

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Gabriela Kirinec

Protutumorski učinak kombinirane primjene
dvolančane RNA i kemoterapeutika

Diplomski rad

Zagreb, 2010. godina

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za molekularnu onkologiju, Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom prof. dr. sc. Jasminke Pavelić i dr. sc. Tanje Matijević, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. molekularne biologije.

Zahvaljujem svima koji su svojim savjetima, strpljenjem i podrškom pridonijeli izradi ovoga diplomskog rada, posebice mentorima prof. dr. sc. Jasminki Pavelić i dr. sc. Tanji Matijević.

Veliko hvala Marku na beskrajnom strpljenju i potpori.

Ovaj diplomski rad posvećujem svojim roditeljima i bratu, kojima se od srca zahvaljujem za svu pruženu pomoć, podršku i razumijevanje tijekom mog studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

PROTUTUMORSKI UČINAK KOMBINIRANE PRIMJENE DVOLANČANE RNA I KEMOTERAPEUTIKA

Gabriela Kirinec

Rooseveltov trg 6

Toll-like receptor 3, uz ostale receptore "Toll-like" (TLR, od engl. *Toll-like receptors*), ima ključnu ulogu u urođenoj imunosti. Nedavna istraživanja pokazala su da se TLR3, kao i ostali srodni receptori, nalazi izražen i u stanicama određenih vrsta tumora, te da njegova aktivacija potiče apoptozu stanica tumora i inhibira njihovu proliferaciju. Također je otkriveno da aktivacija TLR3 u kombinaciji s protutumorskim terapeutima povećava citotoksični učinak agonista TLR3 na stanice tumora. To dovodi do zaključka da se agonisti TLR3 mogu koristiti kao protutumorski agensi zbog svojeg citostatskog i citotoksičnog djelovanja na stanice tumora. U ovom istraživanju ispitati smo djelovanje liganda TLR3, poliriboinozilne:poliribocitidilne kiseline (poly(I:C)), u kombinaciji s kemoterapeutima 5-fluorouracilom i metotreksatom, na stanice primarnog i metastatskog tumora ždrijela. Svrha ovog rada jest ispitati mogućnost kombinirane primjene poly(I:C) i kemoterapeutika kao protutumorske terapije. Prema dobivenim rezultatima ustanovili smo da kombinirana primjena poly(I:C) i kemoterapeutika ima značajno veći inhibitorni učinak na stanice nego zasebni tretman s poly(I:C), tj. da poly(I:C) i kemoterapeutici 5-fluorouracil i metotreksat djeluju sinergistički. Također smo utvrdili da je inhibitorni učinak kombiniranog tretmana s poly(I:C) i kemoterapeutima posljedica poly(I:C)-aktivirane apoptoze ovisne o TLR3-signalnom putu.

(34 stranice, 13 slika, 7 tablica, 39 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: Toll-like receptor 3, poly(I:C), apoptoza, stanice tumora, protutumorsko djelovanje

Voditelj: Prof. dr. sc. Jasminka Pavelić

Ocjenitelji: Prof. dr. sc. Jasminka Pavelić, dr. sc. Maja Matulić, doc., dr.sc. Mirta Tkalec, doc.,
dr. sc. Domagoj Đikić, doc.

Rad prihvaćen: 01.12.2010.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

ANTITUMOR ACTIVITY OF COMBINED APPLICATION OF DOUBLE STRANDED RNA AND CHEMOTHERAPEUTICS

Gabriela Kirinec

Rooseveltovo trg 6

Toll-like receptor 3, as well as other TLRs, plays a key role in innate immunity. Recent studies have shown that TLR3 is expressed on certain types of tumor cells and that its activation stimulates apoptosis of tumor cells and inhibits their proliferation. Also it has been found that activation of TLR3 in combination with antitumor therapeutics increases the cytotoxic effect of TLR3 agonist on tumor cells. This leads to the conclusion that the TLR3 agonists can be used as antitumor agents because of their cytostatic and cytotoxic effects on tumor cells. In this study, we investigated the effect of TLR3 ligand, polyinosinic:polycytidylic acid (poly(I:C)), in combination with chemotherapeutics 5-fluorouracil and methotrexate on primary and metastatic pharyngeal carcinoma cell lines. The purpose of this study was to examine the possibility of combined application of poly(I:C) and chemotherapeutics as an antitumor therapy. We have found that combined application of poly(I:C) and chemotherapeutics has a significantly greater inhibitory effect on cell growth than the separate treatment with poly(I:C), i.e. poly(I:C) and chemotherapeutics act synergistically. We also found that the inhibitory effect of combined treatment with poly(I:C) and chemotherapeutics is a result of TLR3-dependent apoptosis.

(34 pages, 13 figures, 7 tables, 39 references, original in: croatian)

Thesis deposited in the Central biological library

Key words: Toll-like receptor 3, poly(I:C), apoptosis, tumor cells, antitumor activity

Supervisor: Prof. Dr. Jasminka Pavelić

Reviewers: Prof. Dr. Jasminka Pavelić, Dr. Maja Matulić, Asst. Prof., Dr. Mirta Tkalec, Asst.
Prof., Dr. Domagoj Đikić, Asst. Prof.

Thesis accepted: 01.12.2010.

SADRŽAJ

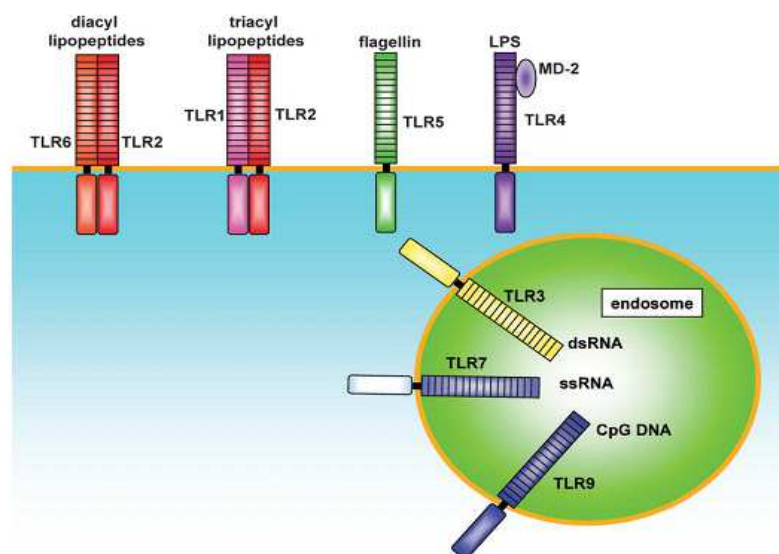
1. UVOD	1
1.1. Toll-like receptori.....	1
1.1.1. Građa i signalni put Toll-like receptora	2
1.1.2. Funkcije toll-like receptora	4
1.2. Toll-like receptor 3.....	5
1.2.1. Struktura TLR3	5
1.2.2. Smještaj TLR3.....	6
1.2.3. Ligandi	6
1.2.4. Signalni put	7
1.3. Toll-like receptori i tumori	9
1.3.1. Izražaj TLR-a na stanicama tumora	9
1.3.2. Izražaj TLR3 na stanicama tumora	11
2. SVRHA I CILJ ISTRAŽIVANJA.....	12
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. Linije stanica	13
3.2. Nasađivanje stanica	13
3.3. Test citotoksičnosti.....	14
3.4. Mjerenje apoptotskih stanica protočnim citometrom.....	16
3.5. Statistika	18
4. REZULTATI.....	19
4.1. Titracijske krivulje	19
4.2. Učinak kombinirane primjene poly(I:C) i 5-fluorouracila na stanice FaDu i Detroit... 21	
4.3. Učinak kombinirane primjene poly(I:C) i metotreksata na stanice FaDu i Detroit	23
4.4. Mjerenje apoptotskih stanica protočnim citometrom.....	25
5. RASPRAVA.....	27
6. ZAKLJUČCI	31
7. LITERATURA.....	32

1. UVOD

1.1. Toll-like receptori

Toll-like receptori (TLR) pripadaju porodici receptorskih proteina PRR (od engl. *Pattern Recognition Receptors*) koji prepoznaju patogenima pridružene molekularne sljedove tzv. PAMP (od engl. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Unutar te porodice, Toll-like receptori su najvažnija skupina receptora koja prepoznaje i specifično veže brojne ligande koji potječu od patogena te na taj način imaju ključnu ulogu u urođenoj imunosti (1).

Toll-like receptori dobili su ime po proteinu Toll, prvotno otkrivenom u vinskoj mušici (*Drosophila melanogaster*), koji tijekom embriogeneze sudjeluje u razvoju dorzalno-ventralne osi. Kasnije je također otkriveno da protein Toll u odraslih vinskih mušica ima važnu ulogu u obrani od gljivičnih infekcija. Prvi identificirani homolog Toll receptora u sisavaca bio je TLR4. U sisavaca je do sada pronađeno 11 različitih Toll-like receptora, redom nazvanih TLR1 do TLR11. Ovi receptori su uglavnom ograničeni na stanice imunološkog sustava, epitela i endotela. Međusobno se razlikuju po smještaju u stanici, načinu prijenosa signala te po specifičnosti prema ligandu (1, 2). Toll-like receptori 3, 7, 8 i 9 nalaze se na membrani endosoma te prepoznaju unutarstanične ligande, najčešće nukleinske kiseline. Ostali TLR-i nalaze se na površini stanica te prepoznaju vanstanične produkte patogena (slika 1).



Slika 1. Toll-like receptori i njihovi ligandi (preuzeto iz 2)

TLR2 je važan u prepoznavanju lipopeptida patogena te u suradnji s TLR1 i TLR6 ima ulogu u prepoznavanju malih razlika između diacil i triacil lipopeptida patogena. TLR2 također prepoznaje peptidoglikane Gram-pozitivnih bakterija, lipotehoičnu kiselinu (LTA, od engl. *lipoteichoic acid*), lipoarabinomanan i zimosan. TLR4 je receptor za lipopolisaharide (LPS) Gram-negativnih bakterija. Nemetilirane CpG motive karakteristične za bakterijsku DNA, tzv. CpG DNA, prepoznaje TLR9. TLR3 prepoznaje dvolančanu viralnu RNA, dok TLR7 i TLR8 prepoznaju jednolančanu viralnu RNA. TLR5 prepoznaje flagelin (2).

1.1.1. Građa i signalni put Toll-like receptora

Receptori TLR pripadaju membranskim glikoproteinima tipa I, te na osnovu homologije njihovih citoplazmatskih domena, zajedno s receptorima za interleukin-1, pripadaju superporodici interleukin-1 receptor/Toll-like receptor. Unatoč zajedničkoj domeni TIR (od engl. *Toll/IL-1 receptor*), između vanstaničnih domena ove dvije porodice receptora nema sličnosti. Receptor za IL-1 posjeduje domenu nalik imunoglobulinu, dok TLR posjeduje domenu sa leucinom bogatim ponavljajućim slijedom (LRR, od engl. *leucine-rich repeats*) (3) (slika 2a).

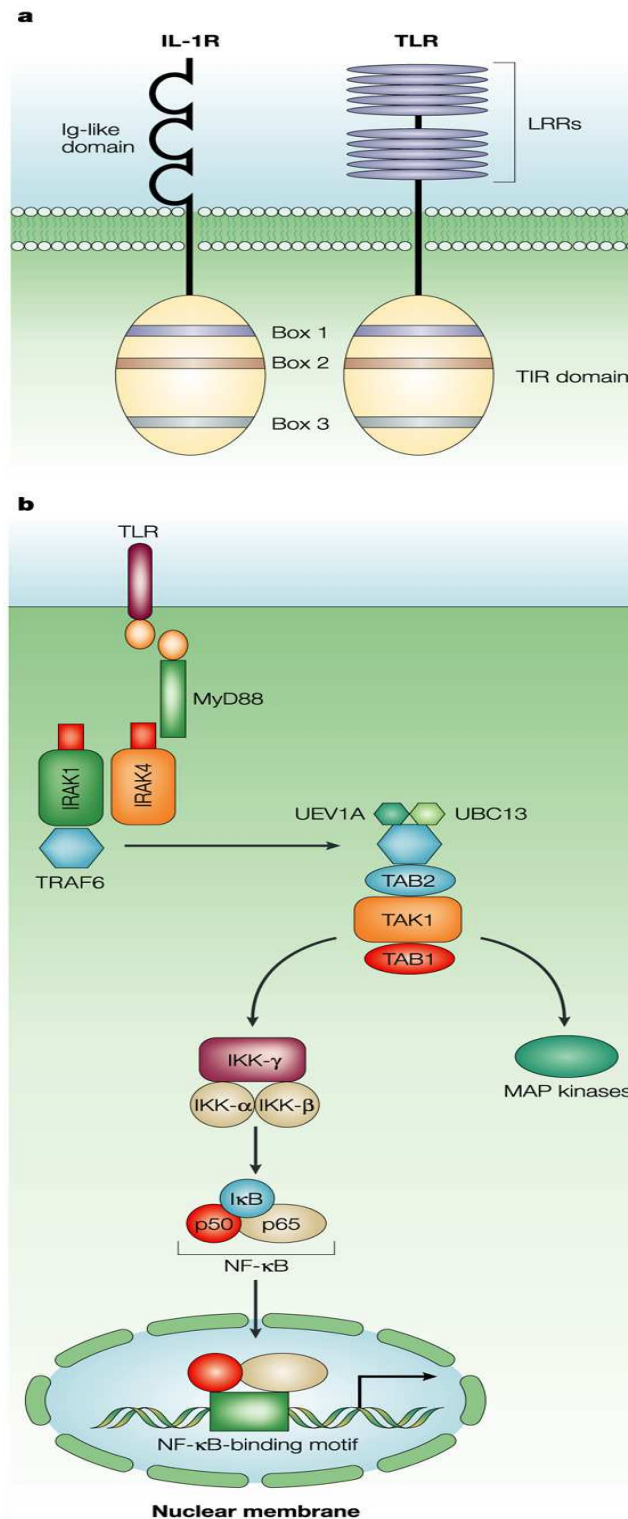
Toll/IL-1 domena je konzervirana regija od približno 200 aminokiselinskih ostataka koji tvore 5 β -paralelnih ploča i 5 α -zavojnica međusobno povezanih okretima. Unutar TIR domene najznačajnije su 3 konzervirane homologne regije: Box1, Box2 i Box3. Navedene regije imaju ključnu ulogu u signalnom putu.

Ponavljajući slijedovi bogati leucinom, LRR, karakteristika su vanstanične domene TLR-a. LRR-i se sastoje od 24 do 29 aminokiselinskih ostataka koji se dijele na regije bogate leucinom i konzervirane regije bogate hidrofobnim ostacima. Vanstanična domena TLR-a sadrži od 19 do 24 kopija motiva LRR.

Za aktivaciju signalnog puta odgovorna je citoplazmatska domena TIR. Nakon prepoznavanja i vezanja nekog produkta patogena (PAMP), pokreće se kaskadna reakcija putem adaptorskih molekula koje sadrže domenu TIR. Adaptorske molekule su MyD88 (od engl. *Myeloid differentiation factor 88*), Mal (od engl. *MyD88 adapter-like*) ili TIRAP (od engl. *TIR domain-containing adapter protein*), TRIF (od engl. *TIR domain-containing adapter inducing interferon- β*) i TRAM (od engl. *TRIF-related adapter molecule*).

Posljedica pokretanja ovog signalnog puta je aktivacija transkripcijskih čimbenika NF- κ B (od engl. *nuclear factor- κ B*) i AP-1 (od engl. *activating protein-1*) odnosno IRF3 (od

eng. *interferon regulatory factor 3*). Ovi transkripcijski čimbenici potiču transkripciju gena koji kodiraju za proteine koji sudjeluju u imunološkom odgovoru: upalni citokini, kemokini, adhezijske molekule, kostimulatorne molekule, antiviralni citokini i dr. (3-6) (slika 2b).



Nature Reviews | Immunology

Slika 2. Struktura i signalni put TLR-a (preuzeto iz 3)

1.1.2. Funkcije Toll-like receptora

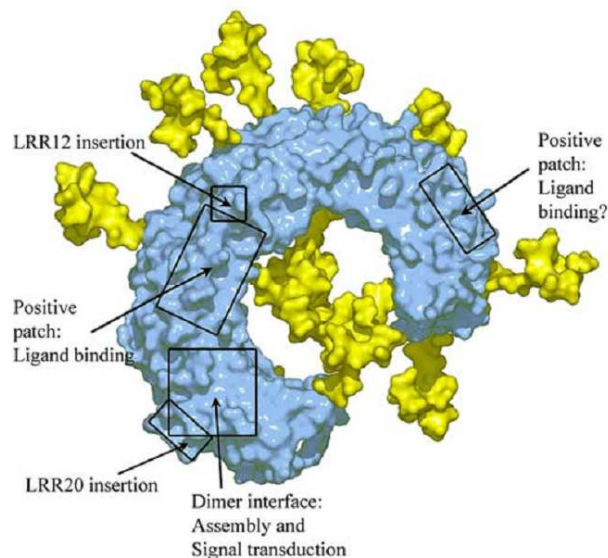
Mehanizam djelovanja TLR-a odvija se u tri međusobno povezana događaja. To su: prepoznavanje prisutnosti i vrste patogena, aktivacija urođene imunosti te stimulacija pokretanja stečene imunosti s efektorskim funkcijama specifičnim za taj određeni patogen. Prepoznavanje patogena većinom se odvija putem dendritičkih stanica i makrofaga koji cirkuliraju krvlju i limfom, a nalaze se i na površini kože i sluznica. Brz i snažan odgovor urođene imunosti na prisutnost patogena očituje se aktivacijom brojnih stanica imunološkog sustava. Takav buran odgovor obično nanese neznatnu štetu i vlastitom tkivu, no ukoliko je reakcija preintenzivna ili produženog trajanja to može rezultirati kroničnim upalnim bolestima (7). Također, poremećena aktivacija TLR-a može dovesti do razvoja mnogih autoimunih i kroničnih upalnih bolesti. Neke od tih bolesti su Alzheimerova bolest, multipla skleroza, astma, tuberkuloza, Crohn-ova bolest, psorijaza i dr. TLR-i također sudjeluju u povezivanju urođene i stečene imunosti. Poveznica između urođene i stečene imunosti jest proces sazrijevanja dendritičkih stanica, koji je posljedica aktivacije TLR-a. Zrele dendritičke stanice nužne su za aktivaciju limfocita T (7, 8).

1.2. Toll-like receptor 3

1.2.1. Struktura TLR3

Gen za Toll-like receptor 3 u ljudi nalazi se na dužem kraku četvrtog kromosoma na poziciji 35 (4q35). Sastoji se od 5 eksona i sadrži 15 942 pb (9). Produkt ovog gena, protein TLR3, građen je od 904 aminokiseline; prve 23 aminokiseline čine signalni peptid. Protein TLR3 dijeli sve strukturne karakteristike s ostalim TLR-ima, dakle posjeduje vanstaničnu, transmembransku i unutarstaničnu domenu (10).

Vanstanična domena je solenoid oblika potkove, unutar koje se nalaze 23 regije LRR. Ponavljajući slijed od 24 lizina posjeduje 17 od 23 LRR-a. Značajna karakteristika vanstanične domene jest njena N-glikozilirana površina. Usprkos tome, na vanstaničnoj domeni postoji jedna neglikozilirana površina koja sadrži i značajnu količinu pozitivnog naboja što pretpostavlja mogućnost da se tu nalazi vezno mjesto za ligand (11). Smatra se da su regije LRR12 i LRR20 odgovorne za vezanje liganda. Daljnja istraživanja rezultirala su modelom koji pretpostavlja vezno mjesto za ligand na neglikoziliranoj površini na LRR20 (12) (slika 3).



Slika 3. Vanstanična domena TLR3 (preuzeto iz 11)

Transmembranska domena sastavljena od 21 aminokiseline ključna je za smještaj receptora unutar stanice, dok unutarstanična domena sadrži domenu TIR koja ima glavnu ulogu u prijenosu signala (13).

1.2.2. Smještaj TLR3

TLR3 se nalazi na membrani endosoma. Takav smještaj dodatno ukazuje na njegovu ulogu - prepoznavanje dvolančane viralne RNA. Protein TLR3 je izražen u mnoštvu tkiva i stanica, a razina izražaja, kontrola transkripcije i smještaj proteina u stanici je tkivno- i stanično-specifična. U imunološkom sustavu, TLR3 je izražen u mijeloidnim dendritičkim stanicama, NK-stanicama, mastocitima, makrofazima te limfocitima T tipa CD8+. Nasuprot tome, monocitni makrofazi pokazuju prilično nisku razinu izražaja, dok monociti i monocitne linije stanica nemaju izražen TLR3. Epitelne stanice dišnog, probavnog, spolno-mokraćnog sustava te fibroblasti također imaju izražen TLR3, u ovom slučaju i u unutrašnjosti i na površini stanice (14). U tkivu mozga visoka je razina izražaja TLR3 u neuronima i glija stanicama. Astrociti imaju TLR3 izražen unutar i na membrani stanica, a glioblastocitne linije stanica imaju izražen TLR3 unutar stanice. Izražaj TLR3 u tkivu mozga ukazuje na njegovu specifičnu ulogu u obrani od virusa encefalitisa (15).

Strukturni motivi koji određuju smještaj proteina TLR3 unutar stanice, nalaze se u citoplazmatskoj regiji (730- 755 ak) koja se nalazi između transmembranske i domene TIR. Delecija te regije uzrokuje nepravilan smještaj unutar stanice. TLR3 mRNA pronađena je u tkivu posteljice, gušterače, pluća, jetre, srca, limfnih čvorova i mozga (13, 14).

1.2.3. Ligandi

Osnovni ligand Toll-like receptora 3 jest vanstanična dvolančana RNA (dRNA). Budući da je dRNA dio genoma dRNA virusa i/ili jedan od produkata replikacije jRNA virusa, TLR3 se smatra glavnim Toll-like receptorom u obrani od virusnih infekcija. Mehanizam kojim se dRNA transportira u unutarstanične odjeljke gdje dolazi u kontakt sa TLR3 još uvijek nije poznat. Smatra se da viralna RNA ulazi u stanicu putem endosoma ili putem apoptotskih tijela koja potječu od stanica zaraženih virusom (16). Daljnja istraživanja otkrila su i prvi endogeni ligand TLR3; mRNA, koja usprkos jednolančane strukture može aktivirati dendritičke stanice putem receptora TLR3. Stanične endogene RNA sadrže dvolančane sekundarne strukture (ukosnice), stoga mogu poslužiti kao endogeni ligandi za TLR3 (17). Također se smatra da bi potencijalni endogeni ligandi mogli biti microRNA (miRNA) te proteini koji u svojoj strukturi sadrže dRNA kao što je PKR (od engl. *dsRNA dependent protein kinase*), ADAR (od engl. *dsRNA adenosine deaminase*) te protein koji je

posrednik u utišavanju RNA (DICER) (10). Sintetske dRNA su također ligandi TLR3. U pokusima se najčešće koristi poliriboinozilna:poliribocitidilna kiselina (poly[I:C]) (16).

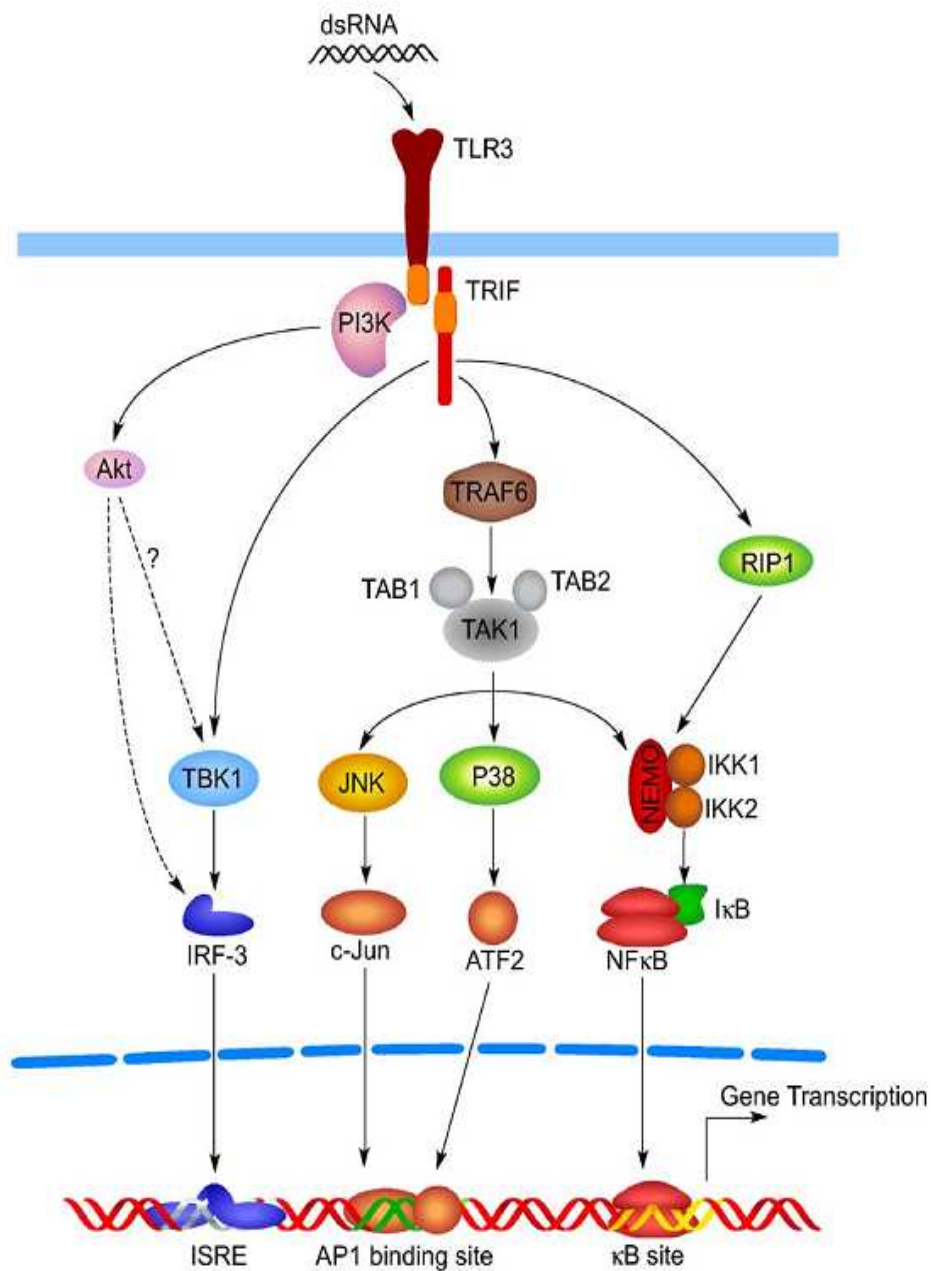
1.2.4. Signalni put

TLR3 je jedini TLR koji ne koristi adaptorsku molekulu MyD88, već adaptorski protein TICAM-1 tj. TRIF te se signal prenosi putem ovisnim o TRIF-u, a neovisnom o MyD88. TRIF uzrokuje aktivaciju transkripcijskih čimbenika IRF-3, NF- κ B i AP-1, koji potiču stvaranje interferona tipa I (IFN), citokina, kemokina te sazrijevanje dendritičkih stanica. Za signalizaciju putem TLR3 nužna je i fosforilacija njegove domene TIR koju provodi enzim fosfatidil-inositol kinaza PI3-K (18) (slika 4).

TRIF strukturno možemo podijeliti na N-terminalnu regiju bogatu prolinom, domenu TIR te C-terminalnu regiju bogatu prolinom. N-terminalna regija je ključna za aktivaciju transkripcijskog čimbenika IRF-3, dok C-terminalna regija sudjeluje u aktivaciji transkripcijskog čimbenika NF- κ B i apoptoze. Domena TIR adaptera TRIF međudjeluje s domenom TIR receptora TLR3 (19). Vezanje tih dviju domena TIR aktivira serin-treonin kinaze TBK-1 (od engl. *TANK-binding kinase 1*) i IKK- ϵ (od engl. *I κ B kinase*) koje, pomoću adaptorskih proteina NAP1 (od engl. *NF- κ B-activating kinase-associated protein 1*) i TRAF3 (od engl. *tumor necrosis factor receptor-associated factor*), fosforiliraju te na taj način aktiviraju transkripcijski čimbenik IRF-3. IRF-3 potom dimerizira te se premješta u jezgru gdje potiče transkripciju gena za interferon β (IFN- β).

Za aktivaciju transkripcijskog čimbenika NF- κ B odgovorni su RIP-1 (od engl. *receptor-interacting protein 1*) te TRAF6. RIP-1 se smatra ključnim aktivatorom transkripcijskog čimbenika NF- κ B putem TRIF-ovisnog puta. RIP-1 i TRIF stupaju u interakciju pomoću motiva RHIM (od engl. *RIP homotypic interaction motif*) kojeg posjeduju oba proteina. Smatra se da nakon vezanja za TRIF u suradnji sa TRAF6, dolazi do poliubikvitinacije RIP-1. Ubikvitinirani RIP-1 potom stvara kompleks s TAB2 (od engl. *TAK-binding protein 2*) i TAK1 (od engl. *TGF-beta-activated kinase 1*). TAK1 potom fosforilira IKK α i IKK β koji zatim fosforiliraju I κ B, inhibitor NF- κ B. Neposredno nakon toga inhibitor I κ B se razgrađuje, dok se transkripcijski čimbenik NF- κ B premješta u jezgru. TAK1 također sudjeluje u aktivaciji MAP kinaza (od engl. *mitogen-activated protein kinase*), JNK (od engl. *jun N-terminal kinase*), ERK (od engl. *extracellular-signal-regulated kinases*) i p38, što dovodi do aktivacije transkripcijskih čimbenika, članova porodice AP-1.

Također je otkriveno da RIP-1 i RHIM motiv TRIF-a igraju ključnu ulogu u apoptozi induciranoj TRIF-om, neovisnoj o NF- κ B. Aktivacija TLR3 inducira apoptozu putem TRIF/RIP-1/FADD (od engl. *Fas-associated death domain protein*) /kaspaza-8 ovisnog puta (5, 15, 18, 20). Nakon aktivacije signalnog puta putem TLR3, prvenstveno dolazi do stvaranja interferona β , interleukina 12 i 6, te TNF- α (od engl. *tumor necrosis factor α*) (21).



Slika 4. TRIF-ovisni signalni put (preuzeto iz 10)

1.3. Toll-like receptori i tumori

1.3.1. Izražaj TLR-a na stanicama tumora

Nedavna su istraživanja pokazala da stanice nekih vrsta tumora izražavaju receptore TLR (tablica 1). U većini slučajeva to stanicama tumora omogućuje da usmjere djelovanje imunološkog sustava u svoju korist (22-24). Tako je na stanicama tumora pluća izražen TLR4, koji svojom aktivacijom potiče sintezu imunosupresivnih citokina i može stanice tumora učiniti rezistentnima na apoptozu, čime izbjegavaju reakciju imunološkog sustava (25). Slične posljedice aktivacije TLR4 opisane su i za stanice karcinoma jajnika te tumora glave i vrata (26, 27).

Tablica 1. Izražaj TLR-a na stanicama tumora

Vrsta tumora	TLR
Tumor želuca	TLR2, TLR4, TLR5, TLR9
Tumor debelog crijeva	TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR9
Tumor jajnika	TLR2, TLR3, TLR4, TLR5
Tumor grlića maternice	TLR3, TLR4, TLR5, TLR9
Tumor pluća	TLR2, TLR3, TLR4, TLR9
Tumor prostate	TLR4, TLR9
Melanom	TLR2, TLR3, TLR4
Tumor mozga	TLR2, TLR4
Tumor dojke	TLR2, TLR3, TLR4, TLR9
Karcinom jetre	TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, TLR9
Tumor ždrijela	TLR2, TLR3, TLR4

Također, mikrookoliš tumora sadrži velike količine endogenih liganada TLR-a (DAMP, od engl. *damage-associated molecular patterns*) koji potječu od oštećenog tkiva normalnog epitela i nekrotičnih stanica tumora. Takva neprestana aktivacija TLR-a dovodi do kronične upale koja dodatno pogoduje razvoju i širenju tumora. Poznato je da kronične upale, koje su posljedica autoimunih bolesti ili infekcija uzrokovanih patogenom, mogu biti uzrok razvoja više od 15% svih vrsta tumora. Neki od njih su tumor jetre (hepatitis B i C), tumor

grlića maternice (HPV, od engl. *human papilloma virus*), tumor želuca i crijeva (*Helicobacter pylori*), tumor debelog crijeva (IBD, od engl. *inflammatory bowel disease*) i dr. (24).

Usprkos tome, otkriveno je da aktivacija TLR-a na nekim stanicama tumora, kao što su TLR3 na stanicama tumora dojke i TLR9 na stanicama glioma, potiče apoptozu stanica tumora (28, 29) (tablica 2).

Tablica 2. Izražaj TLR-a na stanicama tumora i njihova funkcija (24)

TLR	Vrsta tumora	Funkcija TLR-a
TLR2, TLR9	Tumor želuca	Progresija tumora
TLR4	Tumor dojke	Progresija tumora
TLR9	Gliom	Apoptoza stanica tumora
TLR7, TLR9	Kronična limfocitna leukemija (CLL)	Smrt stanica CLL
TLR5	Stanična linija tumora mliječne žlijezde miša, D2F2	Promocija rasta tumora u ranom stadiju te inhibicija rasta tumora u kasnom stadiju
TLR3	Tumor dojke	Apoptoza stanica tumora
TLR2, TLR3, TLR4	Tumor ždrijela	Nepoznata

Točna uloga i funkcija TLR-a na stanicama tumora tek se treba istražiti, no dosadašnji rezultati pokazuju veliku mogućnost upotrebe liganada TLR-a kao potencijalnih adjuvansa u liječenju tumora i ostalih bolesti vezanih uz TLR-e. Dakle, potrebno je utvrditi točnu ulogu TLR-a na stanicama tumora, detaljno istražiti njihove signalne puteve te otkriti biokemiju interakcija između receptora i pripadajućeg mu liganda, da bi povećali potencijal upotrebe TLR-a u terapijske svrhe (8).

1.3.2. Izražaj TLR3 na stanicama tumora

TLR3 je izražen na brojnim stanicama tumora. Dosadašnja istraživanja su pokazala da njegova aktivacija potiče apoptozu u stanicama tumora i blokira njihovu proliferaciju. Salaun i suradnici su pokazali da aktivacija TLR3 izraženih u stanicama tumora dojke izravno potiče apoptozu TRIF-ovisnim signalnim putem (29). Isto su pokazali i Paone i suradnici za stanice tumora prostate. No, u ovom slučaju signali se prenose PCK-om (od engl. *protein kinase C*) koja potom aktivira JNK i p38 te dovodi do apoptoze ovisne o kaspazi 8. Dakle, ovo je prvi zabilježeni slučaj alternativnog signalnog puta koji uključuje protein kinazu C kao ključni čimbenik u apoptozu aktiviranoj poly(I:C)-om (30). Matijević i suradnici su pokazali da se funkcionalan TLR3 nalazi u stanicama tumora metastaza karcinoma ždrijela, te aktivacijom uzrokuje apoptozu stanica tumora, dok je u primarnom karcinomu ždrijela TLR3 izražen, ali nije funkcionalan (31). Ovo istraživanje nameće zanimljivo pitanje o razlici između stanica primarnog tumora i metastaza na razini izražaja TLR3 i njegovog signalnog puta.

Salaun i suradnici su također utvrdili da je TLR3 izražen na stanicama melanoma (32). Nakon aktivacije ligandom poly(I:C) u kombinaciji sa cikloheksimidom ili $INF\alpha$, potiče se apoptoza te inhibira proliferacija stanica tumora (32, 33). Istraživanja provedena od strane Taura i suradnika pokazala su da protutumorski terapeutici, kao što su aktivatori tumorsupresorskog gena *p53* te interferoni, imaju pozitivan učinak na razinu ekspresije TLR3 te na taj način povećavaju uništavanje stanica tumora inducirano ligandom poly(I:C) (34).

Iako su mnoga pitanja još otvorena te se mnogo činjenica tek treba detaljno istražiti, dosadašnji rezultati pokazuju da se agonisti Toll-like receptora 3 mogu koristiti ne samo kao adjuvansi pri protutumorskoj imunizaciji zahvaljujući svojim imunostimulatornim osobinama (35), već i kao citotoksični agensi u borbi protiv određenih vrsta tumora zbog svojih citostatskih i citotoksičnih djelovanja na stanice tumora (30-34).

2. SVRHA I CILJ ISTRAŽIVANJA

Toll-like receptor 3, kao i ostali receptori TLR, izražen je u stanicama određenih vrsta tumora. Dok se većina dosad istraženih TLR-a na stanicama tumora povezuje s mogućnošću preusmjerenja imunološkog odgovora u korist tumora, rezultati većine dosadašnjih istraživanja pokazuju da TLR3 ima suprotno djelovanje. Aktivacija TLR3 na stanicama tumora potiče apoptozu stanica tumora i inhibira njihovu proliferaciju. Nedavno je otkriveno da se učinak aktivacije TLR3 pojačava kombiniranom primjenom poly(I:C) (liganda TLR3) s određenim protutumorskim kemoterapeutcima. U ovom istraživanju ispitali smo učinak kombinirane primjene poly(I:C) i kemoterapeutika, 5-fluorouracila i metotreksata, na stanice primarnog (linija stanica FaDu) i metastatskog tumora ždrijela (linija stanica Detroit 562).

Osnovni ciljevi ovog istraživanja:

1. utvrditi vrijednosti letalne koncentracije LC_{50} za kemoterapeutike 5-fluorouracil i metotreksat,
2. ispitati učinak kombinirane primjene poly(I:C) i 5-fluorouracila, odnosno metotreksata,
3. provjeriti je li učinak kombinirane primjene poly(I:C) i kemoterapeutika posljedica poly(I:C)-aktivirane apoptoze ovisne o signalnom putu TLR3.

Svrha ovog rada jest utvrditi da li kombinirana primjena poly(I:C) i kemoterapeutika može poslužiti kao protutumorsko liječenje, koje bi rezultiralo blažim i manje štetnim nuspojavama po organizam.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Linije stanica

Istraživanja su provedena na linijama stanica čovjeka FaDu (primarni karcinom ždrijela) i Detroit 562 (metastaza karcinoma ždrijela). Linija stanica Detroit 562 dobivena je iz baze linija stanica ATCC, dok je linija stanica FaDu bila dar dr. Gabrielle Mincione, Sveučilište „G. D'Annunzio of Chieti-Pescara“, Italija. Stanice su uzgajane u plastičnim bocama za stanične kulture volumena 250 mL u hranjivoj tekućoj podlozi DMEM (od engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*; Gibco, SAD) obogaćenom s 10% seruma fetusa teleta, FCS-a (od engl. *fetal calf serum*; Gibco, SAD). U tekuću podlogu dodan je i 2 mM L-glutamin (Sigma Aldrich, Njemačka) te 100 U/mL penicilina i 100 µg/mL streptomicina (Life Technologies, SAD). Stanice su rasle u sterilnim plastičnim posudama u inkubatoru pri 37°C uz 5% CO₂ i vlagu. Za potrebe pokusa presađivane su kada su dosegle 80-90% konfluentnosti.

3.2. Nasadivanje stanica

Iz sterilnih plastičnih posuda je odstranjena tekuća hranjiva podloga te su stanice jednom isprane PBS-om, a drugi put tripsinom (1 mL, 0,25%), (Imunološki zavod Zagreb, Hrvatska) te je posuda odložena u inkubator na 5-10 minuta. Zatim je, ukoliko su stanice bile odvojene od podloge, u bocu dodano 4 mL tekuće hranjive podloge, stanice su resuspendirane te premještene u epruvetu.

Nakon tripsinizacije slijedilo je brojanje stanica radi određivanja njihove koncentracije. Broj živih i mrtvih stanica određen je pod svjetlosnim mikroskopom bojanjem sa tripanskim modrilom (0,03%) u Bürker-Türkovoj komorici. Stanice se razrijeđuju u omjeru 1:5, dakle 20 µL stanica se pomiješa sa 80 µL boje. Broj živih stanica u 1 mL određen je prema formuli

$$[(\text{broj živih stanica}) / 0,4] \times \text{razrjeđenje} \times 10^3 = \text{broj živih stanica/mL.}$$

Kad je koncentracija stanica poznata, računa se i pripravlja koncentracija stanica potrebnih za pokus. Pripravljena koncentracija nasaduje se u odgovarajuće sterilne posude koje se odlažu u inkubator tijekom 18 sati.

3.3. Test citotoksičnosti

Citotoksično djelovanje kemoterapeutika i liganda TLR3 određivali smo testom MTT. To je standardni kolorimetrijski test kojim se mjeri aktivnost enzima dehidrogenaze koji reducira (cijepa tetrazolni prsten) žuti, topivi MTT (dimetiltiazol difenil tetrazolium bromid) u ljubičasti, netopivi formazan, a apsorbancija nastalog obojenja je mjera mitohondrijske aktivnosti, odnosno vijabilnosti stanica. Apsorbancija se mjeri čitačem za mikrotitarske pločice pri 570 nm. Eksperimentalno dobivene vrijednosti apsorbancije preračunavaju se u postotak rasta stanica (od engl. *percentage of growth*, PG) pomoću formule

$$PG = 100 \times (\text{srednja vrijednost } OD_{\text{test}} - \text{srednja vrijednost } OD_{t_0}) / (\text{srednja vrijednost } OD_k - \text{srednja vrijednost } OD_{t_0})$$

gdje je OD_{test} izmjerene vrijednosti apsorbancije uzoraka nakon mjerenog vremena, OD_{t_0} izmjerene vrijednosti apsorbancije uzoraka prije izlaganja uzoraka određenoj tvari i OD_k izmjerene vrijednosti apsorbancije stanica bez tretmana.

U sterilne posude s 96 bunarića nasadeno je 1×10^4 stanica FaDu i Detroit 562 te su tretirane s poly(I:C) (InvivoGen, SAD), 5-fluorouracilom (5-FU, Sigma, Njemačka) i metotreksatom (MTX, Sigma, Njemačka) u dvije serije pokusa prema shemi (tablice 3 i 4) tijekom 24 sata.

Tablica 3. Shema tretmana stanica s poly(I:C) i 5-fluorouracilom u navedenim koncentracijama

K*	1 µg/mL pIC	10 µg/mL pIC
0,001 mM 5-FU	1 µg/mL pIC + 0,001 mM 5-FU	10 µg/mL pIC + 0,001 mM 5-FU
0,01 mM 5-FU	1 µg/mL pIC + 0,01 mM 5-FU	10 µg/mL pIC + 0,01 mM 5-FU
0,1 mM 5-FU	1 µg/mL pIC + 0,1 mM 5-FU	10 µg/mL pIC + 0,1 mM 5-FU

K* - netretirane stanice

Tablica 4. Shema tretmana stanica s poly(I:C) i metotreksatom u navedenim koncentracijama

K*	1 µg/mL pIC	10 µg/mL pIC
0,05 µM MTX	1 µg/mL pIC + 0,05 µM MTX	10 µg/mL pIC + 0,05 µM MTX
0,5 µM MTX	1 µg/mL pIC + 0,5 µM MTX	10 µg/mL pIC + 0,5 µM MTX
5 µM MTX	1 µg/mL pIC + 5 µM MTX	10 µg/mL pIC + 5 µM MTX

K* - netretirane stanice

Nakon 24-satnog tretmana, iz bunarića je odstranjena hranjiva tekuća podloga te je nakapano 40 µL reagensa MTT. Nakon inkubacije od 3 sata, netopivi talog formazana otopljen je u 160 µL dimetil-sulfoksida (Kemika, Hrvatska). Svaka točka načinjena je u kvadriplikatu u tri neovisna pokusa.

Prije izvođenja navedenih pokusa načinjen je niz titracijskih krivulja pomoću kojih smo utvrdili vrijednost LC_{50} (od engl. *Lethal Concentration, 50%*) za kemoterapeutike 5-fluorouracil i metotreksat.

U sterilne posude s 96 bunarića nasadeno je 1×10^4 stanica te su tretirane s 5-fluorouracilom te metotreksatom prema shemi (tablica 5) tijekom 24 sata. Koncentracije su pripravljene razrjeđivanjem početnih koncentracija ($c_0(5-FU) = 72\text{mM}$, $c_0(\text{MTX}) = 1\text{mM}$).

Tablica 5. Shema tretmana stanica sa 5-fluorouracilom i metotreksatom u navedenim koncentracijama

5-FU(mM)	K*	0,001	0,01	0,1	1	10
MTX(µM)	K*	0,005	0,05	0,5	5	25

K* - netretirane stanice

Vrijednost LC_{50} označava koncentraciju određenog reagensa koja uzrokuje smrt 50% ispitivanih stanica, odnosno preživljenje 50% ispitivanih stanica. Pomoću LC_{50} vrijednosti određene su optimalne koncentracije kemoterapeutika koje su korištene u pokusima.

3.4. Mjerenje apoptotskih stanica protočnim citometrom

Kao biljeg apoptotičnih stanica mogu poslužiti fosfatidil-serini koji se u normalnim staničnim uvjetima nalaze unutar membrane, dok se tijekom apoptoze premještaju na vanjsku stranu membrane. Postotak apoptotičnih stanica određuje se bojanjem molekulama aneksina-V konjugiranih s fluorokromom koje se vežu sa fosfatidil-serin. Boja 7-amino-aktinomicin D (7AAD) veže se na mrtve stanice te omogućuje isključivanje mrtvih stanica iz analize.

U sterilne posude sa 6 bunarića nasađeno je $0,4 \times 10^6$ stanica Detroit 562. Stanice su tretirane s poly(I:C), 5-fluorouracilom, metotreksatom, klorokinom (Sigma, Njemačka) i kamptotecinom u dvije serije pokusa prema shemi (tablice 6 i 7) tijekom 24 sata.

Tablica 6. Shema tretmana stanica navedenim reagensima i koncentracijama

K*	pIC 10 µg/mL	5-FU 0,1 mM
5-FU 0,1 mM + pIC 10 µg/mL	5-FU 0,1 mM + pIC 10 µg/mL + CQ 10 µM	Kam 1 µM

K* - netretirane stanice

Tablica 7. Shema tretmana stanica navedenim reagensima i koncentracijama

K*	pIC 10 µg/mL	MTX 5 µM
MTX 5 µM + pIC 10 µg/mL	MTX 5 µM + pIC 10 µg/mL + CQ 10 µM	Kam 1 µM

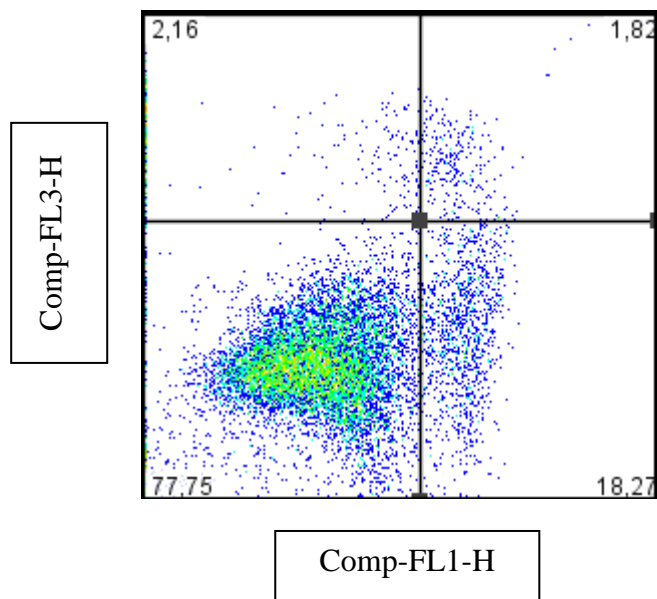
K* - netretirane stanice

Klorokin je inhibitor TLR3 stoga je u pokusu korišten da bi se provjerilo je li apoptoza posljedica TLR3-ovisnog signalnog puta. Klorokin neutralizira kiselu unutrašnjost endosoma. Budući da TLR3 za aktivaciju signalnog puta zahtijeva kiseli pH, klorokin ga neizravno inhibira (36, 37). Kao pozitivna kontrola apoptoze korišten je kamptotecin u koncentraciji 1 µM. Kamptotecin je inhibitor enzima DNA topoisomerase I jer se veže na kompleks

enzim:molekula DNA pri čemu nastaju nepopravljiva oštećenja DNA zbog kojih stanica ulazi u apoptozu.

Stanice su tretirane tijekom 24 sata. Potom je iz svakog bunarića odstranjena tekuća hranjiva podloga, stanice su tripsinizirane te pomiješane s tekućom hranjivom podlogom iz pripadajućeg bunarića. Stanice ($0,12 \times 10^6$) su dva puta isprane u puferu za vezivanje (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2 , pH 7,4). Talog stanica pomiješan je sa 40 μL pufera za vezivanje u kojeg je dodano 1 μL aneksina-V konjugiranog sa fluorokromom Alexa 488 (Invitrogen Molecular Probes, Velika Britanija) i 20 μL boje 7AAD (Invitrogen Molecular Probes, Velika Britanija) koncentracije 6 $\mu\text{g/mL}$. Načinjeno je i nekoliko kontrola: a) neobilježene stanice samo u puferu za vezivanje, b) stanice tretirane s kamptotecinom bojane samo s aneksinom V konjugiranim sa fluorokromom Alexa 488 (samo zelene stanice) i c) stanice tretirane kamptotecinom bojane samo sa 7AAD (samo crvene stanice). Ove kontrole su služile za namještanje parametara prije analize na protočnom citometru. Stanice su bojane 20 minuta u tami pri sobnoj temperaturi. Potom su resuspendirane u 300 μL pufera za vezivanje te je otopina prebačena u epruvete za mjerenje na protočnom citometru *FACSCalibur*TM (Becton Dickinson, SAD). Rezultati su analizirani programom *FlowJo 7.2.5* (Trestar, SAD).

U izborniku programa *FlowJo 7.2.5* nalazi se ikona s ilustracijom epruvete. Klikom na tu ikonu odabiremo željene uzorke za analizu. Tada klikom na ikonu WINDOWS, u ponuđenom izborniku odabiremo ikonu OPEN COMPENSATION EDITOR. U ovom dijelu programa, pomoću već spomenutih kontrolnih uzoraka, namještamo parametre FL1H (neg.-neobilježene stanice; poz.- samo zelene stanice) i FL3H (neg.-neobilježene stanice; poz.-samo crvene stanice). Klikom na ikonu COMPUTE&APPLY primjenjujemo namještene parametre na sve uzorke. Zatim odabiremo uzorak obilježenih stanica tretiranih kamptotecinom te na osima namjestimo kompenzacijske vrijednosti FL3 (vertikalna os) i FL1 (horizontalna os). Postupak namještanja kompenzacijskih vrijednosti na osima provodimo za svaki uzorak. Klikom na ikonu sa ilustracijom križa namještamo križ između vertikalne i horizontalne osi tako da dobijemo 3 odvojene populacije stanica. Vrijednosti koje se nalaze u svakom kvadrantu su postotci stanica. Namještanjem križa dobili smo vrijednosti Q1,Q2,Q3 i Q4 koje preslikavamo na svaki sljedeći uzorak.



Slika 5. Prikaz stanica tretiranih kamptotecinom u programu FlowJo 7.2.5.

U donjem lijevom kvadrantu (FL1-, FL3-) nalaze se normalne, zdrave stanice, u donjem desnom kvadrantu (FL1+, FL3-) nalaze se stanice u apoptozi, u gornjem desnom kvadrantu (FL1+, FL3+) nalaze se stanice u kasnoj apoptozi, a u gornjem lijevom kvadrantu (FL1-, FL3+) nalaze se stanice u nekrozi (slika 5).

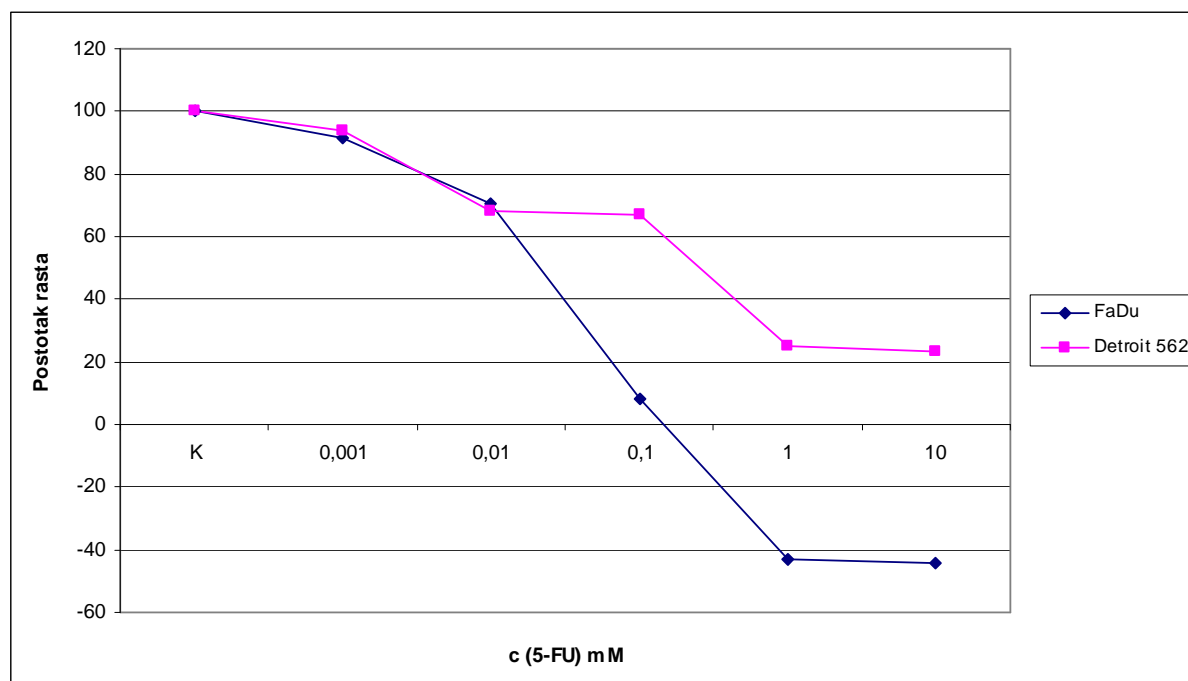
3.5. Statistika

Statistička značajnost rezultata izračunata je Student t-testom (*two tailed*), gdje je vrijednost $p < 0,05$ smatrana statistički značajnom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija.

4. REZULTATI

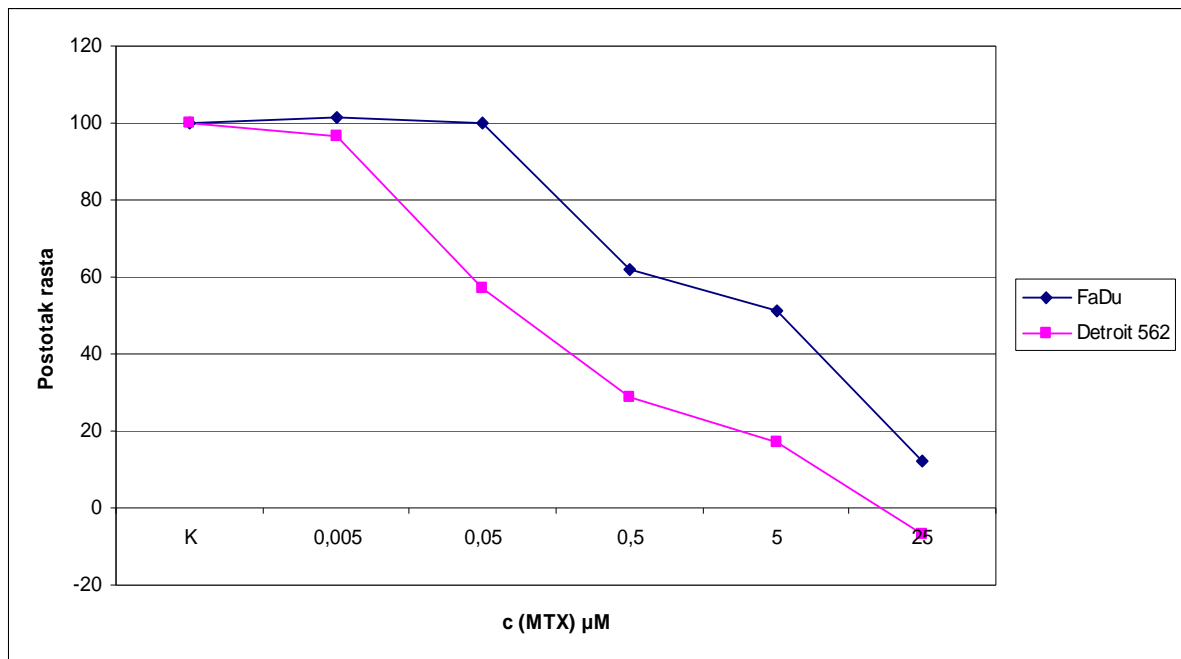
4.1. Titracijske krivulje

Stanice FaDu i Detroit 562 tretirali smo 5-fluorouracilom, odnosno metotreksatom u kombinaciji s poly(I:C) da bismo ispitali njihovo zajedničko djelovanje na staničnu vijabilnost. Da bismo odredili okvir koncentracija kemoterapeutika, ispitali smo djelovanje više koncentracija (str. 15, tablica 5). Pomoću titracijskih krivulja odredili smo približnu vrijednost LC_{50} (test MTT) za kemoterapeutike 5-fluorouracil i metotreksat. LC_{50} vrijednost poslužila nam je u odabiru optimalnih koncentracija koje smo koristili u pokusima. Za daljnje pokuse odabrali smo 3 koncentracije koje su najbliže vrijednosti LC_{50} za oba kemoterapeutika.



Slika 6. Ovisnost rasta stanica FaDu i Detroit 562 o koncentraciji 5-fluorouracila

LC_{50} za kemoterapeutik 5-fluorouracil pri tretiranju stanica FaDu iznosi, približno, 0,055 mM, dok pri tretiranju stanica Detroit 562 iznosi, približno, 0,5 mM (slika 6). Za daljnje pokuse odabrali smo koncentracije 5-fluorouracila od 0,001, 0,01 i 0,1 mM.

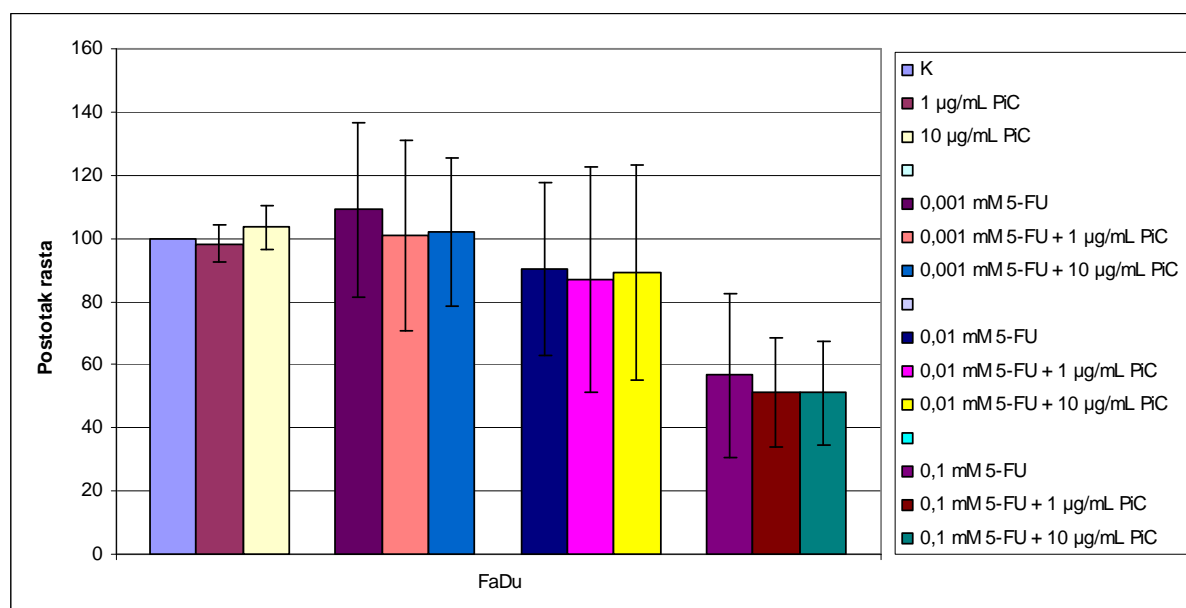


Slika 7. Ovisnost rasta stanica FaDu i Detroit 562 o koncentraciji metotreksata

LC_{50} za kemoterapeutik metotreksat pri tretiranju stanica FaDu iznosi, približno, 5 μM , dok pri tretiranju stanica Detroit 562 iznosi, približno, 0,275 μM (slika 7). Za daljnje pokuse odabrali smo koncentracije metotreksata od 0,05, 0,5 i 5 μM .

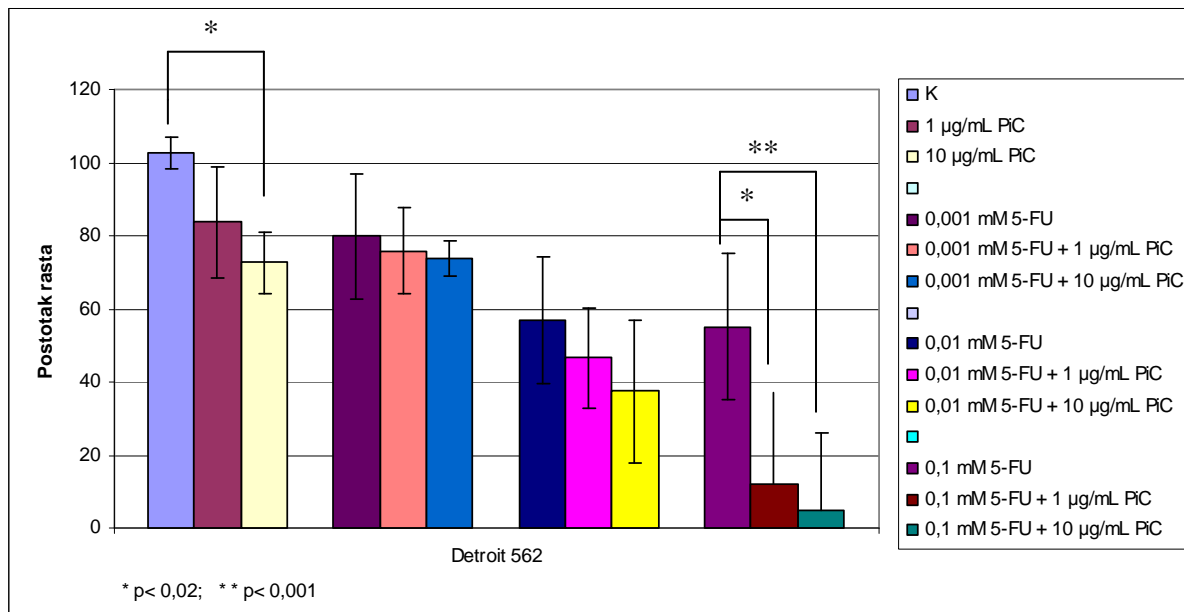
4.2. Učinak kombinirane primjene poly(I:C) i 5-fluorouracila na stanice FaDu i Detroit 562

Da bismo ispitali učinak primjene poly(I:C) i 5-fluorouracila na vijabilnost stanica FaDu i Detroit 562, stanice smo tretirali s poly(I:C) i 5-fluorouracilom koncentracijama prema shemi (str. 14, tablica 3) tijekom 24 sata. Vijabilnost stanica određena je testom MTT.



Slika 8. Ovisnost rasta stanica FaDu o tretmanu s 5-FU, poly(I:C) te s 5-FU i poly(I:C) u kombinaciji

5-fluorouracil koncentracije 0,001 mM ne pokazuje citotoksični učinak na stanice FaDu, dok koncentracija od 0,01 mM uzrokuje smanjenje rasta stanica za približno 10%. Najveća korištena koncentracija 5-fluorouracila, 0,1 mM, uzrokuje smanjenje rasta stanica za približno 50%. Poly(I:C) ne pokazuje učinak na stanice FaDu ni u jednoj od korištenih koncentracija zasebno ni u kombinaciji s 5-fluorouracilom (slika 8).

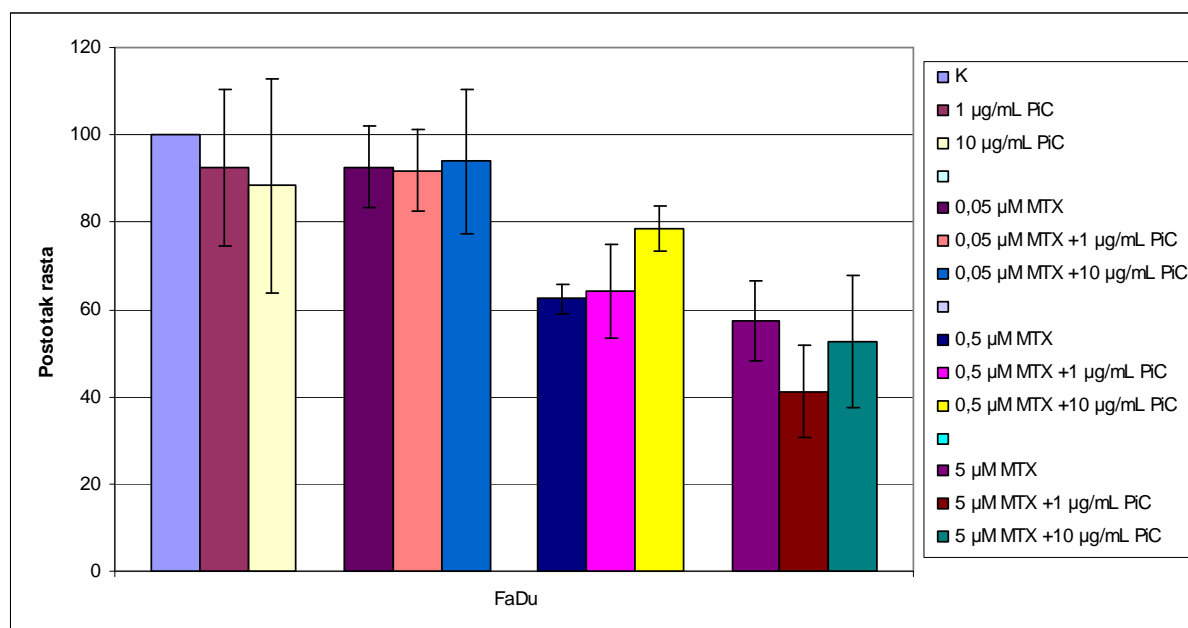


Slika 9. Ovisnost rasta stanica Detroit 562 o tretmanu s 5-FU, poly(I:C) te s 5-FU i poly(I:C) u kombinaciji

Stanice Detroit 562 tretirane 5-fluorouracilom u kombinaciji s poly(I:C) (slika 9) pokazuju smanjenje rasta stanica Detroit 562 za približno 20% kod koncentracije 5-fluorouracila od 0,001 mM, dok koncentracije 0,01 i 0,1 uzrokuju smanjenje rasta stanica za približno 45%. Poly(I:C) pokazuje učinak na stanice Detroit 562. U koncentraciji od 1 µg/mL uzrokuje smanjenje rasta stanica od približno 20%, dok koncentracija 10 µg/mL uzrokuje smanjenje rasta stanica za približno 30%, što je statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu. Poly(I:C) u kombinaciji s 5-fluorouracilom uzrokuje veće smanjenje rasta stanica nego poly(I:C) i 5-fluorouracil u jednakim koncentracijama zasebno. Najveća i ujedno statistički značajna razlika vidi se u tretmanu s 5-fluorouracilom koncentracije 0,1 mM u odnosu na tretman iste koncentracije 5-fluorouracila u kombinaciji s poly(I:C) 1 µg/mL odnosno 10 µg/mL, gdje uočavamo smanjenje rasta stanica za približno 40% odnosno 45% u odnosu na tretman samo s 5-fluorouracilom iste koncentracije, te smanjenje rasta stanica za približno 90% odnosno 95% u odnosu na kontrolu.

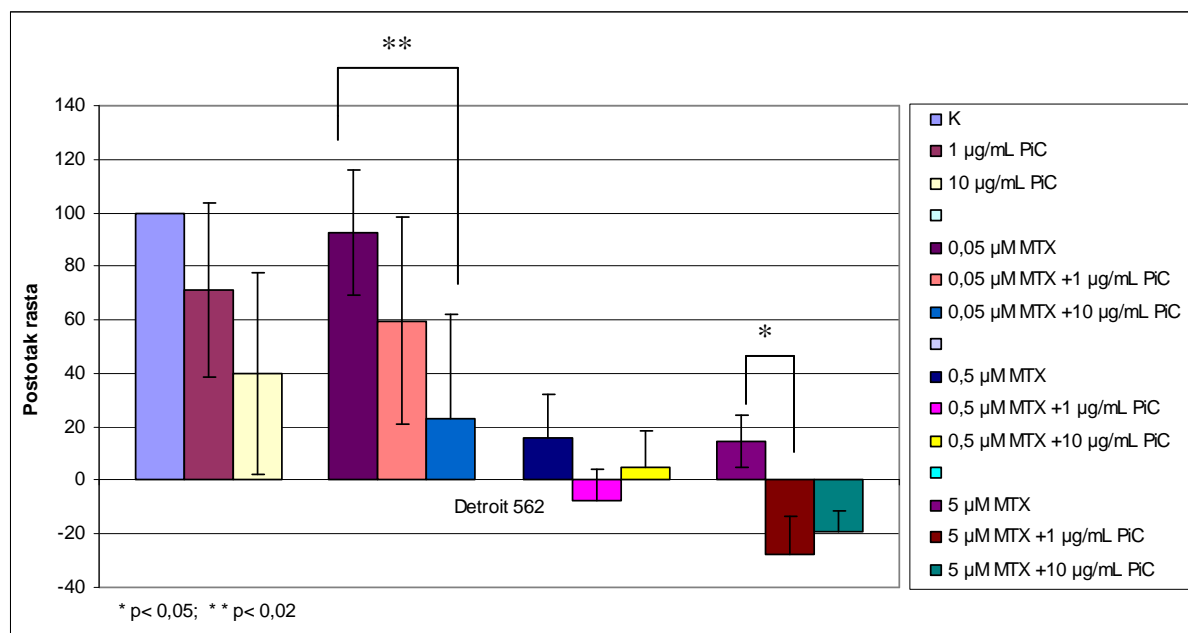
4.3. Učinak kombinirane primjene poly(I:C) i metotreksata na stanice FaDu i Detroit 562

Da bismo ispitali učinak kombinirane primjene poly(I:C) i metotreksata na vijabilnost stanica FaDu i Detroit 562, stanice smo tretirali s poly(I:C) i metotreksatom koncentracijama prema shemi (str. 15, tablica 4) tijekom 24 sata. Vijabilnost stanica određena je testom MTT.



Slika 10. Ovisnost rasta stanica FaDu o tretmanu s MTX, poly(I:C) te s MTX i poly(I:C) u kombinaciji

Metotreksat koncentracije 0,05 µM uzrokuje smanjenje rasta stanica FaDu za približno 10%, dok koncentracije 0,5 i 5 µM uzrokuju smanjenje rasta stanica za približno 40%. Poly(I:C) ne pokazuje učinak na stanice FaDu ni u jednoj od koncentracija zasebno, ni u kombinaciji s metotreksatom (slika 10).

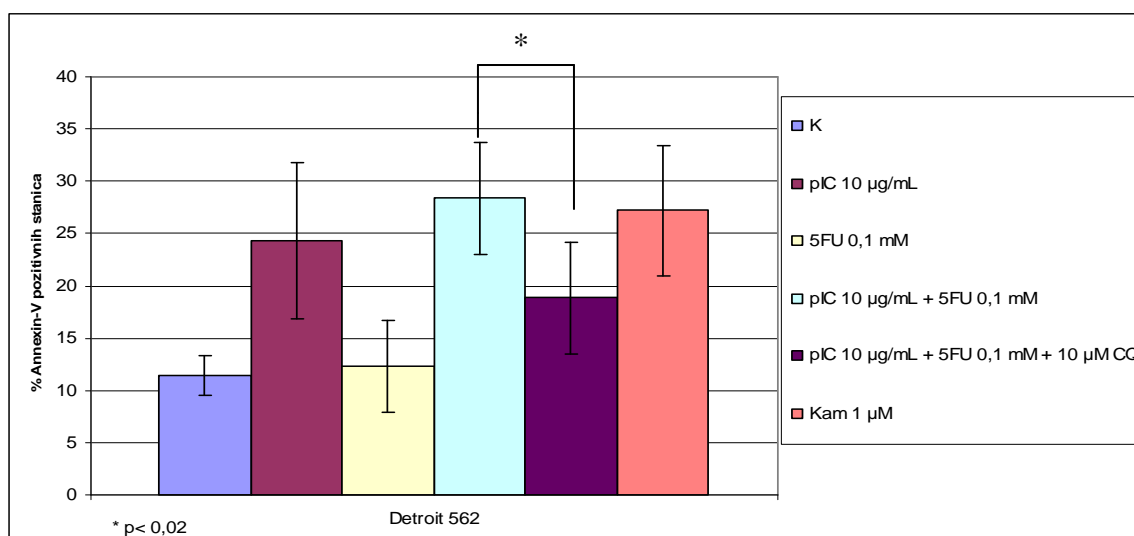


Slika 11. Ovisnost rasta stanica Detroit 562 o tretmanu s MTX, poly(I:C) te s MTX i poly(I:C) u kombinaciji

Pokusi na stanicama Detroit 562 (slika 11) pokazali su da metotreksat u koncentraciji 0,05 µM uzrokuje smanjenje rasta stanica za približno 10%, dok u koncentraciji 0,5 i 5 µM uzrokuje smanjenje rasta stanica za približno 85%. Poly(I:C) u koncentraciji od 1 µg/mL uzrokuje smanjenje rasta stanica za približno 30%, dok u koncentraciji 10 µg/mL uzrokuje smanjenje rasta stanica za približno 60%. Kombinacija poly(I:C) i metotreksata uzrokuje veće smanjenje rasta stanica nego poly(I:C) i metotreksat u jednakim koncentracijama zasebno. Statistički značajne razlike između tretmana samo s metotreksatom i kombiniranog tretmana vide se kod najmanje i najveće korištene koncentracije metotreksata. Najveća razlika vidi se u tretmanu s metotreksatom koncentracije 5 µM u odnosu na tretman iste koncentracije metotreksata u kombinaciji s poly(I:C) koncentracije 1 µg/mL odnosno 10 µg/mL, gdje uočavamo smanjenje rasta stanica za približno 40% odnosno 35% u odnosu na tretman samo s metotreksatom iste koncentracije, te smanjenje rasta stanica za približno 125% odnosno 120% u odnosu na kontrolu. Dakle, u ovom slučaju metotreksat je imao citotoksični učinak te je, osim što je inhibirao rast stanica, uzrokovao i njihovu smrt.

4.4. Mjerenje apoptotskih stanica protočnim citometrom

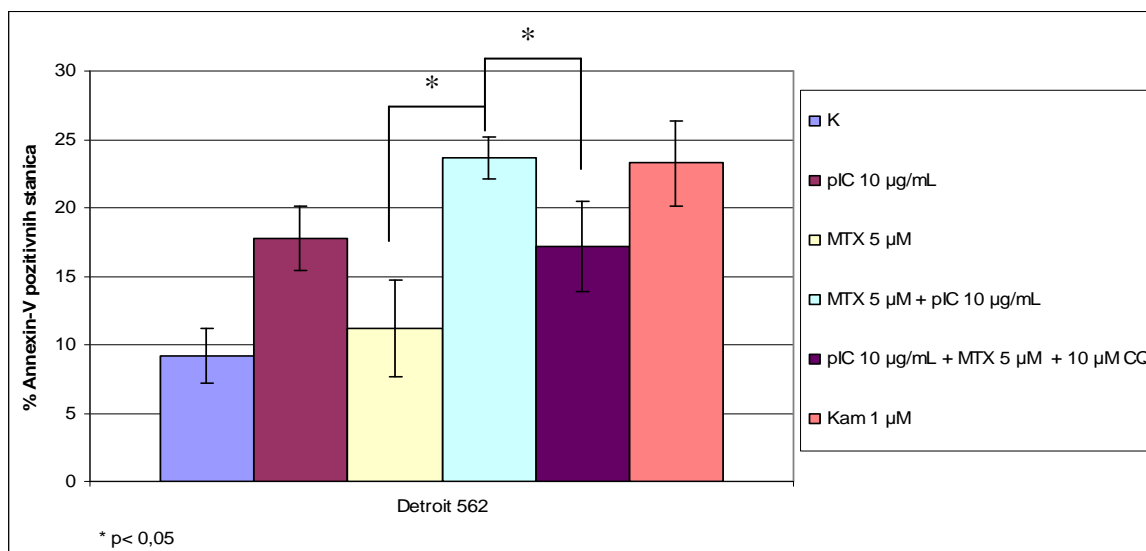
Kako bismo utvrdili kakav učinak poly(I:C) ima na stanice Detroit 562, tj. da li je smanjenje rasta stanica posljedica poly(I:C)-aktivirane apoptoze putem aktivacije TLR3 na stanicama Detroit 562, pomoću protočnog citometra mjerili smo postotak apoptotskih stanica. Stanice Detroit 562 tretirane su s poly(I:C), 5-fluorouracilom, metotreksatom, klorokinom i kamptotecinom u dvije serije pokusa prema shemi (str. 16, tablice 6 i 7) tijekom 24 sata. Udio stanica u apoptozi ispitan je protočnim citometrom, tzv. aneksinskim testom.



Slika 12. Postotak apoptotskih stanica Detroit 562 nakon tretmana s poly(I:C), 5-FU, poly(I:C) s 5-FU sa i bez klorokina te kamptotecinom

Slika 12 prikazuje Postotak apoptotskih stanica Detroit 562 nakon tretmana s poly(I:C), 5-FU, poly(I:C) s 5-FU sa i bez klorokina te kamptotecinom. Udio stanica u apoptozi unutar populacije netretiranih stanica iznosio je oko 12%. Gotovo jednak postotak apoptotskih stanica javlja se nakon tretmana samo s 5-fluorouracilom koncentracije 0,1 mM. Stanice tretirane s poly(I:C) koncentracije 10 µg/mL sadrže približno 24% apoptotskih stanica. Stanice tretirane s poly(I:C) i 5-fluorouracilom sadrže približno 28% apoptotskih stanica, dok gotovo jednak postotak apoptotskih stanica, približno 27%, sadrže stanice tretirane kamptotecinom koncentracije 1 µM. Kamptotecin je inhibitor enzima DNA topoizomeraze I te se veže na kompleks enzim:molekula DNA pri čemu nastaju nepopravljiva oštećenja DNA zbog kojih stanica ulazi u apoptozu. Dakle, koristili smo ga kao pozitivnu kontrolu apoptoze. Iako se trend povećanja broja apoptotskih stanica u kombiniranom tretmanu s poly(I:C) i 5-fluorouracilom u odnosu na tretman samo s 5-fluorouracilom vidi u svakom provedenom pokusu, ta razlika nije statistički značajna budući da se radi o biološkom

triplikatu pokusa. Kako bi se dobila statistički značajna razlika, trebalo bi pokus ponoviti još barem jednom. Stanice tretirane s poly(I:C), 5-fluorouracilom i klorokinom koncentracije 10 μM sadrže približno 19% apoptotskih stanica, dok je razlika, u odnosu na tretman s poly(I:C) i 5-fluorouracilom, statistički značajna. Klorokin je inhibitor TLR3 stoga je u pokusu korišten da bi provjerili da li je apoptoza posljedica TLR3-ovisnog signalnog puta. Ovime smo dokazali da je učinak tretmana s poly(I:C) i kombiniranog tretmana s poly(I:C) i 5-fluorouracilom barem djelomično posljedica signalnog puta ovisnog o TLR3.



Slika 13. Postotak apoptotskih stanica nakon tretmana s poly(I:C), MTX, poly(I:C) s MTX sa i bez klorokina te kamptotecinom

Slika 13 prikazuje postotak apoptotskih stanica nakon tretmana s poly(I:C), MTX, poly(I:C) s MTX sa i bez klorokina te kamptotecinom. Udio stanica u apoptozi unutar populacije netretiranih stanica iznosio je oko 9%, dok stanice tretirane metotreksatom koncentracije 5 μM sadrže približno 11% apoptotskih stanica. Stanice tretirane s poly(I:C) koncentracije 10 $\mu\text{g/mL}$ sadrže približno 17% apoptotskih stanica. Razlika između tretmana s poly(I:C) i kombiniranog tretmana s poly(I:C) i metotreksatom je statistički značajna. Stanice tretirane s poly(I:C) i metotreksatom sadrže približno 23% apoptotskih stanica, dok gotovo jednak postotak apoptotskih stanica sadrže stanice tretirane kamptotecinom koncentracije 1 μM . Stanice tretirane s poly(I:C), metotreksatom i klorokinom koncentracije 10 μM sadrže približno 17% apoptotskih stanica, dok je razlika, u odnosu na tretman s poly(I:C) i metotreksatom, statistički značajna. Time smo dokazali da je učinak tretmana s poly(I:C) i kombiniranog tretmana s poly(I:C) i metotreksatom barem djelomično posljedica TLR3-ovisnog signalnog puta.

5. RASPRAVA

Toll-like receptor 3, kao i ostali receptori TLR, ima ključnu ulogu u urođenoj imunosti. Smješten je na membrani endosoma gdje prepoznaje i specifično veže dvolančanu viralnu RNA. Budući da je dvolančana RNA dio genoma virusa i/ili jedan od koprodukata replikacije virusa, TLR3 se smatra glavnim Toll-like receptorom u obrani od virusnih infekcija. Nakon aktivacije TLR3, pokreće se signalni put kojim se aktiviraju geni koji kodiraju za proteine koji sudjeluju u imunološkom odgovoru (10, 14).

Nedavna istraživanja su pokazala da stanice nekih vrsta tumora, uz ostale receptore TLR, izražavaju TLR3. Dosadašnji rezultati pokazuju da aktivacija TLR3 na stanicama tumora potiče apoptozu u stanicama tumora te blokira njihovu proliferaciju (29-31). Nedavno je otkriveno da aktivacija TLR3 u kombinaciji sa protutumorskim terapeutima povećava citotoksični učinak agonista TLR3 na stanice tumora (32-34). To nas dovodi do zaključka da se agonisti TLR3 mogu koristiti kao protutumorski agensi zbog svojeg citostatskog i citotoksičnog djelovanja na stanice tumora. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi učinak kombinirane primjene agonista TLR3 i kemoterapeutika na stanice primarnog tumora i metastaza.

U tu svrhu ispitali smo djelovanje liganda TLR3, poly(I:C), u kombinaciji s kemoterapeuticima 5-fluorouracilom i metotreksatom na stanice primarnog i metastatskog tumora ždrijela. Primarni interes bio je otkrivanje razlika u citotoksičnosti između tretmana samo s poly(I:C) i kombiniranog tretmana s poly(I:C) i navedenim kemoterapeuticima te je li smanjenje rasta stanica posljedica poly(I:C)-aktivirane apoptoze ovisne o signalnom putu TLR3.

Do danas je objavljeno nekoliko istraživanja koja su se bavila proučavanjem poly(I:C)-aktivirane apoptoze u stanicama tumora u kombinaciji s protutumorskim terapeutima. Salaun i suradnici utvrdili su da je TLR3 izražen na stanicama melanoma. Nakon aktivacije ligandom poly(I:C) u kombinaciji sa cikloheksimidom ili IFN α , potiče se apoptoza te inhibira proliferacija stanica tumora (32). Cikloheksimid je inhibitor sinteze proteina te se koristi kao kemoterapeutik. Slično istraživanje proveli su Jiang i suradnici te otkrili da cikloheksimid u kombinaciji s poly(I:C) potiče apoptozu u više vrsta linija stanica tumora (karcinom pluća, ždrijela, jajnika, grlića maternice i hepatoma) koji imaju izražen TLR3. Neke linije stanica nisu pokazale osobitu osjetljivost na tretman što bi se moglo objasniti oštećenim staničnim signalnim mehanizmom ili nedovoljnom ekspresijom proteina

TLR3. Mehanizam međusobnog djelovanja cikloheksimida i aktiviranog TLR3 nije poznat, ali je utvrđeno da je apoptoza ovisna o signalnom putu TLR3 (33). Istraživanja provedena od strane Taura i suradnika pokazala su da protutumorski terapeutici, kao što su aktivatori tumor-supresora p53 te interferoni, povećavaju razinu izražaja TLR3 te na taj način potiču uništavanje stanica tumora aktivirano ligandom poly(I:C). Tumor-supresor protein p53 aktivira se oštećenjem DNA te potom inducira prekid staničnog ciklusa i/ili apoptozu. Nedavno je otkriveno da se p53 izravno veže na promotorsku regiju gena *TLR3* te na taj način pozitivno regulira njegovu transkripciju. Utvrđeno je da kemoterapeutik 5-fluorouracil povećava razinu izražaja TLR3 na stanicama tumora karcinoma crijeva te u kombinaciji s ligandom poly(I:C) potiče apoptozu u p53^{+/+} stanicama tumora. U stanicama p53^{-/-}, 5-fluorouracil ne pokazuje učinak, što dovodi do zaključka da 5-FU djeluje putem ovisnim o p53. Nasuprot tome, osim što samostalno djeluje na povećanje izražaja TLR3, IFN α u kombinaciji s ligandom poly(I:C) potiče apoptozu u stanicama tumora oba genotipa, p53^{+/+} i p53^{-/-}. Dakle, IFN α inducira apoptozu neovisno o tumor supresoru p53. Nadalje, kombinacija 5-fluorouracila, IFN α te poly(I:C)-a uzrokuje najvišu razinu apoptoze u stanicama tumora oba genotipa p53^{+/+} i p53^{-/-}. Ovi rezultati su od iznimnog značaja s obzirom da 50% svih vrsta tumora posjeduje nefunkcionalan p53 (34).

U našem istraživanju koristili smo kemoterapeutike 5-fluorouracil i metotreksat. Oba kemoterapeutika pripadaju skupini antimetabolita, koji svojim djelovanjem izravno ili neizravno inhibiraju sintezu deoksinukleotida koji su neophodni za sintezu i popravak DNA. 5-fluorouracil je pirimidinski antagonist te kao analog uracila inhibira timidilat sintazu, odnosno sintezu timina. Metotreksat inhibira metabolizam folne kiseline. Folna kiselina i njeni derivati, folati, nužni su za *de novo* sintezu pirimidina timina te svih purina. Dakle, djelovanje oba kemoterapeutika za posljedicu ima smrt stanica uslijed nemogućnosti replikacije i popravka DNA. Također, djelovanje oba kemoterapeutika uzrokuje aktivaciju tumor-supresora p53 (38), što je veoma značajno za naše istraživanje.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da poly(I:C) ima citotoksični učinak na stanice Detroit 562, dok na stanice FaDu nema učinka. Prethodno istraživanje je pokazalo da FaDu posjeduju nefunkcionalan TLR3 (31), čime objašnjavamo dobivene rezultate.

Citotoksično djelovanje poly(I:C) na stanice Detroit 562 se značajno povećava pri tretmanu stanica sa poly(I:C) u kombinaciji sa 5-fluorouracilom, odnosno metotretksatom. To ukazuje na sinergistično djelovanje poly(I:C) i navedenih kemoterapeutika. Dosadašnja istraživanja su pokazala da kemoterapeutici pojačavaju citotoksični učinak poly(I:C)-aktivirane apoptoze u stanicama tumora putem tumor-supresora p53. Otkriveno je da se tumor-

supresor p53 izravno veže na promotorsku regiju gena za TLR3 te na taj način pozitivno utječe na njegovu ekspresiju, čime stanice tumora čini osjetljivijima na poly(I:C) (34). Budući da stanice Detroit 562 posjeduju mutirani tumor-supresor p53 (39), rezultati našeg istraživanja pokazuju da tumor-supresor p53 nije ključni čimbenik u mehanizmu sinergističkog djelovanja poly(I:C) i kemoterapeutika. Ovo otkriće je od iznimnog značaja s obzirom da većina stanica tumora posjeduje nefunkcionalan tumor-supresor p53.

Rezultati mjerenja apoptotskih stanica protočnim citometrom pokazala su da se značajan postotak stanica nalazi u apoptozi nakon tretmana s poly(I:C), dok vidljivo veći postotak apoptotskih stanica nalazimo nakon kombiniranog tretmana s poly(I:C) i kemoterapeuticima. Da bi isključili mogućnost apoptoze inducirane mehanizmom koji nije vezan uz TLR3, stanice smo tretirali klorokinom, inhibitorom TLR3. Nakon tretmana klorokinom postotak apoptotskih stanica je značajno umanjen. Osim što smo još jednom utvrdili sinergističko djelovanje poly(I:C) i kemoterapeutika, ovim rezultatima potvrđujemo pretpostavku da je smanjenje rasta stanica posljedica apoptoze inducirane signalnim putem ovisnim o TLR3.

Prema svim dosad provedenim istraživanjima vezanim uz izražaj TLR3 na stanicama tumora, možemo zaključiti da aktivacija TLR3 s poly(I:C) na stanicama Detroit 562 uzrokuje apoptozu u stanicama tumora, dok metotreksat i 5-fluorouracil pojačavaju učinak poly(I:C)-aktivirane apoptoze.

Budući da je ovo još jedan u nizu do sad zabilježenih slučajeva u kojima TLR3 u stanicama tumora ima protutumorsko djelovanje koje je pojačano primjenom kemoterapeutika, potrebno je što detaljnije utvrditi mehanizam njihovog međusobnog djelovanja. To je osobito bitno zbog rezultata našeg istraživanja koja pokazuju da se djelovanje poly(I:C) i kemoterapeutika odvija signalnim putem neovisnim o tumor-supresoru p53. Budući da više od 50% svih vrsta tumora posjeduje nefunkcionalan tumor-supresor p53, otkriće tog signalnog puta bilo bi od iznimnog značaja.

Također bi bilo potrebno istražiti učinak kombiniranog djelovanja poly(I:C) i ostalih terapeutika na stanice Detroit 562, kao npr. interferona α . Taura i suradnici pokazali su da IFN α pozitivno djeluje na razinu izražaja TLR3 na stanicama tumora, također neovisno o tumor-supresoru p53. Smatra se da je mehanizam djelovanja IFN α ovisan o signalnom putu JAK/STAT. Rezultati njihovog istraživanja pokazuju da kombinirana primjena poly(I:C), IFN α i 5-fluorouracila uzrokuje najvišu razinu apoptoze u stanicama tumora (34).

Detaljnija saznanja o kombiniranoj primjeni poly(I:C) i određenih terapeutika mogla bi dovesti do razvoja kvalitetnijeg protutumorskog liječenja i što je još važnije, sa manje

štetnim učincima na stanice domaćina. Liječenje tumora klasičnom kemoterapijom, kao što je terapija 5-fluorouracilom i metotreksatom, uzrokuje iznimno teške i neugodne nuspojave. Kemoterapeutici ne djeluju citotoksično samo na stanice tumora, već i na sve stanice u organizmu koje se intenzivno dijele. Kombinirana terapija poly(I:C) i kemoterapeutika uzrokuje učinkoviti protutumorski učinak pri nižim koncentracijama kemoterapeutika, dok poly(I:C) sam po sebi nije štetan za stanice domaćina, naprotiv, usmjereno djeluje na stanice tumora. No, terapija s poly(I:C) je također i prilično ograničena. Ukoliko normalne stanice tkiva zahvaćenog tumorom izražavaju TLR3, terapija s poly(I:C) mogla bi rezultirati kroničnom upalom koja dodatno pogoduje razvoju tumora. Dakle, terapija s poly(I:C) ograničena je na stanice tumora koje izražavaju TLR3 pod uvjetom da i na normalnim stanicama tkiva zahvaćenog tumorom TLR3 nije izražen, ili je barem slabije izražen.

Rezultati svih dosadašnjih istraživanja pokazuju da aktivacija TLR3 na stanicama tumora ima protutumorsko djelovanje, tj. potiče apoptozu u stanicama tumora. Da bi ovo iznimno otkriće mogli upotrijebiti kao temelj za razvoj novih i kvalitetnijih protutumorskih terapija, potrebno je istražiti točan mehanizam djelovanja.

6. ZAKLJUČCI

Da bismo utvrdili da li kombinirana primjena poly(I:C) i kemoterapeutika može poslužiti kao protutumorsko liječenje, koje bi rezultiralo blažim i manje štetnim nuspojavama po organizam, ispitali smo učinak kombinirane primjene poly(I:C) i kemoterapeutika, 5-fluorouracila i metotreksata, na stanice primarnog (linija stanica FaDu) i metastatskog tumora ždrijela (linija stanica Detroit 562).

1. Iz titracijskih krivulja utvrđena je približna vrijednost LC_{50} za kemoterapeutike 5-fluorouracil i metotreksat. Približna vrijednost LC_{50} za 5-fluorouracil iznosi 0,055 mM za stanice FaDu, a 0,5 mM za stanice Detroit 562, dok približna vrijednost LC_{50} za metotreksat iznosi 5 μ M za stanice FaDu, a 0,275 μ M za stanice Detroit 562.
2. Testom citotoksičnosti utvrdili smo da poly(I:C) pokazuje inhibitorni učinak na stanice Detroit 562, dok na stanice FaDu nema učinak. Ovime smo dodatno potvrdili ulogu receptora TLR3 u stanicama Detroit 562.
3. Ustanovljeno je da kombinirana primjena poly(I:C) i kemoterapeutika ima značajno veći inhibitorni učinak na rast stanica nego zasebni tretman s poly(I:C). Dakle, poly(I:C) i kemoterapeutik 5-fluorouracil, odnosno metotreksat, djeluju sinergistički.
4. Analiza apoptoze stanica Detroit 562 pokazala je da inhibitorni učinak kombiniranog tretmana s poly(I:C) i 5-fluorouracilom, odnosno metoteksatom, jest posljedica poly(I:C)-aktivirane apoptoze ovisne o signalnom putu TLR3.

7. LITERATURA

1. Arancibia SA, Beltran CJ, Maguirre I, Silva P, Peralta AL, Malinarich F, Hermoso MA (2007): Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol Res* 40: 97-112.
2. Takeda K, Akira S (2005): Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17: 1–14.
3. Akira S, Takeda K (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4: 499-511.
4. Kopp EB, Medzhitov R (1999): The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 11: 13-18.
5. Kawai T, Akira S (2007): Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 13: 460-469.
6. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CA (1998): MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 2: 253- 258.
7. Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL (2007): Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nature Med* 13: 552-559.
8. Chen K, Huang J, Gong W, Iribarren P, Dunlop NM, Ming Wang J (2007): Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer. *Int Immunopharmacol* 7: 1271-1285.
9. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF (1998): A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 588-593.
10. Sen GC, Sarkar SN (2005): Transcriptional signaling by double-stranded RNA: role of TLR3. *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 1-14.
11. Choe J, Kelker MS, Wilson IA (2005): Crystal structure of human Toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science* 309: 581-585.
12. Bell JK, Askins J, Hall PR, Davies DR, Segal DM (2006): The dsRNA binding site of human Toll-like receptor 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 8792-8797.
13. Funami K, Matsumoto M, Oshiumi H, Akazawa T, Yamamoto A, Seya T (2004): The cytoplasmic 'linker region' in Toll-like receptor 3 controls receptor localization and signaling. *Int Immunol* 16: 1143-1154.
14. Gauzzi MC, Del Corno M, Gessani S (2010): Dissecting TLR3 signalling in dendritic cells. *Immunobiology* 215: 713-723.
15. Schröder M, Bowie AG (2005): TLR3 in antiviral immunity: key player or bystander? *Trends Immun* 26: 462-468.

16. Matsumoto M, Seya T (2008): TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv Drug Del Rev* 60: 805-812.
17. Karikó K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D (2004): mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem* 279: 12542-12550.
18. Vercammen E, Staal J, Beyaert R (2008): Sensing of viral infection and activation of innate immunity by Toll-like receptor 3. *Clin Microbiol Rev* 21: 13-25.
19. An H, Qian C, Cao X (2010): Regulation of Toll-like receptor signaling in innate immunity. *Sci China Life Sci* 53: 34-43.
20. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S (2003): Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301: 640-643.
21. Xagorari A, Chlichlia K (2008): Toll-like receptors and viruses: induction of innate antiviral immune responses. *Open Microbiol J* 2: 49-59.
22. Tsan MF (2006): Toll-like receptors, inflammation and cancer. *Sem Cancer Biol* 16: 32-37.
23. Zeromski J, Mozer-Lisewska I, Kaczmarek M (2008): Significance of Toll-like receptors expression in tumor growth and spreading: a short review. *Cancer Microenviron* 1: 37-42.
24. Sato Y, Goto Y, Narita N, Hoon DS (2009): Cancer cells expressing Toll-like receptors and the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron* 2: 205-214.
25. He W, Liu Q, Wang L, Chen W, Li N, Cao X (2007): TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Mol Immunol* 44: 2850- 2859.
26. Kelly MG, Alvero AB, Chen R, Silasi DA, Abrahams VM, Chan S, Visintin I, Rutherford T, Mor G (2006): TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res* 66: 3859-3868.
27. Szczepanski MJ, Czystowska M, Szajnik M, Harasymczuk M, Boyiadzis M, Kruk-Zagajewska A, Szyfter W, Zeromski J, Whiteside TL (2009): Triggering of Toll-like receptor 4 expressed on human head and neck squamous cell carcinoma promotes tumor development and protects the tumor from immune attack. *Cancer Res* 69: 3105-3113.
28. El Andaloussi A, Sonabend AM, Han Y, Lesniak MS (2006): Stimulation of TLR9 with CpG ODN enhances apoptosis of glioma and prolongs the survival of mice with experimental brain tumors. *Glia* 54: 526-535.
29. Salaun B, Coste I, Rissoan MC, Lebecque SJ, Renno T (2006): TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J Immunol* 176: 4894-4901.

30. Paone A, Starace D, Galli R, Padula F, De Cesaris P, Filippini A, Ziparo E, Riccioli A (2008): Toll-like receptor 3 triggers apoptosis of human prostate cancer cells through a PKC- α -dependent mechanism. *Carcinogenesis* 29: 1334-1342.
31. Matijevic T, Marjanovic M, Pavelic J (2009): Functionally active toll-like receptor 3 on human primary and metastatic cancer cells. *Scand J Immunol* 70: 18-24.
32. Salaun B, Lebecque S, Matikainen S, Rimoldi D, Romero P (2007): Toll-like receptor 3 expressed by melanoma cells as a target for therapy? *Clin Cancer Res* 13: 4565:4574.
33. Jiang Q, Wei H, Tian Z (2008): Poly I:C enhances cycloheximide-induced apoptosis of tumor cells through TLR3 pathway. *BMC Cancer* 17: 8-12.
34. Taura M, Fukuda R, Suico MA, Eguma A, Koga T, Shuto T, Sato T, Morino-Koga S, Kai H (2010): TLR3 induction by anticancer drugs potentiates poly I:C-induced tumor cell apoptosis. *Cancer Sci* 101: 1610- 1617.
35. Jasani B, Navabi H, Adams M (2009): Ampligen: A potential toll-like 3 receptor adjuvant for immunotherapy of cancer. *Vaccine* 27: 3401-3404.
36. de Bouteiller O, Merck E, Hasan UA, Hubac S, Benguigui B, Trinchieri G, Bates EE, Caux C (2005): Recognition of double-stranded RNA by human toll-like receptor 3 and downstream receptor signaling requires multimerization and an acidic pH. *J Biol Chem* 280: 38133-38145.
37. Fredericksen BL, Wei BL, Yao J, Luo T, Garcia JV (2002): Inhibition of endosomal/lysosomal degradation increases the infectivity of human immunodeficiency virus. *J Virol* 76: 11440-11446.
38. Houghton PJ (1999) In: Jackman AL (ur) Antifolate drugs in cancer therapy. Human Press, Totawa; 423-437.
39. IARC (2010): International Agency for Research on Cancer. IARC TP53 Database, <http://www-p53.iarc.fr/>; pristupljeno 20. 10. 2010.