjetima prekomjerne ekspresije divljeg tipa gena *TLR5* i stimulacije flagelinom u odnosu na nestimulirane stanice. Za razliku od njih, stanice koje prekomjerno ekspimiraju mutaciju N592S pokazuju drukčiji trend. U uvjetima stimulacije flagelinom stanice s varijantom N592S pokazuju smanjenu stopu migracije u odnosu na nestimulirane stanice (Slika 45). Važno je napomenuti da su navedeni trendovi zabilježeni u svim trima biološkim replikama, međutim statistička značajnost između navedenih uvjeta dobivena je u samo jednoj, pa se ne može sa sigurnošću potvrditi smanjeni migracijski potencijal stanica koje nose mutaciju N592S u odnosu na divlji tip.



**Slika 45.** Migracijski potencijal stanica H1299 inficiranih genom *TLR5* WT i N592S varijantom u nestimuliranim uvjetima i uvjetima stimulacije flagelinom. Prikazan je rezultat jedne biološke replike s izraženim minimalnim i maksimalnim vrijednostima te izraženim medijanom. Izražena je  $p$  vrijednost za stimulirane u odnosu na nestimulirane stanice:

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$

WT/N592S = stanice u koje je unesen adenovirusni konstrukt *TLR5* WT ili varijante rs2072492/N592S; WT fla/N592S fla = stanice u koje je unesen adenovirusni konstrukt *TLR5* WT ili varijante rs2072492/N592S i koje su stimulirane flagelinom koncentracije 50 ng/mL

### 5. RASPRAVA

Premda su po broju smrtnih slučajeva kardiovaskularne bolesti već stotinu godina uvjerljivo prve, u očima javnosti, pa i znanstvene zajednice, karcinomi predstavljaju znatno veći problem. Oni su obilježili kraj dvadesetog i početak dvadeset prvog stoljeća i još uvijek su jedno od najistraživanijih područja znanosti. Zahvaljujući velikom interesu i naporima znanstvenika mnogi su malignomi danas lječivi. No karcinom pluća, koji je već desetljećima predmet brojnih bazičnih i kliničkih istraživanja, i dalje ima nesrazmjerno visoku smrtnost.<sup>2,3</sup>

Sustav zaštite organizma od infekcije vrlo je kompleksan i sofisticiran. To je postalo jasno zadnjih dvadeset godina tijekom kojih su otkrivene brojne molekule i signalni putevi koji u njemu sudjeluju. Njihovo nas je otkriće približilo shvaćanju imunskog sustava kao jedinstvene cjeline koja djeluje u obrani organizma od patogena, ali i od reakcije na vlastite antigene. Prema dosadašnjim saznanjima TLR-i u tom sustavu imaju ključnu ulogu. Oni prepoznaju za organizam štetne signale i omogućuju adekvatnu reakciju na njih. Iako primarno djeluju kao dio obrambenog sustava, u odgovarajućim okolnostima TLR-i s pripadajućim signalnim putevima mogu biti upleteni u nastanak različitih kroničnih bolesti, kao što su autoimune bolesti i karcinomi. Razlog je kronična aktivacija stanica prirođenog imuniteta odnosno kronična upala koja dovodi do poremećaja tkivne ravnoteže, pokretanja razarajućih procesa u stanici, tkivnog remodeliranja i gubitka normalnih funkcija, utirući put nastanku karcinoma.<sup>76,162</sup>

Zahvaljujući boljem razumijevanju imunskog sustava razvijene su nove terapije, kako za autoimune, tako i za maligne bolesti. Njihove su ciljne molekule različiti proteini koji su dio imunskog sustava kao što su citokini, receptori i drugi proteini duž signalnih puteva u stanici. Ciljne molekule mogu biti i TLR-i. Primjer je imunoterapija lokaliziranog karcinoma mokraćnog mjehura koja djeluje upravo aktivacijom TLR-a u tumorskom mikrokolišu putem BCG vakcine (franc. *Bacillus Calmette-Guerin*). U novije vrijeme ispituju se i agonisti pojedinih TLR-a i to zbog sposobnosti da potaknu antitumorsku imunost. Radi se o tvarima koje su vrlo djelotvorne, ali zbog toksičnosti još nisu ušle u kliničku primjenu. Iznimka bi mogli biti agonisti TLR5 koji su se poput flagelina, zbog karakterističnog profila citokina koje induciraju, pokazali manje toksičnima i u tom smislu jedinstvenima.<sup>163,164</sup>



Receptori TLR ne nalaze se samo na imunosnim stanicama, već i na plućnim stanicama, kao što su epitelne stanice dišnih puteva koje u velikoj mjeri ekspimiraju različite TLR-e, uključujući TLR5. Smatra se da je upravo međudjelovanje stromalnih i imunosnih stanica od osobite važnosti u nastanku karcinoma pluća. Naime, otpuštanje upalnih medijatora posredovano TLR-ima, bilo iz stromalnih bilo iz imunosnih stanica, ima važnu ulogu u stvaranju tumorskog mikrookoliša u plućima. Uloga TLR-a pri tome može biti dvojaka, ovisno o signalnom putu koji se aktivira. S jedne strane oni mogu potaknuti protutumorski odgovor, a s druge djelovati promocijski na nastanak tumora. Premda je poznato da pokretanje Th1 odgovora dovodi do regresije, a Th2 odgovora do progresije karcinoma, zašto dolazi do skretanja u određenom smjeru nije razjašnjeno.<sup>100</sup>

Iako su plućne epitelne stanice jedan od regulatora imunosnog odgovora, njihova točna uloga još je područje prijepora, a rani događaji koji sudjeluju u pokretanju imunosnih reakcija u plućima nisu poznati. Istodobno, kronična je upala prepoznata kao jedno od najvažnijih obilježja malignih bolesti. Da bismo razumjeli cjelokupan proces počevši od djelovanja patogena, preko aktivacije imunosnog sustava i razvoja kronične upale, do nastanka karcinoma pluća, važno je razjasniti ishod aktivacije receptora urođene imunosti u respiratornim stanicama, odnosno njezinu povezanost sa staničnim procesima kao što su regulacija upale, proliferacija i stvaranje tumorskog mikrookoliša.<sup>165,166</sup>

Poznato je i da različite varijante gena mogu promijeniti funkciju ciljnog proteina odnosno receptora. Stoga bi identifikacija varijanti uključenih u aktivaciju i regulaciju imunosnog odgovora i povezivanje njihove uloge s razvojem bolesti mogla također pomoći razumijevanju procesa koji dovode do nastanka karcinoma pluća.

Zbog svega navedenog, fokus istraživanja usmjerili smo na ulogu funkcionalne varijante rs2072493/N592S gena *TLR5* u plućnim epitelnim stanicama, predmnijevajući njezinu povezanost s neimunskim procesima koji sudjeluju u nastanku karcinoma pluća, što je ujedno bila polazna hipoteza istraživanja. Ova varijanta do sada je istraživana samo kod dvije maligne bolesti, kolorektalnog karcinoma i karcinoma dojke. U prvom slučaju nađeno je značajno manje preživljenje kod nositelja varijante, a istraživanje provedeno na Institutu Ruđer Bošković, na kojemu je temeljena ova disertacija, ukazalo je na značajnu povezanost varijante i s karcinomom pluća.<sup>32,118</sup> U skladu s dosadašnjim spoznajama za ciljeve istraživanja odredili smo: utvrđivanje sposobnosti prijenosa signala u zdravim i tumorskim epitelnim stanicama pluća te proliferacijskog kapaciteta tumorskih stanica, ovisno o prisustvu varijante ili divljeg tipa gena *TLR5*.

Istraživanje je započeto na staničnim linijama fibroblasta pluća WI-38 i adenokarcinoma pluća A549, u koje su postupkom transfekcije uneseni plazmidni konstrukti s varijantom rs2072493/N592S odnosno divljim tipom gena *TLR5*. Kako transfekcija stanica A549 nije uspjela, plazmidi su zamijenjeni adenovirusnim konstruktima s ispitivanim genima, koji su u stanice uneseni postupkom infekcije. Ujedno je stanična linija A549 zamijenjena staničnom linijom metastatskog karcinoma pluća H1299 jer se u ranijim istraživanjima pokazalo da je uspješnost postupka infekcije u ovoj staničnoj liniji veća. S obzirom da je utvrđeno da i sam postupak transfekcije ima učinak na lučenje citokina, kao i infekcija manjim brojem adenovirusnih konstrukata, da bi se izbjegli lažno pozitivni rezultati, u nastavku istraživanja korištena je isključivo infekcija s 10.000 virusnih čestica po stanici.

Ispitivanjem endogene aktivnosti TLR5 ELISA testom utvrđeno je da stanice WI-38 i stanice A549, nakon stimulacije flagelinom proizvode citokine IL-6 i IL-8, čije su razine bile statistički značajno veće nego u nestimuliranim stanicama, za razliku od stanica H1299 kod kojih se razina citokina nije značajno promijenila u uvjetima stimulacije. Pri tome su stanice A549 znatno slabije odgovorile na stimulaciju od stanica WI-38, što ukazuje na različitu razinu endogene aktivnosti TLR5 u ispitivanim staničnim linijama.

Ispitivanjem endogene aktivnosti TLR5 analizom *western blot* utvrđeno je da stimulacija flagelinom i u staničnoj liniji WI-38 i u staničnoj liniji A549 dovodi do aktivacije ERK1 i smanjene ekspresije I $\kappa$ B $\alpha$ , s tim da su oba učinka u staničnoj liniji WI-38 bila jača i kratkotrajnija. Što se tiče p38, stimulacija je dovela do njegove znatne aktivacije u stanicama A549, dok flagelin nije imao utjecaja na aktivaciju ovog proteina u stanicama WI-38. Sveukupno, ova je analiza, kao i prethodno opisani ELISA test, pokazala da obje stanične linije posjeduju određenu razinu endogene ekspresije TLR5 i mogu se stimulirati flagelinom, iako stimulacija pokreće ponešto drukčije signalne puteve u zdravim plućnim stanicama nego u stanicama karcinoma pluća.

Slične rezultate dobili su Zhou i suradnici u radu objavljenom 2014. godine u kojem su između ostalog ispitivali endogenu ekspresiju TLR5 u različitim staničnim linijama karcinoma pluća. Utvrdili su da sve ispitivane stanične linije, uključujući A549 i H1299, odgovaraju na stimulaciju flagelinom, pri čemu stanice različito ekspimiraju TLR5, a one s većom ekspresijom pokazuju i veću signalnu aktivnost nakon stimulacije. Tako su stanice H1299 značajno slabije odgovorile na stimulaciju flagelinom od stanica A549, što se djelomično poklapa s našim rezultatima.<sup>102</sup>

Razlike su vjerojatno uvjetovane drukčijim dizajnom navedenog istraživanja u kojem je ekspresija TLR5 određivana pomoću RT-PCR-a. S druge strane, isti su autori na kliničkom modelu utvrdili da visoka ekspresija TLR5 korelira s duljim vremenom do progresije bolesti oboljelih od karcinoma pluća nemalih stanica, što sugerira protektivni učinak visoke ekspresije TLR5, odnosno očekivano slabiju ekspresiju u stanicama karcinoma nego u stanicama zdravih pluća.<sup>102</sup>

Sposobnost proliferacije stanica WI-38 i A549 ispitivana je MTT testom. Za razliku od navedenog istraživanja Zhoua i suradnika u kojem je MTT testom nađena inhibicija proliferacije stanica karcinoma pluća stimuliranih flagelinom, u našem istraživanju utvrđeno je da stimulacija flagelinom ne mijenja sposobnost proliferacije nijedne ispitivane stanične linije. Važno je napomenuti da je navedeno istraživanje, za razliku od našeg, prvenstveno provedeno na staničnoj liniji SPC-A1.<sup>102</sup>

Različit utjecaj stimulacije flagelinom na stanične linije karcinoma zabilježen je i u radu koji je 2011. objavio Cai sa suradnicima, a u kojem je između ostalog ispitivana ekspresija TLR5 na šest različitih staničnih linija karcinoma dojke te utjecaj stimulacije flagelinom na stanični rast i sposobnost proliferacije. Iako je imunofluorescencijom potvrđena ekspresija TLR5 na svim ispitivanim staničnim linijama, u dvjema nije došlo do aktivacije nizvodnih signalnih puteva ni inhibicije proliferacije nakon primjene flagelina.<sup>167</sup> I konačno, u radu koji je objavljen iste godine, Song i suradnici utvrdili su da stimulacija flagelinom potiče proliferaciju staničnih linija karcinoma želuca.<sup>168</sup> Iz svega navedenog jasno je da rezultati utjecaja flagelina na proliferaciju različitih staničnih linija nisu jednoznačni te je u tom smislu i naš rezultat relevantan.

Opisanim postupcima definirane su karakteristike staničnih linija koje su inicijalno predviđene za istraživanje, to jest utvrđena je endogena aktivnost TLR5 i proliferacijski kapacitet stanica prije unošenja ispitivanih gena da bi se izbjegli lažno pozitivni rezultati nakon što se u predložene stanične linije unesu odgovarajući geni.

U sklopu određivanja signalnog potencijala varijante rs2072493/N592S, odnosno divljeg tipa gena *TLR5*, što je bio primarni cilj istraživanja, ispitani su: utjecaj varijante na aktivaciju signalnih puteva nizvodno od TLR5, funkcionalna aktivnost varijante na proteinskoj razini te proliferacijski i migracijski kapacitet tumorskih stanica s divljim i mutiranim genom u nestimuliranim i stimuliranim uvjetima.

Ispitivanjem provođenja signala preko TLR5 pomoću luciferaznog eseja utvrđeno je da stimulacija flagelinom stanica WI-38 transfeciranih s divljim tipom gena *TLR5* ili varijantom rs2072493/N592S dovodi do značajno veće aktivacije transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B u odnosu na nestimulirane stanice neovisno o unesenom plazmidu. Sličan rezultat dobiven je i u stanicama A549. Međutim, porast aktivnosti NF- $\kappa$ B-a u uvjetima stimulacije flagelinom bio je statistički značajno manji u stanicama s ispitivanom varijantom nego u stanicama s divljim tipom gena *TLR5* i to u obje stanične linije, s tim da je ta razlika u staničnoj liniji A549 bila veća. Možemo zaključiti da ispitivana varijanta reagira na stimulaciju flagelinom, ali da stimulacija izaziva znatno manji porast aktivnosti NF- $\kappa$ B-a u stanicama s prekomjernom ekspresijom varijante rs2072493/N592S u odnosu na divlji tip, osobito u staničnoj liniji A549.

Funkcionalnost varijante N592S dokazana je u istraživanju Klimoscha i suradnika iz 2013. godine kada je ova varijanta ispitivana na staničnim linijama karcinoma kolona i kod oboljelih od ove bolesti. U navedenom radu utvrđena je slična razina aktivacije NF- $\kappa$ B-a u ispitivanim staničnim linijama neovisno o unesenom konstrukt s divljim tipom ili ispitivanom varijantom, što se razlikuje od naših rezultata. Međutim, ovisno o prirodni upotrijebljenog flagelina, stanice s varijantom su u nekim slučajevima pokazivale značajno nižu razinu aktivacije od stanica s divljim tipom gena, što se slaže s našim rezultatima. Osim toga, kako se radi o staničnim linijama karcinoma kolona, a radova s navedenom varijantom kod karcinoma pluća nema, naše rezultate moramo shvatiti kao polazište za daljnja istraživanja.<sup>32</sup>

Ispitivanjem funkcionalne aktivnosti varijante na proteinskoj razini metodom *western blot* utvrđeno je da prisutnost mutacije N592S u stanicama WI-38 pomiče aktivaciju, to jest fosforilaciju proteina p38 na 30 minuta nakon stimulacije flagelinom, za razliku od divljeg tipa gena kod kojeg je do aktivacije došlo već nakon 15 minuta. Dakle, u prisutnosti varijante aktivacija proteina p38 bila je zakašnjela i kraće je trajala. Razlika je također bila zamjetna u aktivaciji proteina ERK1 koja je, doduše, nastupila istovremeno, ali je u prisutnosti mutacije došlo do značajnijeg porasta aktivacije u odnosu na divlji tip.

U stanicama H1299 zabilježena je produžena inhibicija I $\kappa$ B $\alpha$ , a samim time i dugotrajnija aktivacija NF- $\kappa$ B-a u prisutnosti ispitivane varijante u odnosu na divlji tip gena. Nadalje, u prisutnosti mutacije N592S došlo je do blage postupne aktivacije proteina p38 koja je imala uzlazni trend, ali je kasnila i bila slabija u odnosu na divlji tip, dok mutacija nije imala znatniji utjecaj na protein ERK1.

Proteini ERK1 i ERK2, kao što je ranije navedeno, pripadaju ključnim regulatorima staničnih procesa, a hiperaktivacija ERK signalnog puta ima važnu ulogu u nastanku i razvoju karcinoma.<sup>149</sup> Smatra se da protein p38 ima supresivno djelovanje na razvoj tumora, iako novija istraživanja ostavljaju otvorenom i drukčiju mogućnost.<sup>169</sup> I $\kappa$ B $\alpha$  stanični je protein koji inhibira transkripcijski faktor NF- $\kappa$ B, a time i istoimeni signalni put koji sudjeluje u kontroli proliferacije i preživljenja tumorskih stanica, kao i u procesu angiogeneze te ima važnu ulogu u nastanku i progresiji karcinoma.<sup>170</sup>

U skladu s do sada poznatom ulogom ovih proteina u karcinogenezi, naši rezultati u stanicama WI-38 posredno ukazuju na moguću protumorsku ulogu ispitivane varijante jer njezino prisustvo, u usporedbi s divljim tipom, odgađa aktivaciju protutumorske molekule p38, a pojačava aktivaciju ERK1. U prilog protumorske uloge varijante rs2072493/N592S u stanicama H1299 govori dugotrajnija aktivacija NF- $\kappa$ B-a te slabija i zakašnjela aktivacija p38 u stanicama s prekomjernom ekspresijom varijante u odnosu na divlji tip.

Razlika u prijenosu signala nizvodno od TLR5 zamjetna je i između staničnih linija, pogotovo u aktivaciji transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B i proteina p38 koji se u staničnoj liniji WI-38 aktiviraju kratkotrajno i snažno, dok je aktivacija u H1299 blaža i dugotrajna, a prisutna je i ranija aktivacija NF- $\kappa$ B-a. S obzirom da smo ispitivanjem endogene aktivnosti TLR5 utvrdili da se stanična linija WI-38 može stimulirati flagelinom, za razliku od stanične linije H1299, razlika je očekivana i govori u prilog poremećaja regulacijskih mehanizama u stanicama karcinoma. Važno je naglasiti da u prisutnosti ispitivane varijante dolazi do dodatnog poremećaja u prijenosu signala, s tim da se u stanicama zdravih pluća zadržava obrazac samoregulacije te se signal ubrzo utišava, dok se u stanicama karcinoma prati njegova produžena aktivnost. Ako ponovno pogledamo istraživanje Zhoua i suradnika prema kojemu aktivacija TLR5 ima donekle protektivni učinak na nastanak karcinoma pluća, tada je logična slabija reaktivnost u stanicama karcinoma.<sup>102</sup>

Ispitivanjem vijabilnosti stanica H1299 u uvjetima kostimulacije flagelinom i citostaticima utvrđeno je da su stanice inficirane divljim tipom gena *TLR5* ili ispitivanom varijantom značajno smanjene vijabilnosti u odnosu na nestimulirane i netretirane stanice. Smanjena vijabilnost bila je osobito izražena kod stanica s prekomjernom ekspresijom ispitivane varijante i to u svim uvjetima stimulacije karboplatinom i paklitakselom te gotovo u svim uvjetima stimulacije cisplatinom. Ovaj rezultat ukazuje na sinergistički učinak flagelina i citostatika na stanice karcinoma koji je naročito izražen kod stanica s prekomjernom ekspresijom ispitivane varijante.

Da stimulacija flagelinom sama po sebi može dovesti do smanjenja vijabilnosti tumorskih stanica dokazali su Zhou H. i suradnici 2014. godine na staničnoj liniji karcinoma pluća SPC-A1 te Zhou SX. i suradnici 2012. na staničnoj liniji A549 i animalnim modelima.<sup>102,171</sup> Slične rezultate na stanicama karcinoma dojke dobio je Cai sa suradnicima 2011. godine.<sup>167</sup> Također, već je dugo poznato da kombinacija citostatika s različitim molekulama povećava vjerojatnost supresije tumorskog rasta.

Citostatici su lijekovi čiji je učinak na stanice nespecifičan. Iako djeluju na različite stanične strukture, osnovni im je mehanizam ometanje proliferacije upletanjem u stanični ciklus, zbog čega su najdjelotvorniji u stanicama koje se brzo dijele.<sup>172</sup> No monoterapija citostaticima pokazala je slab i kratkotrajan učinak te su se vrlo rano u liječenju malignih bolesti počele koristiti kombinacije ovih lijekova. Ovaj koncept pokazao se djelotvornijim jer je omogućio postizanje maksimalnog učinka na tumor uz smanjenje toksičnosti za zdrava tkiva. Stoga se ubrzo počeo primjenjivati u većini malignih bolesti te je postao standard onkološkog liječenja.<sup>173</sup> Osim kombinacije dvaju ili više citostatika, danas se u liječenju karcinoma koriste ili ispituju kombinacije citostatika s ciljanim lijekovima, imunoterapijom, hormonskim lijekovima, monoklonskim protutijelima i mnoštvom drugih molekula, za koje se pokazalo da djeluju na neko od obilježja tumora.<sup>174</sup>

Djelujući preko TLR5, flagelin dovodi do aktivacije unutarstaničnih signalnih puteva i transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B. Možemo pretpostaviti da, a istraživanje Ledouxa i suradnika iz 2014. govori tome u prilog, stimulacija flagelinom sasvim sigurno pokreće i niz drugih staničnih procesa, uključujući diobu stanice te time omogućava veću učinkovitost citostatika.<sup>175</sup> Jači učinak na smanjenje vijabilnosti stanica s varijantom može se pripisati dugotrajnijoj ili jačoj aktivaciji receptora u uvjetima stimulacije, što se donekle slaže s našim prethodnim rezultatima. No moguće je da je zajednički učinak flagelina i citostatika posljedica nekog drugog mehanizma jer se ni za mnoge druge uobičajene kombinacije pravi mehanizam sinergističkog djelovanja još ne zna.<sup>174</sup>

Ispitivanjem migracijskog potencijala stanica H1299 utvrđen je trend pojačane migracije stanica s divljim tipom gena *TLR5* stimuliranih flagelinom u odnosu na nestimulirane stanice, a trend smanjene migracije stanica s prekomjerno eksprimiranom varijantom rs2072493/N592S u istim uvjetima. Trend je zabilježen u trima biološkim replikama, ali je statistička značajnost potvrđena samo u jednoj. Ipak, ovaj rezultat ukazuje na različitu sposobnost migracije stanica s divljim tipom u odnosu na stanice s varijantom u uvjetima stimulacije flagelinom.



U već spomenutom radu Zhoua i suradnika utvrđeno je da stimulacija flagelinom, osim što smanjuje vijabilnost stanica karcinoma pluća SPC-A1, inhibira i njihovu sposobnost migracije, to jest invazivnost. Ako to preslikamo na naše rezultate, možemo zaključiti da se stanice s prekomjerno eksprimiranom varijantom ponašaju poput tumorskih stanica, a stanice s divljim tipom gena ne.<sup>102</sup>

Ukratko, naše je istraživanje potvrdilo utjecaj ispitivane varijante na promjenu aktivnosti NF- $\kappa$ B-a, promjenu aktivnosti nizvodnih signalnih molekula na proteinskoj razini te promjenu u pokretljivosti stanica u uvjetima stimulacije flagelinom. Vjerojatno najznačajnijim možemo smatrati rezultat dobiven istovremenom stimulacijom stanica karcinoma pluća flagelinom i različitim citostaticima, a koji ide u prilog utjecaja ispitivane varijante na smanjenje vijabilnosti stanica u odnosu na stanice s divljim tipom gena. Ovakav rezultat ukazuje na proliferacijski kapacitet varijante, odnosno njezin maligni potencijal.

Dobiveni rezultati ne mogu se u potpunosti jednoznačno interpretirati, ali nedvojbeno ukazuju na razlike u ekspresiji TLR5, prijenosu signala te karakteristikama stanica u ovisnosti o prisutnosti varijante rs2072493/N592S. Iz toga se može zaključiti da ova varijanta na neki način mijenja funkciju gena *TLR5* i već to je značajan i važan rezultat. Iako smo dijelom potvrdili hipotezu prema kojoj je ova varijanta povezana s neimunskim procesima koji prethode nastanku karcinoma pluća, njezina uloga u karcinomu pluća tek treba biti istražena.

Dosadašnja istraživanja često su kontradiktorna i ponekad je teško sa sigurnošću komparirati rezultate. Povećana ekspresija TLR5 kao što je navedeno povezuje se s duljim vremenom do progresije bolesti kod oboljelih od karcinoma pluća, a mogući protutumorski učinak povećane ekspresije TLR5 opisuje se i kod kolorektalnog karcinoma i karcinoma dojke.<sup>167,176</sup> Međutim kod karcinoma želuca i karcinoma jezika nađen je upravo suprotan učinak.<sup>22,168</sup> Pretpostavlja se da su razlike uvjetovane drukčijim odgovorom stanica na stimulaciju flagelinom, a moguće je da su posljedica drukčijeg dizajna istraživanja. Čak ni jedino istraživanje provedeno kod oboljelih od karcinoma pluća nemalih stanica nije u potpunosti jednoznačno. Iako je visoka TLR5 ekspresija bila u dobroj korelaciji s duljim vremenom do progresije bolesti, istovremeno nije imala učinak na tumorski rast i metastaziranje, a bila je i statistički značajno povezana sa zahvaćenošću limfnih čvorova.<sup>102</sup>

Unatoč znatno boljem razumijevanju funkcije TLR-a u prirođenom i stečenom imunitetu, još uvijek je mnoštvo nepoznanica. Receptori TLR samo su dio kompleksnog sustava čiji mnogi dijelovi još nisu istraženi. A upravo je brojnost i isprepletenost molekula i signalnih puteva garancija precizne regulacije staničnih procesa u različitim okolnostima. U konačnici, velika većina ovih istraživanja objavljena je prije spoznaje o utjecaju polimorfizama na ekspresiju gena za receptore TLR.

U svakom slučaju, bilo koje istraživanje TLR-a i njihovih kritičnih nizvodnih kontrolnih točaka u plućnim stanicama sigurno može doprinijeti boljem razumijevanju patogeneze karcinoma pluća i pomoći u razvoju specifične terapije. Istovremeno, jedan od najvećih izazova u molekularnoj biologiji danas je između više od sto milijuna polimorfizama pronaći varijantu ili skupinu varijanti odgovornih za neku bolest.

Ovaj rad svakako predstavlja originalan doprinos znanosti i značajan je jer sličnih istraživanja vezanih uz polimorfnu varijantu rs2072493/N592S ima vrlo malo, a vezano uz karcinom pluća ih zapravo ni nema. Stoga svaki rezultat ima određenu vrijednost i važan je za daljnja istraživanja. Interpretacija dobivenih rezultata otežana je nemogućnošću komparacije s ranijim istraživanjima no to u konačnici može biti i prednost. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem svakako trebaju potvrdu ili negaciju u novim istraživanjima, prije svega na kliničkim materijalima.



### 6. ZAKLJUČCI

U skladu sa zadanim specifičnim ciljevima, ovim istraživanjem utvrđena je funkcionalna sposobnost ispitivane varijante i određen proliferacijski kapacitet stanica metastatskog karcinoma pluća H1299 koje nose varijantu rs2072493/N592S gena *TLR5*.

Najvažniji zaključci proizašli iz ovog istraživanja jesu:

1. Mjerenjem prijenosa signala u zdravim i tumorskim epitelnim stanicama pluća utvrđeno je da polimorfna varijanta rs2072493/N592S odgovara na stimulaciju specifičnim ligandom flagelinom, pri čemu stimulacija flagelinom izaziva slabiji porast aktivnosti signalnog puta NF- $\kappa$ B u stanicama s prekomjernom ekspresijom varijante u odnosu na divlji tip mjereno luciferaznim testom na staničnim linijama zdravih pluća WI-38 i adenokarcinoma pluća A549.
2. Na proteinskoj razini, u uvjetima stimulacije flagelinom, prisutnost varijante rs2072493/N592S dovodi do produljene aktivnosti NF- $\kappa$ B-a u stanicama metastatskog karcinoma pluća H1299 te do kašnjenja aktivacije proteina p38 i u staničnoj liniji zdravih pluća WI-38 i u staničnoj liniji H1299.
3. U uvjetima kostimulacije flagelinom osjetljivost na citostatike stanica karcinoma pluća (H1299) statistički je značajno veća, a samim time vijabilnost stanica značajno manja kod stanica s prekomjernom ekspresijom varijante rs2072493/N592S u odnosu na stanice s divljim tipom gena *TLR5*.
4. Stimulacija flagelinom dovodi do smanjene pokretljivosti stanica karcinoma pluća (H1299) s prekomjernom ekspresijom varijante rs2072493/N592S, u odnosu na stanice s divljim tipom gena.
5. Sveukupno se može zaključiti da ovo istraživanje ukazuje na moguću ulogu polimorfne varijante rs2072493/N592S u procesima koji prethode nastanku karcinoma pluća, ali su potrebna daljnja istraživanja da bi se ta uloga u potpunosti odredila.

## **7. POPIS LITERATURE**

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492
2. Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung Cancer: Epidemiology, etiology, and prevention. *Clin Chest Med.* 2011;32(4):605-44. doi: 10.1016/j.ccm.2011.09.001
3. World Health Organization (WHO). The top 10 causes of death [Internet]. Geneva (Switzerland): World Health Organization; c2018 [pristupljeno 8. 11. 2020.]. Dostupno na: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
4. Schwartz AG, Prysak GM, Bock CH, Cote ML. The molecular epidemiology of lung cancer. *Carcinogenesis.* 2007;28(3):507-18. doi: 10.1093/carcin/bgl253
5. Matakidou A, Eisen T, Houlston RS. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br J Cancer.* 2005;93(7):825-33. doi: 10.1038/sj.bjc.6602769
6. Mayne ST, Buenconsejo J, Janerich DT. Familial cancer history and lung cancer risk in United States nonsmoking men and women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999;8(12):1065-9.
7. Schwartz AG, Yang P, Swanson GM. Familial risk of lung cancer among nonsmokers and their relatives. *Am J Epidemiol.* 1996;144(6):554-62. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a008965
8. El-Zein RA, Young RP, Hopkins RJ, Etzel CJ. Genetic predisposition to chronic obstructive pulmonary disease and/or lung cancer: Important considerations when evaluating risk. *Cancer Prev Res (Phila).* 2012;5(4):522-7. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-12-0042
9. Brenner DR, McLaughlin JR, Hung RJ. Previous lung diseases and lung cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2011;6(3):e17479. doi: 10.1371/journal.pone.0017479
10. Yano T, Miura N, Takenaka T, Haro A, Okazaki H, Ohba T, i sur. Never-smoking nonsmall cell lung cancer as a separate entity: Clinicopathologic features and survival. *Cancer.* 2008;113(5):1012-8. doi: 10.1002/cncr.23679

11. Thun MJ, Hannan LM, Adams-Campbell LL, Boffetta P, Buring JE, Feskanich D, i sur. Lung cancer occurrence in never-smokers: An analysis of 13 cohorts and 22 cancer registry studies. *PLoS Med.* 2008;5(9):1357-71. doi: 10.1371/journal.pmed.0050185
12. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ.* 2006;13(5):816-25. doi: 10.1038/sj.cdd.4401850
13. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 1997;388(6640):394-7. doi: 10.1038/41131
14. Satoh T, Akira S. Toll-like receptor signaling and its inducible proteins. U: Gordon S, Dunn W, ur. *Myeloid cells in health and disease: A synthesis.* Washington, DC: ASM Press; 2017. Str. 447-53. doi: 10.1128/9781555819194.ch24
15. Botos I, Segal DM, Davies DR. The structural biology of Toll-like receptors. *Structure.* 2011;19(4):447-59. doi: 10.1016/j.str.2011.02.004
16. Khan AA, Khan Z, Warnakulasuriya S. Cancer-associated Toll-like receptor modulation and insinuation in infection susceptibility: Association or coincidence? *Ann Oncol.* 2016;27(6):984-97. doi: 10.1093/annonc/mdw053
17. Shi S, Xu C, Fang X, Zhang Y, Li H, Wen W, i sur. Expression profile of Toll-like receptors in human breast cancer. *Mol Med Rep.* 2020;21(2):786-94. doi: 10.3892/mmr.2019.10853
18. Ruuskanen M, Leivo I, Minn H, Vahlberg T, Haglund C, Hagström J, i sur. Expression of Toll-like receptors in non-endemic nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer.* 2019;19(1):624. doi: 10.1186/s12885-019-5816-9
19. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, i sur. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature.* 2001;410(6832):1099-103. doi: 10.1038/35074106
20. Yoon S Il, Kurnasov O, Natarajan V, Hong M, Gudkov AV, Osterman AL, i sur. Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling. *Science.* 2012;335(6070):859-64. doi: 10.1126/science.1215584
21. Meena NK, Ahuja V, Meena K, Paul J. Association of TLR5 gene polymorphisms in ulcerative colitis patients of North India and their role in cytokine homeostasis. *PLoS One.* 2015;10(3):e0120697. doi: 10.1371/journal.pone.0120697

22. Kauppila JH, Mattila AE, Karttunen TJ, Salo T. Toll-like receptor 5 (TLR5) expression is a novel predictive marker for recurrence and survival in squamous cell carcinoma of the tongue. *Br J Cancer*. 2013;108(3):638-43. doi: 10.1038/bjc.2012.589
23. Kasurinen A, Hagström J, Laitinen A, Kokkola A, Böckelman C, Haglund C. Evaluation of Toll-like receptors as prognostic biomarkers in gastric cancer: High tissue TLR5 predicts a better outcome. *Sci Rep*. 2019;9(1):12553. doi: 10.1038/s41598-019-49111-2
24. Husseinzadeh N, Davenport SM. Role of Toll-like receptors in cervical, endometrial and ovarian cancers: A review. *Gynecol Oncol*. 2014;135(2):359-63. doi: 10.1016/j.ygyno.2014.08.013
25. Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD, Zhao LP, Li SS, Laws RJ, i sur. A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J Exp Med*. 2003;198(10):1563-72. doi: 10.1084/jem.20031220
26. El-Omar EM, Ng MT, Hold GL. Polymorphisms in Toll-like receptor genes and risk of cancer. *Oncogene*. 2008;27(2):244-52. doi: 10.1038/sj.onc.1210912
27. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Clustered RefSNPs (rs) and other data computed in house [Internet]. Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information; 2005- [pristupljeno 26. 11. 2020.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs2072493>
28. Medvedev AE. Toll-like receptor polymorphisms, inflammatory and infectious diseases, allergies, and cancer. *J Interferon Cytokine Res*. 2013;33(9):467-84. doi: 10.1089/jir.2012.0140
29. Trejo-De La O A, Hernández-Sancén P, Maldonado-Bernal C. Relevance of single-nucleotide polymorphisms in human TLR genes to infectious and inflammatory diseases and cancer. *Genes Immun*. 2014;15(4):199-209. doi: 10.1038/gene.2014.10
30. Kurt H, Ozbayer C, Bayramoglu A, Gunes HV, Degirmenci İ, Oner KS, i sur. Determination of the relationship between rs4986790 and rs4986791 variants of TLR4 gene and lung cancer. *Inflammation*. 2016;39(1):166-71. doi: 10.1007/s10753-015-0235-9
31. Merx S, Zimmer W, Neumaier M, Ahmad-Nejad P. Characterization and functional investigation of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the human TLR5 gene. *Hum Mutat*. 2006;27(3):293. doi: 10.1002/humu.9409

32. Klimosch SN, Försti A, Eckert J, Knezevic J, Bevier M, von Schönfels W, i sur. Functional TLR5 genetic variants affect human colorectal cancer survival. *Cancer Res.* 2013;73(24):7232-42. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1746
33. Henrici AT. Primary cancer of the lung. *J Med Res.* 1912;26(3):395-404.1.
34. Schabath MB, Cote ML. Cancer progress and priorities: Lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2019;28(10):1563-79. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-19-0221
35. Wu KL, Tsai YM, Lien CT, Kuo PL, Hung JY. The roles of microRNA in lung cancer. *Int J Mol Sci.* 2019;20(7):1611. doi: 10.3390/ijms20071611
36. Bade BC, Dela Cruz CS. Lung cancer 2020: Epidemiology, etiology, and prevention. *Clin Chest Med.* 2020;41(1):1-24. doi: 10.1016/j.ccm.2019.10.001
37. Lamb D. Histological classification of lung cancer. *Thorax.* 1984;39(3):161-5. doi: 10.1136/thx.39.3.161
38. Travis WD. Classification of lung cancer. *Semin Roentgenol.* 2011;46(3):178-86. doi: 10.1053/j.ro.2011.02.003
39. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, i sur. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol.* 2015;10(9):1243-60. doi: 10.1097/JTO.0000000000000630
40. Govindan R, Page N, Morgensztern D, Read W, Tierney R, Vlahiotis A, i sur. Changing epidemiology of small-cell lung cancer in the United States over the last 30 years: Analysis of the surveillance, epidemiologic, and end results database. *J Clin Oncol.* 2006;24(28):4539-44. doi: 10.1200/JCO.2005.04.4859
41. Riaz SP, Lüchtenborg M, Coupland VH, Spicer J, Peake MD, Møller H. Trends in incidence of small cell lung cancer and all lung cancer. *Lung Cancer.* 2012;75(3):280-4. doi: 10.1016/j.lungcan.2011.08.004
42. Detterbeck FC, Boffa DJ, Kim AW, Tanoue LT. The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. *Chest.* 2017;151(1):193-203. doi: 10.1016/j.chest.2016.10.010
43. Bierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C, ur. TNM classification of malignant tumours. 8. izd. Chichester, West Sussex (UK): Wiley Blackwell; 2017.
44. Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck ER. Lung cancer: Diagnosis and management. *Am Fam Physician.* 2007;75(1):56-63.

45. National Cancer Institute. Cancer stat facts: lung and bronchus cancer [Internet]. Bethesda, MD: National Institutes of Health, National Cancer Institute, c2021 [pristupljeno 19. 6. 2021.]. Dostupno na: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html>
46. Wood DE, Kazerooni EA, Baum SL, Eapen GA, Ettinger DS, Hou L, i sur. Lung cancer screening, version 3.2018: Clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2018;16(4):412-41. doi: 10.6004/jnccn.2018.0020
47. Belanger AR, Akulian JA. An update on the role of advanced diagnostic bronchoscopy in the evaluation and staging of lung cancer. *Ther Adv Respir Dis*. 2017;11(5):211-21. doi: 10.1177/1753465817695981
48. Travis WD. Lung cancer pathology: Current concepts. *Clin Chest Med*. 2020;41(1):67-85. doi: 10.1016/j.ccm.2019.11.001
49. Ramos-Vara JA. Principles and methods of immunohistochemistry. *Methods Mol Biol*. 2017;1641:115-28. doi: 10.1007/978-1-4939-7172-5\_5
50. Khoo C, Rogers TM, Fellowes A, Bell A, Fox S. Molecular methods for somatic mutation testing in lung adenocarcinoma: EGFR and beyond. *Transl Lung Cancer Res*. 2015;4(2):126-41. doi: 10.3978/j.issn.2218-6751.2015.01.10
51. Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, Kwon R, Curran WJ Jr, Wu YL, i sur. Lung cancer: Current therapies and new targeted treatments. *Lancet*. 2017;389(10066):299-311. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30958-8
52. Metro G, Finocchiaro G, Toschi L, Bartolini S, Magrini E, Cancellieri A, i sur. Epidermal growth factor receptor (EGFR) targeted therapies in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Rev Recent Clin Trials*. 2008;1(1):1-13. doi: 10.2174/157488706775246157
53. Bhattacharya P, Dessain SK, Evans TL. Palliative care in lung cancer: When to start. *Curr Oncol Rep*. 2018;20(11):90. doi: 10.1007/s11912-018-0731-9
54. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000;343(1):37-49. doi: 10.1056/NEJM200007063430107
55. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med*. 2000;343(2):108-17. doi: 10.1056/NEJM200007133430207
56. Medzhitov R, Janeway C Jr. Advances in immunology: Innate immunity. *N Engl J Med*. 2000;343(5):338-44. doi: 10.1056/NEJM200008033430506

57. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-52. doi: 10.1038/32588
58. Mellman I. Dendritic cells: master regulators of the immune response. *Cancer Immunol Res*. 2013;1(3):145-9. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0102
59. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*. 2001;357(9270):1777-89. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04904-7
60. Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res*. 2010;20(1):34-50. doi: 10.1038/cr.2009.139
61. Riihilä P, Nissinen L, Knuutila J, Nezhad PR, Viiklepp K, Kähäri VM. Complement system in cutaneous squamous cell carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2019;20(14):3550. doi: 10.3390/ijms20143550
62. Condon TV, Sawyer RT, Fenton MJ, Riches DWH. Lung dendritic cells at the innate-adaptive immune interface. *J Leukoc Biol*. 2011;90(5):883-95. doi: 10.1189/jlb.0311134
63. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(1):11-22. doi: 10.1038/nrc1252
64. Briney B, Inderbitzin A, Joyce C, Burton DR. Commonality despite exceptional diversity in the baseline human antibody repertoire. *Nature*. 2019;566(7744):393-7. doi: 10.1038/s41586-019-0879-y
65. Miles JJ, Douek DC, Price DA. Bias in the  $\alpha$ B T-cell repertoire: Implications for disease pathogenesis and vaccination. *Immunol Cell Biol*. 2011;89(3):375-87. doi: 10.1038/icb.2010.139
66. Jäger A, Kuchroo VK. Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scand J Immunol*. 2010;72(3):173-84. doi: 10.1111/j.1365-3083.2010.02432.x
67. Ehrlich P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk*. 1909;5:273-90.
68. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res*. 1970;13:1-27. doi: 10.1159/000386035
69. Thomas L. On immunosurveillance in human cancer. *Yale J Biol Med*. 1982;55(3-4):329-33.

70. Stutman O. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science*. 1974;183(4124):534-6. doi: 10.1126/science.183.4124.534
71. Stutman O. Immunodepression and malignancy. *Adv Cancer Res*. 1976;22:261-422. doi: 10.1016/S0065-230X(08)60179-7
72. Pardoll D. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol*. 2003;21:807-39. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141135
73. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331(6024):1565-70. doi: 10.1126/science.1203486
74. Jiang Y, Li Y, Zhu B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death Dis*. 2015;6(6):e1792. doi: 10.1038/cddis.2015.162
75. Menon S, Shin S, Dy G. Advances in cancer immunotherapy in solid tumors. *Cancers (Basel)*. 2016;8(12):106. doi: 10.3390/cancers8120106
76. De Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(1):24-37. doi: 10.1038/nrc1782
77. Azad N, Rojanasakul Y, Vallyathan V. Inflammation and lung cancer: Roles of reactive oxygen/nitrogen species. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2008;11(1):1-15. doi: 10.1080/10937400701436460
78. Virchow R. Aetiologie der neoplastischen Geschwülste; Pathogenie der neoplastischen Geschwülste. U: Die krankhaften Geschwülste. Sv. 1. Berlin: August Hirschwald; 1863. Str. 57-101.
79. Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer: An ancient link with novel potentials. *Int J Cancer*. 2007;121(11):2373-80. doi: 10.1002/ijc.23173
80. Multhoff G, Molls M, Radons J. Chronic inflammation in cancer development. *Front Immunol*. 2012;2:98. doi: 10.3389/fimmu.2011.00098
81. Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest*. 2007;117(5):1175-83. doi: 10.1172/JCI31537
82. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002;3(11):991-8. doi: 10.1038/ni1102-991



83. O'Callaghan DS, O'Donnell D, O'Connell F, O'Byrne KJ. The role of inflammation in the pathogenesis of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2010;5(12):2024-36. doi: 10.1097/JTO.0b013e3181f387e4
84. Knaapen AM, Borm PJA, Albrecht C, Schins RPF. Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *Int J Cancer.* 2004;109(6):799-809. doi: 10.1002/ijc.11708
85. Stewart ZA, Pietenpol JA. p53 signaling and cell cycle checkpoints. *Chem Res Toxicol.* 2001;14(3):243-63. doi: 10.1021/tx000199t
86. Hashimoto C, Hudson KL, Anderson K V. The Toll gene of drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell.* 1988;52(2):269-79. doi: 10.1016/0092-8674(88)90516-8
87. Arora S, Ahmad S, Irshad R, Goyal Y, Rafat S, Siddiqui N, i sur. TLRs in pulmonary diseases. *Life Sci.* 2019;233:116671. doi: 10.1016/j.lfs.2019.116671
88. Ganesan S, Sajjan US. Innate immunity of airway epithelium and COPD. U: Mahad R, ur. *Emphysema [Internet].* London: IntechOpen; 2012 [pristupljeno 17.11.2020.]. Str. 19-48. doi: 10.5772/30828
89. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 2010;140(6):805-20. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022
90. Godfroy JI 3rd, Roostan M, Moroz YS, Korendovych IV, Yin H. Isolated Toll-like receptor transmembrane domains are capable of oligomerization. *PLoS One.* 2012;7(11):e48875. doi: 10.1371/journal.pone.0048875
91. Semlali A, Alnemari R, Almalki E, Alrashed R, Alanazi M. Toll-like receptors gene polymorphism and susceptibility to cancer development. U: Liu Y, ur. *Genetic diversity and disease susceptibility [Internet].* London: IntechOpen; 2018 [pristupljeno 17.11.2020.]. doi: 10.5772/intechopen.78029
92. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NFκB system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2016;8(3):227-41. doi: 10.1002/wsbm.1331
93. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006;124(4):783-801. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015
94. Choe J, Kelker MS, Wilson IA. Structural biology: Crystal structure of human Toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science.* 2005;309(5734):581-5. doi: 10.1126/science.1115253

95. Zhang Z, Ohto U, Shibata T, Krayukhina E, Taoka M, Yamauchi Y, i sur. Structural analysis reveals that Toll-like receptor 7 is a dual receptor for guanosine and single-stranded RNA. *Immunity*. 2016;45(4):737-48. doi: 10.1016/j.immuni.2016.09.011
96. Ishii N, Funami K, Tatematsu M, Seya T, Matsumoto M. Endosomal localization of TLR8 confers distinctive proteolytic processing on human myeloid cells. *J Immunol*. 2014;193(10):5118-28. doi: 10.4049/jimmunol.1401375
97. Lamphier MS, Sirois CM, Verma A, Golenbock DT, Latz E. TLR9 and the recognition of self and non-self nucleic acids. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1082:31-43. doi: 10.1196/annals.1348.005
98. Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Toll-like receptors and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(1):57-63. doi: 10.1038/nrc2541
99. Pradere JP, Dapito DH, Schwabe RF. The yin and yang of Toll-like receptors in cancer. *Oncogene*. 2014;33(27):3485-95. doi: 10.1038/onc.2013.302
100. Pinto A, Morello S, Sorrentino R. Lung cancer and Toll-like receptors. *Cancer Immunol Immunother*. 2011;60(9):1211-20. doi: 10.1007/s00262-011-1057-8
101. Gu J, Liu Y, Xie B, Ye P, Huang J, Lu Z. Roles of Toll-like receptors: From inflammation to lung cancer progression (Review). *Biomed Rep*. 2018;8(2):126-32. doi: 10.3892/br.2017.1034
102. Zhou H, Chen JH, Hu J, Luo YZ, Li F, Xiao L, i sur. High expression of Toll-like receptor 5 correlates with better prognosis in non-small-cell lung cancer: An anti-tumor effect of TLR5 signaling in non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2014;140(4):633-43. doi: 10.1007/s00432-014-1616-4
103. Balakrishnan VS, Rao M, Jaber BL; DialGene Consortium. Genomic medicine, gene polymorphisms, and human biological diversity. *Semin Dial*. 2005;18(1):37-40. doi: 10.1111/j.1525-139X.2005.18102.x
104. Green ED, Watson JD, Collins FS. Human Genome Project: Twenty-five years of big biology. *Nature*. 2015;526(7571):29-31. doi: 10.1038/526029a
105. 1000 Genomes Project Consortium; Auton A, Abecasis GR, i sur. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68-74. doi: 10.1038/nature15393
106. Karki R, Pandya D, Elston RC, Ferlini C. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. *BMC Med Genomics*. 2015;8:37. doi: 10.1186/s12920-015-0115-z

107. Trent RJ. DNA genetic testing. U: *Molecular medicine: Genomics to personalized healthcare*. Amsterdam: Elsevier; 2012. Str. 81-115. doi: 10.1016/B978-0-12-381451-7.00003-7
108. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene*. 1999;234(2):177-86. doi: 10.1016/S0378-1119(99)00219-x
109. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Mutations: types and causes*. U: *Molecular cell biology*. 4. izd. New York: W. H. Freeman; c2000.
110. Clancy S. Genetic mutation. *Nature Education*. 2008;1(1):187.
111. Jin Y, Wang J, Bachtiar M, Chong SS, Lee CGL. Architecture of polymorphisms in the human genome reveals functionally important and positively selected variants in immune response and drug transporter genes. *Hum Genomics*. 2018;12(1):43. doi: 10.1186/s40246-018-0175-1
112. Shastry BS. SNPs: impact on gene function and phenotype. *Methods Mol Biol*. 2009;578:3-22. doi: 10.1007/978-1-60327-411-1\_1
113. Chauhan T. An introduction to Single Nucleotide Polymorphism (SNP) [Internet]. [s.l.]: GeneticEducation; c2021 [pristupljeno 17. 11. 2020.]. Dostupno na: <https://geneticeducation.co.in/an-introduction-to-single-nucleotide-polymorphism-snp/>
114. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, i sur. dbSNP: The NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(1):308-11. doi: 10.1093/nar/29.1.308
115. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, i sur. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 update. *Hum Mutat*. 2016;37(6):564-9. doi: 10.1002/humu.22981
116. Mukherjee S, Huda S, Sinha Babu SP. Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: A review. *Scand J Immunol*. 2019;90(1):e12771. doi: 10.1111/sji.12771
117. Blohmke CJ, Park J, Hirschfeld AF, Victor RE, Schneiderman J, Stefanowicz D, i sur. TLR5 as an anti-inflammatory target and modifier gene in cystic fibrosis. *J Immunol*. 2010;185(12):7731-8. doi: 10.4049/jimmunol.1001513
118. Shuang C, Weiguang Y, Zhenkun F, Yike H, Jiankun Y, Jing X, i sur. Toll-like receptor 5 gene polymorphism is associated with breast cancer susceptibility. *Oncotarget*. 2017;8(51):88622-9. doi: 10.18632/oncotarget.20242

119. Gomaz A, Pavelić J, Matijević Glavan T. The polymorphisms in Toll-like receptor genes and cancer risk. *Periodicum Biologorum*. 2012;114(4):461-9.
120. Kutikhin AG. Association of polymorphisms in TLR genes and in genes of the Toll-like receptor signaling pathway with cancer risk. *Hum Immunol*. 2011;72(11):1095-116. doi: 10.1016/j.humimm.2011.07.307
121. Jedrzejczak-Silicka M. History of cell culture. U: Gowder SJT, ur. *New insights into cell culture technology* [Internet]. London: IntechOpen; 2017 [pristupljeno 7.12.2020.]. doi: 10.5772/66905
122. Lea T, Martínez-Maqueda D, Miralles B, Recio I, Verguawen H, Kleiveland CR. General introduction to cells, cell lines and cell culture. U: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, i sur., ur. *The impact of food bioactives on health: In vitro and ex vivo models*. Cham: Springer Open; 2015. Str. 83-93.
123. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1965;37(3):614-36. doi: 10.1016/0014-4827(65)90211-9
124. Lieber M, Todaro G, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer*. 1976;17(1):62-70. doi: 10.1002/ijc.2910170110
125. ATCC. Lung cancer and normal cell lines [Internet]. Manassas, VA: American Type Culture Collection (ATCC); 2021- [pristupljeno 2. 2. 2017.]. Dostupno na: <https://www.atcc.org/en/search#q=lungcancerandnormalcelllines&sort=relevancy&numberOfResults=12>
126. Gazdar AF, Girard L, Lockwood WW, Lam WL, Minna JD. Lung cancer cell lines as tools for biomedical discovery and research. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(17):1310-21. doi: 10.1093/jnci/djq279
127. Ren J, Karna S, Lee HM, Yoo SM, Na D. Artificial transformation methodologies for improving the efficiency of plasmid DNA transformation and simplifying its use. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019;103(23-24):9205-15. doi: 10.1007/s00253-019-10173-x
128. Clark DP, Pazdernik NJ, McGehee MR. Bacterial genetics. U: *Molecular biology*. 3. izd. London: Elsevier; 2019. Str. 896-924. doi: 10.1016/B978-0-12-813288-3.00028-8
129. Julin D. Plasmid cloning vectors. U: Bell E, ur. *Molecular life sciences* [Internet]. New York: Springer; 2014 [pristupljeno 2.8.2020.]. doi: 10.1007/978-1-4614-6436-5\_86-1

130. Clark DP, Pazdernik NJ, McGehee MR. Plasmids. U: Molecular biology. 3. izd. London: Elsevier; 2019. Str. 712-48. doi: 10.1016/B978-0-12-813288-3.00023-9
131. Boffey SA. Plasmid isolation. U: Walker JM, Gaastra W, ur. Techniques in molecular biology. Dordrecht; Springer; 1983. Str. 185-95. doi: 10.1007/978-94-011-6563-1\_10
132. MyBioSource. Plasmid isolation [Internet]. San Diego, CA: MyBioSource; c2022 [pristupljeno 2. 8. 2020.]. Dostupno na: <https://www.mybiosource.com/learn/testing-procedures/plasmid-isolation>
133. Durland J, Ahmadian-Moghadam MH. Genetics, mutagenesis. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020- [ažurirano 21. 9. 2021.; pristupljeno 11. 8. 2020.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560519/>
134. Promega. Compare plasmid purification kits [Internet]. Madison, WI: Promega; c2021 [pristupljeno 5. 4. 2021.]. Dostupno na: <https://worldwide.promega.com/products/nucleic-acid-extraction/plasmid-purification/plasmid-purification-kits/>
135. Biontex. Transfection [Internet]. München: Biontex; c2016 [pristupljeno 2. 2. 2017.]. Dostupno na: <https://www.biontex.com/en/transfection>
136. U.S. National Library of Medicine. Transduction, Genetic. U: MeSH Browser [Internet]. Bethesda, MD: National Library of Medicine; c2021 [pristupljeno 7.12.2020.]. Dostupno na: <https://meshb.nlm.nih.gov/record/ui?ui=D014161>
137. Ding W, Bergeron E, Lachaine R, Meunier M. Nanomaterial-assisted light-induced poration and transfection of mammalian cells. U: Hamblin MR, Avci P, ur. Applications of Nanoscience in Photomedicine. [Amsterdam]: Chandos Publishing; 2015. Str. 331-76. doi: 10.1533/9781908818782.331
138. Zhang WW. Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther.* 1999;6(2):113-38. doi: 10.1038/sj.cgt.7700024
139. Khare R, Chen YC, Weaver EA, Barry MA. Advances and future challenges in adenoviral vector pharmacology and targeting. *Curr Gene Ther.* 2011;11(4):241-58. doi: 10.2174/156652311796150363
140. Russell WC. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol.* 2000;81(Pt 11):2573-604. doi: 10.1099/0022-1317-81-11-2573
141. Hitt MM, Addison CL, Graham FL. Human adenovirus vectors for gene transfer into mammalian cells. *Adv Pharmacol.* 1997;40:137-206. doi: 10.1016/S1054-3589(08)60140-4

142. Debnath M, Prasad GBKS, Bisen PS. Reporter gene. U: Molecular diagnostics: Promises and possibilities. Dordrecht: Springer; 2010. Str. 71-84. doi: 10.1007/978-90-481-3261-4\_5
143. Chong ZX, Yeap SK, Ho WY. Transfection types, methods and strategies: A technical review. PeerJ. 2021;9:e11165. doi: 10.7717/peerj.11165
144. Lee CH. A simple outline of methods for protein isolation and purification. Endocrinol Metab (Seoul). 2017;32(1):18-22. doi: 10.3803/EnM.2017.32.1.18
145. Mahmood T, Yang PC. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. N Am J Med Sci. 2012;4(9):429-34. doi: 10.4103/1947-2714.100998
146. Burnette WN. "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem. 1981;112(2):195-203. doi: 10.1016/0003-2697(81)90281-5
147. Li-Cor. Positive and negative controls [Internet]. Lincoln, NE: Li-Cor; c2021 [pristupljeno 10. 2. 2022.]. Dostupno na: [https://www.licor.com/bio/guide/westerns/control\\_samples](https://www.licor.com/bio/guide/westerns/control_samples)
148. Peng X, Nelson ES, Maiers JL, DeMali KA. New insights into vinculin function and regulation. Int Rev Cell Mol Biol. 2011;287:191-231. doi: 10.1016/B978-0-12-386043-9.00005-0
149. Guo YJ, Pan WW, Liu SB, Shen ZF, Xu Y, Hu LL. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. Exp Ther Med. 2020;19(3):1997-2007. doi: 10.3892/etm.2020.8454
150. Arthur JSC, Ley SC. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. Nat Rev Immunol. 2013;13(9):679-92. doi: 10.1038/nri3495
151. Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. Cell Res. 2005;15(1):11-8. doi: 10.1038/sj.cr.7290257
152. Alhajj M, Farhana A. Enzyme linked immunosorbent assay. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020- [ažurirano 2. 2. 2022.; pristupljeno 5. 4. 2021.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>
153. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. J Immunol. 1972;109(1):129-35.

154. Konstantinou GN. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Methods Mol Biol.* 2017;1592:79-94. doi: 10.1007/978-1-4939-6925-8\_7
155. Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem.* 2018;120(3):159-67. doi: 10.1016/j.acthis.2018.02.005
156. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, i sur. Cell Viability Assays. U: Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda, MD: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-[ažurirano 1. 7. 2016.; pristupljeno 10. 3. 2017.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
157. Pijuan J, Barceló C, Moreno DF, Maiques O, Sisó P, Marti RM, i sur. In vitro cell migration, invasion, and adhesion assays: From cell imaging to data analysis. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7:107. doi: 10.3389/fcell.2019.00107
158. Chen HC. Boyden chamber assay. *Methods Mol Biol.* 2005;294:15-22. doi: 10.1385/1-59259-860-9:015
159. Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med.* 1962;115(3):453-66. doi: 10.1084/jem.115.3.453
160. Hulkower KI, Herber RL. Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. *Pharmaceutics.* 2011;3(1):107-24. doi: 10.3390/pharmaceutics3010107
161. Marshall J. Transwell(®) invasion assays. *Methods Mol Biol.* 2011;769:97-110. doi: 10.1007/978-1-61779-207-6\_8
162. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity.* 2011;34(5):637-50. doi: 10.1016/j.immuni.2011.05.006
163. McCall KD, Muccioli M, Benencia F. Toll-like receptors signaling in the tumor microenvironment. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1223:81-97. doi: 10.1007/978-3-030-35582-1\_5
164. Brackett CM, Kojouharov B, Veith J, Greene KF, Burdelya LG, Gollnick SO, i sur. Toll-like receptor-5 agonist, entolimod, suppresses metastasis and induces immunity by stimulating an NK-dendritic-CD8+ T-cell axis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(7):E874-83. doi: 10.1073/pnas.1521359113



165. Bissonnette EY, Lauzon-Joset JF, Debley JS, Ziegler SF. Cross-talk between alveolar macrophages and lung epithelial cells is essential to maintain lung homeostasis. *Front Immunol.* 2020;11:583042. doi: 10.3389/fimmu.2020.583042
166. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
167. Cai Z, Sanchez A, Shi Z, Zhang T, Liu M, Zhang D. Activation of Toll-like receptor 5 on breast cancer cells by flagellin suppresses cell proliferation and tumor growth. *Cancer Res.* 2011;71(7):2466-75. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1993
168. Song EJ, Kang MJ, Kim YS, Kim SM, Lee SE, Kim CH, i sur. Flagellin promotes the proliferation of gastric cancer cells via the Toll-like receptor 5. *Int J Mol Med.* 2011;28(1):115-9. doi: 10.3892/ijmm.2011.656
169. Martínez-Limón A, Joaquin M, Caballero M, Posas F, de Nadal E. The p38 pathway: From biology to cancer therapy. *Int J Mol Sci.* 2020;21(6):1913. doi: 10.3390/ijms21061913
170. Xia L, Tan S, Zhou Y, Lin J, Wang H, Oyang L, i sur. Role of the NFκB-signaling pathway in cancer. *Onco Targets Ther.* 2018;11:2063-73. doi: 10.2147/OTT.S161109
171. Zhou SX, Li FS, Qiao YL, Zhang XQ, Wang ZD. Toll-like receptor 5 agonist inhibition of growth of A549 lung cancer cells in vivo in a MyD88 dependent manner. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13(6):2807-12. doi: 10.7314/APJCP.2012.13.6.2807
172. Schirmacher V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *Int J Oncol.* 2019;54(2):407-19. doi: 10.3892/ijo.2018.4661
173. DeVita VT Jr, Chu E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res.* 2008;68(21):8643-53. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6611
174. Bailly C, Thuru X, Quesnel B. Combined cytotoxic chemotherapy and immunotherapy of cancer: modern times. *NAR Cancer.* 2020;2(1):zcaa002. doi: 10.1093/narcan/zcaa002
175. Ledoux AC, Perkins ND. NF-κB and the cell cycle. *Biochem Soc Trans.* 2014;42(1):76-81. doi: 10.1042/BST20130156
176. Rhee SH, Im E, Pothoulakis C. Toll-like receptor 5 engagement modulates tumor development and growth in a mouse xenograft model of human colon cancer. *Gastroenterology.* 2008;135(2):518-28. doi: 10.1053/j.gastro.2008.04.022



## **8. PRILOZI**

### **8.1. PRILOG 1**

#### **8.1.1. Strane kratice upotrijebljene u tekstu**

Ad = adenovirus

ALK = anaplastic lymphoma kinase

AP-1 = activator protein-1

APC = antigen-presenting cell

BCG = bacillus Calmette-Guerin

bp = base pair

BRAF = B-raf proto-oncogene

CD = cluster of differentiation

cDC = conventional dendritic cells

CLR = C-type lectin receptors

CpG ODN = 5'-C-phosphate-G-3' oligodeoxynucleotide

CT = computed tomography

CTLA-4 = cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

DAMPs = damage-associated molecular patterns

DC = dendritic cell

DI water = deionization water

DMEM = Dulbecco's modified Eagle's medium

DNA = deoxyribonucleic acid

DPBS = Dulbecco's phosphate buffered saline

dsRNA = double-stranded ribonucleic acid

EBUS = endobronchial ultrasound

EC = endothelial cell

EGFR = epidermal growth factor receptor

ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay

ERK = extracellular signal-regulated kinase

FBS = fetal bovine serum

FISH = fluorescence in situ hybridization

GFP = green fluorescent protein

HER2 = human epidermal growth factor receptor 2

HGVS = Human genome variation society

IF- $\gamma$  = interferon gamma

IKK = I $\kappa$ B kinase

IKK = I $\kappa$ B kinaza

IL = interleukin

IRAK = IL-1 receptor associated kinase

I $\kappa$ B = inhibitor of NF- $\kappa$ B

JNK = c-Jun N-terminal kinase

LB = Luria-Bertani

LNRDC=lymph node-resident dendritic cell

LRR = leucin-rich repeats

MAPK = mitogen-activated protein kinase

MD-2 = myeloid differentiation factor 2

MEM = minimum essential medium

MET = MET proto-oncogene receptor tyrosine kinase

MHC = major histocompatibility complex

mq H<sub>2</sub>O = milli-q water (oznaka za vodu koja je pročišćena smolastim filtrima i deionizirana do visokog stupnja)

mRNA = messenger ribonucleic acid

MyD88 = myeloid differentiation primary response protein 88

NCBI = National Center for Biotechnology Information

NF- $\kappa$ B = nuclear factor-kappa B

NGS = next generation sequencing

NI = non-infected cells

NK = natural killer cells

NLR = nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)- Leucin Rich Repeats (LRR)-containing receptors

NON = non-stimulated and non-treated cells

NRG1 = neuregulin-1

NS = non-stimulated cells

NSCLC - non-small cell lung cancer

NT = non-transfected cells

NTRK = neurotrophic receptor tyrosine kinase

OD = optical density

PAMPs = pathogen-associated molecular patterns

PBS-T = phosphate buffered saline + Tween™ 20

PCR = polymerase chain reaction

PD-1 = programmed cell death protein-1

pDC = plasmacytoid dendritic cell

PET-CT = positron emission tomography- computed tomography

ph-ERK = phosphorylated ERK

PRR = pattern recognition receptors

PVDF = polyvinylidene difluoride (vrsta polimera)

refSNP = reference SNP

RET = ret proto-oncogene

RFLP = restriction fragment length polymorphism

RLR = retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-1) -like receptors

RLU = relativna svjetlosna jedinica (engl. *relative luciferase/light unit*)

RNA = ribonucleic acid

RNS = reactive nitrogen species

ROS = reactive oxygen species

ROS1 = c-ros oncogene 1

RT-PCR = reverse transcription- polymerase chain reaction

SCLC = small cell lung cancer

SDS = sodium dodecyl sulphate (natrijev dodecil sulfat)

SDS-PAGE = sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (metoda elektroforeze kojom se razdvajaju proteini po masi)

SNP = single nucleotide polymorphism

SNV = single nucleotide variant

ssDNA = single-stranded deoxyribonucleic acid

SSR = simple sequence repeat

ssRNA = single-stranded ribonucleic acid

Tc = T cytotoxic

Teff = effector T cell

Tfh = follicular helper T cell

TGF- $\beta$  = transforming growth factor beta

Th = T helper

TIR = Toll/interleukin-1 receptor

TLR = Toll-like receptor

TLR5-WT = TLR5-wild type

TNF- $\alpha$  = tumour necrosis factor alpha

TNM = tumor, nodes, metastases

TP53 = tumor protein P53

TRAF6 = tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 6

TRAIL = TNF-related apoptosis-inducing ligand

Treg = regulatory T cell

TRIF = TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$

tRNA = transfer ribonucleic acid

VNTR = variable number of tandem repeats

VUS = variant of unknown significance

### 8.1.2. Hrvatske kratice upotrijebljene u tekstu

DMSO = dimetil sulfoksid

IC = imunocitokemija

IHC = imunohistokemija

IPF = idiopatska plućna fibroza

KOPB = kronična opstruktivna plućna bolest

LPS = lipopolisaharidi

MTT = metil tiazolil tetrazolijeva sol

SZO = Svjetska zdravstvena organizacija

## 8.2. PRILOG 2

### 8.2.1. Mjerne jedinice

°C = stupanj Celzija (mjerna jedinica temperature)

µg = mikrogram

µL = mikrolitar

g = gram

kDa = kilodalton

min = minuta

mL = mililitar

mM = milimol po litri

ng = nanogram

nm = nanometar

pH (engl. *potential of hydrogen*) = mjera kiselosti vodene otopine

rpm (engl. *revolutions per minute*) = broj okretaja u minuti

V = volt

x g = vrijeme gravitacije (jedinica relativne centrifugalne sile)

### **8.3. PRILOG 3**

#### **8.3.1. Kemijske formule**

$\text{CaCl}_2$  = kalcijev klorid

$\text{CO}_2$  = ogljični dioksid

$\text{HCl}$  = klorovodična kiselina

$\text{KCl}$  = kalijev klorid

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  = kalijev dihidrogenfosfat

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  = natrijev hidrogenfosfat

$\text{NaCl}$  = natrijev klorid

$\text{NAD(P)H}$  = nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

## **8.4. PRILOG 4**

### **8.4.1. Priznanje vlasnicima za dozvolu uporabe slika koje podliježu autorskim pravima**

U ovoj doktorskoj disertaciji korištene su slike iz časopisa s otvorenim pristupom (engl. *open access*) ili uz dozvolu vlasnika autorskih prava, što je navedeno u nastavku.

**Slika 1.** "Reprinted and translated with permission of the publisher from: World Health Organization (WHO). The top 10 causes of death [Internet]. Geneva (Switzerland): World Health Organization; c2018. Available on: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Accessed: 8.11.2020."

**Slika 2.** "Reprinted and translated from: Clinics in Chest Medicine, 32(4), Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA, Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention, 605-644, Copyright (2011), with permission from Elsevier."

**Slika 4.** "The figure is in the public domain and may be reproduced or copied without permission with adding the following disclaimer for translations: The U.S. National Cancer Institute does not currently endorse any foreign-language translations of NCI information by other organizations or individuals, and no such endorsement should be inferred."

**Slika 5.** "Reprinted and adapted by permission from the American Association for Cancer Research: Mellman I, Dendritic cells: master regulators of the immune response, Cancer immunology research, 2013,1(3),145-149, doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0102."

**Slika 7.** "Used with permission of John Wiley & Sons - Books, from The Journal of leukocyte biology, Lung dendritic cells at the innate-adaptive immune interface, Condon TV, Sawyer RT, Fenton MJ, Riches DWH, 90(5), 2011; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc."

**Slika 8.** "Reprinted and translated by permission from The Springer Nature, Nature Reviews Cancer, 4(1), Dranoff G, Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy, 11-22, Copyright (2004)."

**Slika 9.** "Reprinted from The Lancet, 357(9270), Parkin J, Cohen B, An overview of the immune system, 1777-1789, Copyright (2001), with permission from Elsevier." -

**Slika 11.** "Republished with permission of American Society for Clinical Investigation, from The journal of clinical investigation, A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer, Lin WW, Karin M, 117(5), 2007; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc. "

**Slika 12.** "Used with permission of John Wiley & Sons - Books, from The International journal of cancer, Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms, Knaapen AM, Borm PJA, Albrecht C, Schins RPF, 109(6), 2004; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc."

**Slika 16.** "Reprinted and translated by permission from The Springer Nature, Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 140, Zhou H, Chen JH, Hu J, et al, High expression of Toll-like receptor 5 correlates with better prognosis in non-small-cell lung cancer: An anti-tumor effect of TLR5 signaling in non-small cell lung cancer, 633–643, Copyright (2014)."

**Slika 19.** "Reprinted from Applications of Nanoscience in Photomedicine, Ding W, Bergeron E, Lachaine R, Meunier M, Nanomaterial-assisted light-induced poration and transfection of mammalian cells, 331-376, Copyright (2015), with permission from Elsevier."

**Slika 20.** "Copyright LI-COR, Inc. Used by permission."



### **9. ŽIVOTOPIS AUTORA**

Gordana Drpa rođena je 16.12.1966. u Zagrebu, gdje je završila osnovnu i srednju školu te Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Obvezni staž odradila je za Dom zdravlja Peščenica, nakon čega je položila državni ispit. Nakon položenog državnog ispita radila je u ordinacijama obiteljske medicine u Hrvatskom zagorju.

Specijalizaciju iz interne medicine započela je 1999. godine u Klinici za plućne bolesti Jordanovac u Zagrebu. U istoj ustanovi radi i danas, s tim da je Klinika za plućne bolesti u međuvremenu postala dio Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Nakon završenog specijalističkog staža i položenog specijalističkog ispita nastavila je raditi kao odjelni liječnik. U međuvremenu je odradila užu specijalizaciju iz pulmologije i stekla zvanje specijalista interne medicine s užom specijalizacijom iz pulmologije. Paralelno je stjecala vještine i znanja nužna za obavljanje posla odjelnog liječnika kao što su bronhoskopija, biopsija pleure, ultrazvuk u hitnim stanjima, ultrazvučna dijagnostika pleure i funkcionalna dijagnostika pluća. Zadnjih dvadeset godina uža su joj područja interesa torakalna onkologija, rijetke bolesti pluća i manifestacije lijekova na plućima. Objavila je više stručnih i znanstvenih radova te je temeljem iskustva i objavljenih radova stekla naziv primarijus.

Poslijediplomski doktorski studij upisala je 2015. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a 2017. godine obranila je temu doktorskog rada.

Udana je i majka troje djece.