# Otpornost na vinkristin prate promjene u ekspresiji integrina i djelotvornosti transdukcije adenovirusa

**Buger, Tvrtko**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2012**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:893890

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**




*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb









**Sveučilište u Zagrebu**
**Prirodoslovno-matematički fakultet**
**Biološki odsjek**

**Tvrtko Buger**

# Otpornost na vinkristin prate promjene u ekspresiji integrina i djelotvornosti transdukcije adenovirusa

**Diplomski rad**

**Zagreb, 2012.**

Ovaj rad izrađen u Laboratoriju za genotoksične agense, Zavoda za Molekularnu biologiju, Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Andreje Ambriović Ristov, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer ekologija.

*Iskreno zahvaljujem mentorici dr. sc. Andreji Ambriović Ristov na stručnim savjetima, pomoći i beskrajnom strpljenju i povjerenju tijekom izrade ovog rada.*

*Posebno zahvaljujem dr. sc. Dragomiri Majhen na stručnoj pomoći i potpori tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem svim članovima Laboratorija za genotoksične agense na pomoći i korisnim savjetima, susretljivosti i odgovorima na brojna pitanja. Posebno veliko hvala gđi. Ljiljani Krajcar, na velikoj brizi, pomoći i podršci u radu.*

*Hvala mojoj obitelji na podršci, potpori i strpljenju koju su mi pružili tijekom cijelog studija.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno–matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

# OTPORNOST NA VINKRISTIN PRATE PROMJENE U EKSPRESIJI INTEGRINA I DJELOTVORNOSTI TRANSDUKCIJE ADENOVIRUSIMA

Tvrtko Buger
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Kemoterapija se koristi za liječenje tumora, ali često dolazi do razvoja otpornosti stanica tumora. Razvoj otpornosti tumorskih stanica na protutumorske lijekove može dovesti do promjena u ekspresiji receptora za adnovirus tipa 5 (Ad5), kao i do promjena u ekspresiji transgena unesenog s Ad5 vektorom. Istražili smo postoji li razlika u Ad5–posredovanoj ekspresiji transgena između stanica karcinoma grkljana čovjeka (HEp2) i stanica VK2 otpornih na vinkristin, nastalih od HEp2 stanica. Mjerili smo ekspresiju transgena divljeg tipa Ad5wtRSVβgal, Ad5Δ639RSVβgal s kratkim vlaknom koji ulazi u stanice neovisno o primarnom receptoru CAR (coxsackie i adenovirus receptor), te Ad5RGD4CRSVβgal preusmjerenog na $\alpha_v$-integrine. Zapazili smo 4,5 puta povećanu ekspresiju transgena unesenog pomoću Ad5wtRSVβgal i Ad5RGD4CRSVβgal unesenog transgena u VK2 u odnosu na HEp2 stanice, dok je za Ad5Δ639RSVβgal ta razlika bila 10 puta. Izmjerili smo razlike između HEp2 i VK2 stanica u ekspresiji Ad5 receptora na površini stanica, ali te razlike nisu odgovorne za primijećenu povećanu Ad5-posredovanu ekspresiju transgena u VK2 stanicama. Vezanje i intenalizacija Ad5wtRSVβgal je 25-30% odnosno 15-30% manje u VK2 nego u HEp2 stanicama. Konačno, Ad5wtCMVβgal koji se razlikuje od Ad5wtRSVβgal samo u promotoru pod kojim je transgen, je pokazao jednaku ekspresiju transgena u HEp2 i VK2 stanicama. Zaključili smo da je povećana Ad5wtRSVβgal-posredovana ekspresija trangena u VK2 stanicama posljedica povećane aktivnosti promotora RSV. Naši rezultati pokazuju: (i) otpornost na protutumorske lijekove može biti popraćena promjenama u aktivnosti promotora i (ii) pravilan izbor promotora može doprinijeti smanjenju doze vektora potrebne za postizanje terapijskog učinka tijekom genske terapije tumora.

53 stranice, 12 slika, 1 tablica, 86 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: otpornost, vinkristin, adenovirus, genska terapija tumora, transdukcija, ekspresija transgena

Voditelj: Dr. sc. Andreja Ambriović Ristov, viši znanstveni suradnik
Suvoditelj: Dr. sc. Mladen Krajačić, prof.
Ocjenitelji: Dr. sc. Andreja Ambriović Ristov, viši znanstveni suradnik
Dr. sc. Mladen Krajačić, prof.
Dr. sc. Željka Vidaković–Cifrek, doc.
Rad prihvaćen: 12.09.2012.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

# VINCRISTINE CELL RESISTANCE IS ACCOMPANIED BY CHANGES IN INTEGRINS EXPRESSION AND ADENOVIRUS TRANSDUCTION EFFICIENCY

Tvrtko Buger
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Chemotherapy is regularly used for cancer treatment but often results in the development of drug resistance. The development of drug resistance could lead to differential expression of Adenovirus type 5 (Ad5) receptors as well as to changes in the expression of the transgene from Ad5 vector. We investigated whether there are differences in Ad5–mediated transgene expression between human laryngeal carcinoma (HEp2) cells and corresponding, HEp2-derived, vincristine resistant cell line VK2. We measured the transgene expression from wild type Ad5wtRSVβgal, short fibered Ad5Δ639RSVβgal which infects cells independent of primary Ad5 receptor CAR (coxsackie and adenovirus receptor) and Ad5RGD4CRSVβgal retargeted to $\alpha_v$-integrins. We observed 4,5-fold increase in Ad5wtRSVβgal and Ad5RGD4CRSVβgal transgene expression in VK2 cells comparing to HEp2 cells, while for Ad5Δ639RSVβgal this difference was 10-fold. We found differences between HEp2 and VK2 cells in cell surface expression of Ad5 receptors but these changes were not responsible for observed increased Ad5-mediated transgene expression in VK2 in comparison to HEp2 cells. The Ad5wtRSVβgal attachment and internalisation was 25-30% and 15-30% lower in VK2 than in HEp2 cells, respectively. Finally, Ad5wtCMVβgal differing from Ad5wtRSVβgal ony in promoter that drives transgene expression, showed equal transgene expression in HEp2 and VK2 cells. We conclude that the increased Ad5wtRSVβgal-mediated transgene expression in the VK2 cells is due to the increased RSV promoter activity. Our results point out that (i) drug-resistance may be accompanied with an alteration in promoter activity and (ii) the proper choice of promoter could contribute to a decrease in the vector dose required to achieve a therapeutic effect during tumor gene therapy.

53 pages, 12 figures, 1 table, 86 references, orginal in: Croatian
Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: resistance, vincristine, Adenovirus, cancer gene therapy, transduction, transgene espression

Supervisor: Dr. Andreja Ambriović Ristov, Senior Research Associate
Cosupervisor: Dr. Mladen Krajačić, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Andreja Ambriović Ristov, Senior Research Associate
Dr. Mladen Krajačić, Assoc. Prof.
Dr. Željka Vidaković–Cifrek, Asst. Prof.

Thesis accepted: 12.09.2012.

# SADRŽAJ


**1. UVOD ..... 1**

**1.1. Tumori ..... 1**

1.1.1. Tumori glave i vrata ..... 1

1.1.2. Kemoterapija tumora glave i vrata ..... 1

1.1.3. Vinkristin ..... 2

1.1.3.1. Mehanizmi otpornosti tumora na vinkristin ..... 4

**1.2. Genska terapija ..... 5**

1.2.1. Genska terapija tumora ..... 5

1.2.2. Pristupi genskoj terapiji tumora ..... 5

**1.3. Adenovirusi ..... 6**

1.3.1. Struktura i genom Adenovirusa tip 5 ..... 7

1.3.2. Infekcija Adenovirusa tipa 5 ..... 9

1.3.3. Adenovirusi kao vektori za prijenos gena ..... 11

1.3.3.1. Replikacijski defektni adenovirusi ..... 11

1.3.3.2. Preusmjeravanje adenovirusa ..... 13

**2. CILJ ISTRAŽIVANJA ..... 15**

**3. MATERIJALI I METODE ..... 16**

**3.1. Materijali ..... 16**

3.1.1. Osnovne kemikalije ..... 16

3.1.2. Materijal za metodu PCR ..... 17

3.1.3. Kompleti ..... 17

3.1.4. Stanične linije ..... 17

3.1.5. Replikacijsko defektni adenovirusi ..... 18

3.1.6. Protutijela ..... 19

3.1.7. Ostali materijal ..... 19

3.1.8. Uređaji ..... 20

3.1.9. Priprema pufera i otopina ..... 21

**3.2. Metode ..... 21**

3.2.1. Uzgoj kultura stanica ..... 21

3.2.1.1. Smrzavanje stanica ..... 22
3.2.1.2. Odmrzavanje stanica ..... 22
3.2.2. Određivanje ekspresije Ad5–unesenog transgena β-galaktozidaze . 22
3.2.3. MTT test ..... 23
3.2.4. Određivanje količine vezanog Ad5wtRSVβgal na stanice HEp2 i VK2 ..... 24
3.2.5. Određivanje količine internaliziranog Ad5wtRSVβgal u HEp2 i VK2 stanice ..... 24
3.2.6. Protočna citometrija – FACS ..... 25
3.2.7. Statistička obrada podataka ..... 26

**4. REZULTATI ..... 27**
4.1. Stanice VK2 pokazuju stabilnu otpornost na vinkristin u usporedbi s roditeljskim stanicama HEp2 ..... 27
4.2. Promjene u ekspresiji molekula uključenih u transdukciju divljim tipom Ad5 na površini HEp2 i VK2 stanica ..... 28
4.3. Stanice VK2, u odnosu na roditeljske HEp2 stanice, pokazuju povećanu ekspresiju Ad5-unesenog transgena β-galaktozidaze ..... 30
4.4. Na VK2 stanice se veže 25–30% manje Ad5wtRSVβgal nego na HEp2 stanice ..... 32
4.5. U stanice VK2 ulazi 15–30% manje Ad5wtRSVβgal DNA nego u HEp2 stanice ..... 34
4.6. Stanice HEp2 i VK2 pokazuju jednaku ekspresiju Ad5wtCMVβgal-unesenog transgena β-galaktozidaze ..... 35

**5. RASPRAVA ..... 37**

**6. ZAKLJUČAK ..... 42**

**7. LITERATURA ..... 43**

**8. ŽIVOTOPIS ..... 55**

# 1. UVOD

## 1.1. Tumori

Tumor je naziv za bilo koju nakupinu stanica koja se nekontrolirano dijeli (Alberts i sur. 2002). Neki tumori nastaju zbog nasljednih mutacija, no većina ih nastaje zbog utjecaja karcinogenih tvari iz okoliša (kemijski, fizikalni ili virusni agensi) ili grešaka u kopiranju i popravku gena u tjelesnim stanicama. Osnovno obilježje tumorskih stanica je gubitak kontrole rasta i diobe. Često je to posljedica mutacija gena odgovornih za kontrolu staničnog ciklusa, što sprječava zaustavljanje stanica u G1 fazi i dovodi do gomilanja stanica, koje u sebi nose promjene, razne kromosomske aberacije i mutacije (Kralj i sur. 2003).

### 1.1.1. Tumori glave i vrata

Tumori glave i vrata su relativno česti, a broj im je u porastu zbog današnjeg načina života, prvenstveno konzumacije alkohola i pušenja. Najčešće se liječe kirurškim uklanjanjem ili radioterapijom, a često i kombinacijom ova dva pristupa. Kemoterapija se u tumorima glave i vrata uglavnom koristi nakon operativnog zahvata, samostalno ili u kombinaciji s radioterapijom. Specifičnost tumora u ovom području je blizina osjetljivih dijelova tijela. Tumori vrata se nalaze blizu velikih krvnih žila odgovornih za opskrbljivanje glave krvlju, čime ugrožavaju opskrbu mozga krvlju ili prijete prodiranjem i trganjem krvnih žila. Osim toga, na malom se području nalaze i osjetljive strukture dišnog i probavnog sustava, tkiva osjeta i mozak. U stražnjem se dijelu vrata nalazi kralješnica s leđnom moždinom, koja je vrlo osjetljiva na visoke doze zračenja (Ganly i Kaye 2000).

### 1.1.2. Kemoterapija tumora glave i vrata

Kemoterapija tumora glave i vrata može uključivati jedan citostatik npr. metotreksat ili kombinaciju više citostatika, npr. cisplatina-5-fluorouracil. Terapija kombinacijom više citostatika povećava ukupni odgovor na terapiju za 30–40%, u usporedbi s terapijom jednim citostatikom čiji odgovor na terapiju iznosi 10–20%. No preživljenje je u oba slučaja jednako (srednje preživljenje tijekom 6 mjeseci). U

kliničkom pokusu, kojeg je provela Europska udruga za istraživanje i terapiju tumora EORTC (engl. *European Organisation for Research and Treatment of Cancer*), 382 pacijenta s ponovljenim metastaziranim tumorom glave i vrata, koji do tada nisu primali kemoterapiju, tretirano je kombinacijom CABO (cisplatina, metotreksat, bleomicin i vinkristin), kombinacijom cisplatine i fluorouracila ili zasebno cisplatinom ili fluorouracilom. Najbolji odgovor na kemoterapiju je zabilježen s CABO (34%) i kombinacijom cisplatina-fluorouracil (31%), što je bilo bolje od odgovora zabilježenog samo terapijom s cisplatinom (15%). Međutim, ponovno nije bilo razlike u preživljenju pacijenata u periodu od 6 mjeseci u kojima nije došlo do progresije bolesti (engl. *progression free survival*) i ukupnom preživljenju između spomenutih tretmana (Ganly i Kaye 2000).

Svi spomenuti kemoterapeutici za liječenje tumora glave i vrata djeluju neselektivno, odnosno koče proliferaciju svih stanica u tijelu koje brzo proliferiraju, čime uzrokuju neugodne nuspojave. Nedostatak kemoterapeutika je u tome, što tumorske stanice mogu razviti otpornost i time onemogućiti daljnju primjenu istog kemoterapeutika. Prema tome, neophodno je razviti nove pristupe liječenju tumora. Jedan od novih pristupa liječenju tumora je i genska terapija. Kao i svaki novi pristup liječenju, za očekivati je kako će genska terapija biti prvo korištena u pacijentima kod kojih je došlo do recidiva, odnosno kod pacijenata koji su prethodno bili liječeni kemoterapeuticima i kod kojih je moglo doći do razvoja otpornosti na neki od prethodno upotrijebljenih citostatika (Ganly i Kaye 2000).

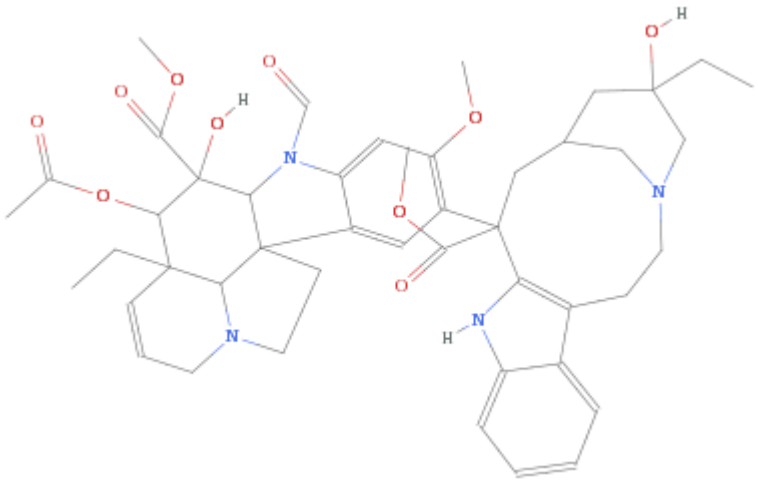
### 1.1.3. Vinkristin

Vinkristin je spoj izdvojen iz lišća zimzelene biljke *Catharanthus roseus* (slika 1), koja raste na Madagaskaru. *Catharanthus roseus* je zimzelena trajnica koja naraste do 80 cm visine. Cvjetovi su lako prepoznatljivi, imaju 5 latica, ružičaste boje, međutim postoje i sorte crvenih, bijelih i ljubičastih boja. Kroz povijest, biljka se koristila za cijeli niz bolesti, zbog svojih ljekovitih svojstava (npr. na Havajima se koristila za zaustavljanje krvarenja, u srednjoj Americi za ublažavanje tegoba s grlom i disanjem i sl.) (Nayak i Pinto Pereira 2006).



**Slika 1.** *Catharanthus roseus* (preuzeto s www.ntbg.org)

Vinkristin (slika 2.) je spoj ($C_{46}H_{56}N_4O_{10}$), dimerični alkaloid molarne mase 824,958 g/mol, netopljiv je u vodi.



**Slika 2.** Molekula vinkristina ($C_{46}H_{56}N_4O_{10}$)

Vinkristin se upotrebljava sam ili u kombinaciji s drugim citostaticima u liječenju niza tumorskih bolesti, kao što su akutna limfoblastična leukemija, sarkom, Wilmsov tumor, limfom, neuroblastom, tumor dojke, tumor pluća, a kao što je prethodno rečeno i u terapiji tumora glave i vrata. Koristi se više od 50 godina, a daje se intravenozno (Noble 1990, Gidding i sur. 1999). Od nuspojava najvažnije je spomenuti neurotoksičnost. Vinkristin se akumulira u stanicama, pa omjer unutarstanične i izvanstanične koncentracije može biti vrlo visok (Gidding i sur. 1999).

Vinkristin uzrokuje depolimerizaciju mikrotubula, koji predstavljaju važne dijelove citoskeleta u stanici. Mikrotubuli se sastoje od heterodimera α i β tubulina i uključeni su u regulaciju proliferacije, diferencijacije i programirane stanične smrti, odnosno apoptoze u stanici. Sastoje se od 13 paralelnih protofilamenata. Podjedinice α i β tubulina postoje u nekoliko izoformi i podliježu različitim posttranslacijskim modifikacijama. Mikrotubuli se nalaze u stanju dinamičke nestabilnosti i ravnoteže, stalno se polimeriziraju i depolimeriziraju. Vinkristin u najnižoj učinkovitoj koncentraciji inhibira funkciju mikrotubula time što inhibira dinamiku dodavanja i gubitka tubulina na krajevima mikrotubula i na taj način stabilizira dužinu mikrotubula. To ima antimitotički učinak i uzrokuje zastoj u metafazi mitoze. Dinamika mikrotubula odgovorna je za prijelaz stanice iz metafaze u anafazu mitoze (Jordan i sur. 1991, Gidding i sur. 1999).

#### 1.1.3.1. Mehanizmi otpornosti tumora na vinkristin

Do danas je otkriveno više mehanizama otpornosti tumorskih stanica na vinkristin koji mogu biti istovremeno prisutni, a najčešća dva su:

- MDR fenotip (engl. *multidrug resistant phenotype*, fenotip za koji se vjeruje kako je glavni uzrok otpornosti malignih hematoloških bolesti na lijekove) može nastati zbog povećane aktivnosti membranskog P-glikoproteina (Pgp, 180 kDa) ili nekog drugog od 10 poznatih članova obitelji ABC (engl. *ATP-binding cassette*) transportnih proteina (Kvackajova-Kisucka i sur. 2001). To su energetski ovisne pumpe koje izbacuju vinkristin iz stanice. Stanice s MDR fenotipom pokazuju križnu otpornost na druge citostatike prirodnog porijekla i neke njihove polusintetske derivate kao što su Vinca alkaloidi, aktinomicin D, antraciklini (doksorubicin, daunorubicin), epipodofilotoksini, taksani i kolhicin (Gidding i sur. 1999).
- Mutacije u $\alpha$ i $\beta$ tubulinima koje uzrokuju povećanu stabilnost mikrotubula smanjenjem afiniteta za vezanje vinkristina ili narušavanjem ravnoteže između slobodnog i polimeriziranog tubulina (Gidding i sur. 1999).

U kliničkom liječenju se za dokidanje otpornosti tumora na vinkristin najčešće primjenjuju modulatori verapamil i ciklosporin A koji inhibiraju P-glikoprotein (Gidding i sur. 1999).

## 1.2. Genska terapija

Koncept genske terapije temeljen je na ideji kako se određena bolest, koja je posljedica jednog nefunkcionalnog gena, može izliječiti ubacivanjem i ekspresijom funkcionalne kopije tog gena u stanicu. Iako je ideja genske terapije bila liječiti monogenske bolesti, brzo je došlo do razvoja genske terapije sa svrhom liječenja krvožilnih i neurodegenerativnih bolesti, vakcinacije i konačno razvoja genske terapije tumora (Anderson 1998). Stoga se genska terapija definira kao prijenos genskog materijala u stanicu s ciljem postizanja terapijskog učinka, bilo korekcijom prisutnog poremećaja ili unosom u stanicu neke nove funkcije.

### 1.2.1. Genska terapija tumora

Genska terapija tumora se pojavila kao pokušaj prevladavanja nedostataka klasične terapije, odnosno kirurgije, kemoterapije i zračenja. Nedostaci klasične terapije tumora proizlaze iz karakteristika samih tumorskih stanica. Neki tumori teško su dostupni ili se dijagnosticiraju u poodmakloj fazi bolesti, nakon što je već došlo do formiranja metastaza, čime operativni pristup postaje neučinkovit. Tumori su izrazito heterogeni i genski vrlo nestabilni. Posljedica toga je razvoj otpornosti na spojeve koji se koriste u liječenju tumora (Lonning 2004).

### 1.2.2. Pristupi genskoj terapiji tumora

Dva su osnovna načina unošenja genskog materijala u ciljnu stanicu, a to su nevirusni i virusni. Nevirusni prijenos gena podrazumijeva prijenos plazmidne DNA (koju možemo zvati i nevirusnim vektorom, vektor = prenositelj genskog materijala) u stanicu uz pomoć kemijskih i fizikalnih metoda. Djelotvornost nevirusnog unosa je značajno manja od virusnog, a posljedica je prvenstveno postojanja brojnih

prepreka na koje strana DNA nailazi na putu od mjesta primjene do jezgre ciljne stanice (Wiethoff i Middaugh 2003).

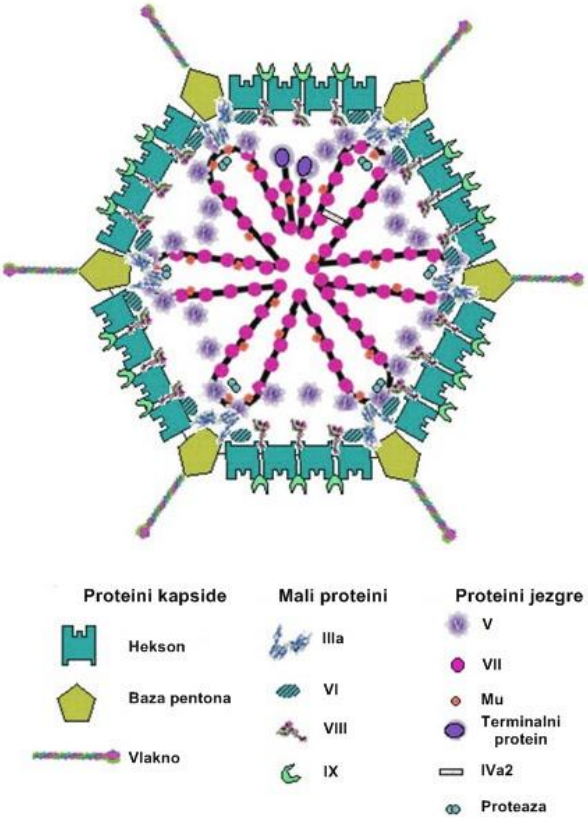
U slučaju, kada se za prijenos gena koriste virusi, tada govorimo o virusnom prijenosu gena, a viruse koji se pri tome upotrebljavaju nazivamo virusnim vektorima. Virusi su prirodno nastali, učinkoviti prenositelji genskog materijala (DNA ili RNA) u stanicu domaćina. Virusni vektori koji se koriste u laboratoriju i u kliničkim pokusima temelje se na RNA ili DNA virusima. Istovremeno, neke od prednosti virusnih vektora mogu biti i njihovi nedostaci, pa virusni vektori koji se ugrađuju u genom ciljne stanice omogućuju produljenu ekspresiju unesenog gena, no u isto vrijeme ta ugradnja predstavlja opasnost zbog mogućnosti insercijske mutageneze (Majhen i Ambriović-Ristov 2006).

Približno 24% kliničkih ispitivanja u genskoj terapiji danas kao vektore koristi adenoviruse i većina njih je usmjerena na terapiju tumora (Wiley Database, 2012; http://wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/).

## 1.3. Adenovirusi

Adenovirusi su prvi puta opisani polovinom 20. stoljeća (Slika 3), a od tada se intenzivno istražuju. Njihov genom čini dvolančana DNA, nemaju ovojnice, a pripadaju u porodicu *Adenoviridae*. U prirodi nalazimo 51 tip ljudskih adenovirusa, a podijeljeni su u 6 grupa (A-F), dok se grupa B dijeli u podgrupe B1 i B2. Adenovirusi iz podgrupe B1, te grupe C i E, uglavnom uzrokuju infekcije dišnog sustava, grupe B, D i E infekcije oka, grupe A i F infekcije probavnog sustava, dok podgrupa B2 inficira bubrege i mokraćne putove (Russell 2000).

Adenovirus tip 5 (Ad5) iz grupe C najčešće se koristi kao temelj za konstrukciju vektora za gensku terapiju.




**Slika 3.** Struktura adenovirusne čestice (preuzeto iz Russell 2009)

### 1.3.1. Struktura i genom Adenovirusa tip 5

Virioni Ad5 su promjera 70 – 90 nm, bez ovojnice i pravilnog ikozaedarskog oblika. Genom im čini linearna dvolančana DNA molekula, veličine otprilike 35 kb (Sugarman i sur. 2003), što ih smješta u skupinu srednje velikih među DNA virusima. Genom na svojim krajevima ima obrnuto ponavljajuće sljedove (engl. *inverted terminal repeat, ITR*) veličine 103 para baza, što vrijedi i za ostale adenoviruse tipa 5 (Wold 1999), a na 5' krajevima vezan je terminalni protein koji služi kao početnica (Davison 2003). U jezgri se, osim molekule DNA, nalaze i proteini pV, pVI, Mu te protein pVII, koji je sličan histonima. Genom se sastoji od šest ranih (E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4), jedne kasne transkripcijske jedinice i četiri intermedijarne transkripcijske jedinice (IVa2, IX, VAI, VAII). Nakon ulaska virusa u stanicu, te virusne DNA u jezgru, prvo započinje transkripcija gena rane E1A transkripcijske jedinice. Proteini, koji nastaju, glavni su regulatori transkripcije, ali imaju i sposobnost transaktivacije ostalih adenovirusnih gena. Proteini nastali

transkripcijom gena E1B transkripcijske jedinice sudjeluju u kočenju apoptoze. E2 transkripcijske jedinica adenovirusnog genoma sadrži gene za proteine koji sudjeluju u DNA replikaciji (DNA polimeraza, DNA vezujući protein i terminalni protein). E3 transkripcijska jedinica genoma sadrži gene koji kodiraju proteine koji omogućavaju adenovirusnoj čestici izbjegavanje staničnog odgovora na infekciju. E4 transkripcijske jedinica sastoji se od gena koji kodiraju proteine koji imaju utjecaj na transkripciju, transport mRNA te modulaciju DNA replikacije i apoptoze. Geni kasne transkripcijske jedinice su geni koji se prepisuju s glavnog kasnog promotora (MPL, engl. *major late promoter*), a kodiraju strukturne proteine kapside (Majhen i Ambriović-Ristov 2006).

Kapsida adenovirusa se sastoji od 252 kapsomere, od toga su 240 heksoni i 12 pentoni. Kapsida sadrži i proteine pIIIa, pVI, pVIII i pIX. Na svakom od 12 vrhova ikozaedra nalazi se baza pentona okružena s 5 heksona, koji ujedno predstavljaju i središta nakupljanja proteina, a s obzirom na njihovu količinu i izloženost, određuju antigenska svojstva virusa. Iz središta baze pentona strši vlakno slično anteni (engl. *fiber*) (Rux i Burnett 2004).

Kapsomere heksoni su pseudoheksagonalni trimeri smješteni na 20 ploha ikozaedarske kapside. Kapsida sadrži 240 heksona, koji su zbog različitog razmještaja podijeljeni u 4 vrste (H1, H2, H3 i H4). 60 H1 heksona povezuje se s pentonima u 12 vrhova i nazivaju se i peripentonalnim heksonima. Ostali heksoni su označeni u grupama od devet (engl. *groups of nine, GONs*) na 20 stranica ikozaedra, i dalje se definiraju kao H2 (na dvostrukoj osi), H3 (na trostrukoj osi) i ostatak je označen kao H4 (Russell 2009).

Kapsomere pentoni su kovalentno vezani kompleksi dva proteina, homopentamerne baze pentona i homotrimernog proteina vlakna koje strši iz 12 vrhova ikozaedra (Russell 2009).

Vlakno se dijeli na tri, strukturno i funkcionalno različite domene:

- N kraj proteina kojim je vlakno nekovalentno vezano za bazu pentona,
- C kraj proteina koji se omata u globularnu domenu nazvanu glava (engl. *head* ili *knob*) odgovornu za vezanje virusa na *coxsackie adenovirus receptor* (CAR),

- središnji dio vlakna, držak (engl. *shaft*), koji udaljava glavu vlakna od površine viriona i koji je kod Ad5 sastavljen od 22 pseudoponavljajuća motiva (Shayakhmetov i sur. 2000).

Protein vlakna je trimer, a glava vlakna ima oblik trokrilnog propelera (Xia i sur. 1994).

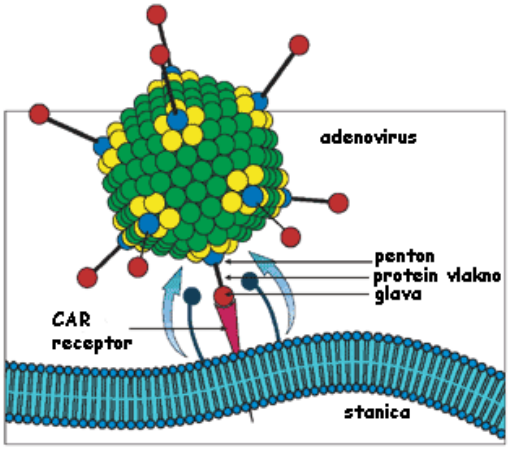



**Slika 4.** Protein vlakna (preuzeto: Majhen, Ambriović–Ristov 2006)

Adenovirusi, za razliku od stanica, ne sadrže membrane niti lipide pa su stabilni u otapalima poput etera i etanola.

### 1.3.2. Infekcija Adenovirusa tipa 5

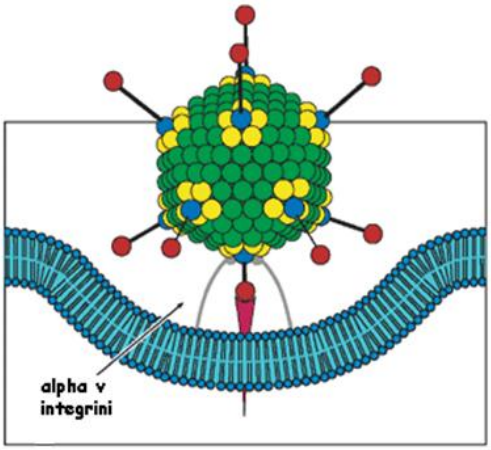
Infekcija Ad5 započinje vezanjem glave vlakna na protein na površini stanice, koji se zbog uloge u infekciji dvama virusima naziva *coxsackie – adenovirus receptor* (CAR) (Bergelson i sur. 1997, Tomko i sur. 1997, Roelvink i sur. 1999).




**Slika 5.** Vezanje adenovirusa na površinu stanice
(preuzeto: http://www.krackeler.com/products/fid/2862)

Nakon uspostave interakcije vlakno – CAR, dolazi do savijanja drška vlakna što omogućuje interakciju između RGD (arginin – glicin – asparaginska kiselina) slijeda u bazi pentona i integrina na površini stanice, što omogućuje internalizaciju virusa u stanice (Wickham i sur. 1993, Stewart i sur. 1997, Nemerow i Stewart 1999, Meier i sur. 2002). Povezivanje glave vlakna s molekulom CAR, visokog je afiniteta u usporedbi s interakcijom baze pentona s integrinima (Majhen i Ambriović–Ristov 2006).

Integrini se nalaze na površini stanice i vežu se na proteine izvanstaničnog matriksa, ali i za druge stanice. Vezanje integrina pokreće niz unutarstaničnih signalnih putova. Imaju ključnu ulogu u imunološkom odgovoru, homeostazi, razvoju organizma, ali i nastanku tumora (Hynes 2002). Do sad je poznato 18 $\alpha$ i 8 $\beta$ podjedinica, te njihovim kombinacijama nastaje 24 različitih heterodimera integrina (Barczyk 2009). Integrini $\alpha_v$ sudjeluju u vezanju različitih proteina izvanstaničnog matriksa na površinu stanice, primjerice, fibronektina, vitronektina, fibrinogena, koji sadrže RGD motiv.




**Slika 6.** Internalizacija adenovirusa u stanicu
(preuzeto: http://www.krackeler.com/products/fid/2862)

Interakcija Ad5 pentona i integrina $\alpha_v$ aktivira niz signalnih molekula koje pokreću reorganizaciju mikrotubula citoskeleta čime započinje internalizacija adenovirusa (Russell 2009). U većini slučajeva radi se o klatrinom posredovanoj endocitozi (Meier i Greber 2004), iako postoji mogućnost da adenovirus koristi i neke ne-klatrin posredovane putove endocitoze kao na primjer endocitozu posredovanu masnim uklopinama (engl. *lipid rafts*) (Ashbourne i sur. 2003). Istodobno s ulaskom

adenovirusa u stanicu, dolazi do poticanja makropinocitoze koja nije toliko važna za ulazak adenovirusa u stanicu koliko za oslobađanje virusne čestice iz endosoma u citoplazmu. U oslobađanje Ad5 iz endosoma uključen je i integrin $\alpha_v\beta_5$ (Majhen i sur. 2009, Wickham i sur. 1993). Adenovirus se oslobađa iz endosoma, veže se na mikrotubule u citoplazmi stanice, te nastavlja putovanje prema jezgri, u koju ulazi prolazeći kroz kompleks jezgrinih pora (Meier i Greber 2004).

Adenovirusi inficiraju više vrsta stanica koje eksprimiraju CAR (npr. stanice srca, gušterače, testisa i prostate). Ukoliko stanice imaju slabu ili skoro odsutnu ekspresiju CAR, stanice se teško inficiraju (npr. endotelne stanice, stanice glatkih i skeletnih mišića, moždane stanice, diferencirane stanice epitela dišnog sustava, hematopoetske stanice, dendritične stanice). Raspodjela CAR ne mora biti jednaka unutar nekog tkiva, npr. CAR se nalazi na bazolateralnoj strani stanica epitela dišnog sustava. Zanimljivo je da barijeru adenovirusima predstavlja i prisutnost glikokaliksa na apikalnoj strani tih stanica (Russell 2009).

Povećanom ekpresijom CAR receptora, povećava se Ad5 transdukcija. Ekspresija CAR se može mijenjati i različitim agensima, a među ostalima i citostaticima kao što je cisplatina (Hemminki 2003).

### 1.3.3. Adenovirusi kao vektori za prijenos gena

Adenovirusne vektore za prijenos gena možemo podijeliti u četiri generacije, a svaka slijedeća ima sve manji broj adenovirusnih gena.

#### 1.3.3.1. Replikacijski defektni adenovirusi

Prva generacija adenovirusnih vektora ima uklonjeno E1 područje genoma čime se onemogućila replikacija virusa, te je tako dobiven replikacijski defektan adenovirus. Često je uklonjeno i E3 područje virusnog genoma koje nije esencijalno za replikaciju, ali je ujedno stvoreno i mjesto za ugradnju do 7,5 kb strane DNA. Replikacijski defektni adenovirusi umnažaju se u stanicama bubrega embrija čovjeka (engl. *Human Embryonic Kidney 293 cells*, HEK-293) koje *in trans* eksprimiraju gene E1 regije. Međutim, adenovirusi prve generacije imaju i

nedostatak, zato što nemaju potpuno zaustavljenu transkripciju preostalih virusnih gena, što uzrokuje imunološki odgovor domaćina. Većina ljudske populacije je, u određenom dijelu svojeg života, bila zaražena adenovirusima, te ljudi u organizmu već imaju specifična protutijela za adenoviruse koja sprečavaju uspješan ponovljeni unos adenovirusa (Amalfitano i sur. 1998, Lusky i sur. 1999, Schiedner i sur. 1998).

Slijedeće generacije adenovirusnih vektora nastale su izbacivanjem dodatnih gena iz adenovirusnog genoma. Time se oslobađa više mjesta za ugradnju strane DNA, no istovremeno se pojavljuje potreba za stanicama koje komplementiraju uneseni nedostatak. U drugoj i trećoj generaciji vektora, izbačeni su osim E1, E2 i E4 geni, čime se smanjuje imunogeničnost vektora. Prednost ovih vektora je i smanjena toksičnost i produljena *in vivo* ekspresija gena koje unose (Majhen i Ambriović-Ristov 2006).

Četvrta generacija vektora (engl. „*high capacity*“ ili „*gutless*“ vektori) ima uklonjene sve adenovirusne gene koji kodiraju proteine. Ovi vektori imaju samo ITR sljedove i pakirajući signal, a mogu ugraditi i do 37 kb strane DNA. Međutim, kako bi ih se umnožilo, potrebno je koristiti pomoćničke viruse i odgovarajuće komplemetirajuće stanice. Tijekom pripreme ovih vektora, bitno je odvojiti sve pomoćničke viruse od samih vektora što produljuje vrijeme trajanja procesa, ali i smanjuje količinu dobivenog vektora (Majhen i Ambriović-Ristov 2006).

Adenovirusi, nakon ulaska u stanice, ostaju episomalno i ne ugrađuju se u genom domaćina, pa nema opasnosti od insercijske mutageneze (Lieber i sur. 1999). Adenovirusni vektori omogućuju samo prolaznu ekspresiju unesenog gena, a to ne predstavlja problem u genskoj terapiji tumora, kojoj je cilj ubiti stanicu, pa je i kratak period ekspresije unesenog gena dovoljan za postizanje zadanog cilja.

### 1.3.3.2. Preusmjeravanje adenovirusa

Djelotvornost infekcije (odnosno transdukcije, kada se govori o adenovirusnim vektorima) najviše ovisi o ekspresiji CAR na površini stanice (o čemu je već bilo govora u poglavlju 1.3.2. Infekcija Ad5).

Važnu ulogu u biodistribuciji adenovirusa ima protok krvi i struktura krvožilnog sustava. Kupfferove stanice jetre imaju veliki kapacitet uklanjanja i degradacije adenovirusa iz krvotoka, pa dolazi do nakupljanja virusnih čestica u jetri, ali i slezeni, srcu, plućima, bubrezima, iako ta tkiva ne moraju imati najveću ekspresiju CAR receptora (Smith i sur. 2002, Martin i sur. 2003, Schiedner i sur. 2003).

S obzirom kako transdukcija tumorskih stanica prvenstveno ovisi o ekspresiji CAR, povećanje njegove ekspresije bi moglo imati pozitivan učinak na transdukciju, ali i na ishod genske terapije adenovirusnim vektorima (Majhen i Ambriović-Ristov 2006).

Preusmjeravanje adenovirusnih vektora može biti transdukcijsko ili transkripcijsko. Transdukcijskim preusmjeravanjem pokušava se povećati transdukcija željenog tipa stanica. Najbolja strategija je dokinuti ovisnost o CAR receptorima i u isto vrijeme omogućiti vezanje adenovirusa na novi receptor koji je dobro eksprimiran na ciljnim stanicama (Einfeld i sur. 2001). Dva su načina transdukcijskog ciljanja adenovirusa: gensko (jednokomponentno) i fizičko ciljanje (dvokomponentno). Gensko ciljanje predstavlja postupak genske modifikacije adenovirusa, gdje se unosi novi ligand koji će prepoznati novi receptor, a istovremeno može onemogućiti vezanje na CAR. Za ovaj pristup, u genskoj terapiji tumora, potrebno je pronaći specifične receptore ili eksprimirane molekule karakteristične isključivo za ciljne tumorske stanice. To se može ostvariti metodom otkrivanje faga (engl. *phage display*) kojom se bira fag iz kolekcije faga, koji na površini ekprimiraju slučajne kratke peptidne sljedove, koji se vežu na neku izdvojenu molekulu (Pasqalini i sur. 2002). Rezultat ovakvog odabira je slijed koji se specifično veže na tu molekulu. Metoda se može koristiti i za molekule koje se nalaze na površini ciljnih stanica. Na ovaj način, mogu se odabrati peptidni sljedovi *in vitro* (Nicklin i sur. 2000) i *in vivo* (Arap i sur. 1998). Tako odabrani sljedovi mogu se ugraditi u jedan od adenovirusnih kapsidnih proteina, te ako pri tome zadrže sposobnost vezanja na molekulu na kojoj su odabrani, preusmjeriti vezanje

adenovirusa na tu molekulu (Nicklin i sur. 2001, Majhen i sur. 2006). Adenovirusi imaju mjesto koje je vrlo pogodno za genske promjene, a to je HI-petlja proteina vlakna. Ugradnja sljedova do 100 aminokiselina, koji su sadržavali RGD peptid, omogućila je vezanje RGD slijeda i integrina na površini stanice, a pri tome se nije narušila trodimenzionalna struktura proteina i njegova trimerizacija (Krasnykh 1998). HI-petlja se nalazi na površini glave vlakna, posjeduje određeni stupanj fleksibilnosti i nema ulogu u intramolekularnim interakcijama koje mogu utjecati na stabilnost proteina vlakna (Krasnykh 2000).

Transkripcijsko ciljanje omogućava transkripciju, odnosno ekspresiju u željenom tipu stanica, pri čemu se ne mijenja tropizam adenovirusa već se samo ograničava ekpresija unesenog gena u stanicu. Postiže se stavljanjem odabranog gena pod kontrolu tumor specifičnog promotora (Robson i sur. 2003). Međutim, malo je do sada poznatih tumor specifičnih promotora, a neki od njih koji su inače vrlo specifični u svojoj prirodnoj lokaciji, mogu izgubiti specifičnost dok su unutar adenovirusnog genoma. Primjer za to je gubitak mišićne specifičnosti desminskog promotora zbog pojačivača E1 gena smještenog uzvodno i isprepletenog sa signalom za pakiranje (Ambriović i sur. 1997).

Osim transkripcijskog ciljanja, postoji i fizičko ciljanje koje predstavlja metodu vezanja adenovirusnih čestica s bispecifičnom molekulom koja s jedne strane ima specifičnost za protein vlakna i blokira vezanje na CAR receptor, dok s druge strane ima specifičnost prema nekoj molekuli i preusmjerava transdukciju adenovirusnog vektora preko te molekule. Prednost ove metode je postojanje velikog broja protutijela i liganada koji se mogu upotrijebiti za stvaranje bispecifične molekule. Međutim, fizičko preusmjeravanje je zbog složenije farmakodinamike i kinetike dvokomponentnog preusmjeravanja nešto kompliciranije za izvedbu, pa se čini kako će gensko ciljanje biti lakše primjenjivo u genskoj terapiji tumora (van Beusechem i sur. 2000, Hong i sur. 2003, Krasnykh i sur. 2001).

# 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Kemoterapija je liječenje tumora citotoksičnim lijekovima (citostaticima), te predstavlja jedan od načina liječenja malignih tumora. Međutim, stanice tumora, nakon izlaganja nekom citostatiku, često na njega postaju otporne. Razvoj otpornosti tumorskih stanica prestavlja vrlo važno ograničenje u terapiji tumora. Stoga se razvijaju novi pristupi liječenju tumora, kao što je na primjer genska terapija. Najčešće korišten vektor za gensku terapiju tumora je adenovirus tipa 5 (http://wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/; Wiley Database, 2012). Usporedbom djelotvornosti transdukcije Ad5 i/ili ekspresije Ad5-unesenog transgena, u literaturi nalazimo nekoliko primjera kako stanice otporne na citostatike pokazuju povećanu djelotvornost transdukcije i/ili povećanu ekspresiju transgena u usporedbi s roditeljskim stanicama (Ambriović-Ristov i sur. 2004, Egami i sur. 2009, Shirakava i sur. 2001).

Cilj ovog diplomskog rada je na modelu stanica karcinoma grkljana čovjeka HEp2 te stanica otpornih na vinkristin VK2 koje su nastale izlaganjem HEp2 stanica vinkristinu, istražiti uzrok povećane ekspresije Ad5-unesenog transgena u VK2 stanice s obzirom na roditeljske stanice HEp2.

# 3. MATERIJALI I METODE

## 3.1. Materijali

### 3.1.1. Osnovne kemikalije

- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid (MTT, Sigma)
- Agaroza (Serva, Njemačka)
- Deionizirana voda (di$H_2O$)
- DMSO (dimetilsulfoksid) (Kemika, Hrvatska)
- Dulbeccova modifikacija Eaglove hranjive podloge (engl. *Dubbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM) (Invitrogen, Njemačka)
- EDTA (etilendiaminotetraoctena kiselina) (Kemika, Hrvatska)
- Etidijev bromid (Serva, Njemačka)
- Etilni alkohol (Kemika, Hrvatska)
- Glicerol (Kemika, Hrvatska)
- Glutaraldehid 24% (Sigma, Njemačka)
- K-fericijanid (Sigma, Njemačka)
- K-ferocijanid (Sigma, Njemačka)
- $MgCl_2$ (Kemika, Hrvatska)
- Orange G (Merck, Njemačka)
- Serum goveda (Invitrogen, Njemačka)
- Tripsin (Invitrogen, Njemačka)
- Vinkristin (Oncovin, SAD)
- X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-beta-D-galaktopiranozid) (Sigma, Njemačka)

### 3.1.2. Materijal za metodu PCR

Početnice korištene za lančanu reakciju polimeraze u ovom radu su:

- pHIloopU (5'GTA ACA TTG TCA AAG TTT AC3') (Dmitriev 1998),
- pHIloopD (5'GAT GTG GCA AAT ATT TCA TTA ARG3') (Dmitriev 1998),
- TaqDNA-polimeraza (Fermentas, Litva),
- Pufer za reakciju PCR dolazi s TaqDNA polimerazom (Fermentas, Litva),
- $MgCl_2$ dolazi s TaqDNA polimerazom (Fermentas, Litva),
- 100 mM dNTP (deoksiribonukleotid-trifosfati) (Fermentas, Litva) se miješaju tako da je svaki od četiri nukleotida (dATP, dCTP, dGTP i dTTP) 25 mM.

### 3.1.3. Kompleti

U radu je korišten komplet reagensa DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, za izdvajanje ukupne DNA iz stanica.

### 3.1.4. Stanične linije

U ovom su radu korištene stanice karcinoma grkljana čovjeka (engl. *Human Laryngeal Carcinoma Cells*, HEp2) (Invitrogen, USA) i stanice otporne na vinkristin, VK2. Stanice VK2 dobivene su višestrukim izlaganjem HEp2 stanica vinkristinu koncentracije 0,05 μM tijekom 24 sata. Nakon prvog tretmana, stanice su ostavljene da se oporave, te je za slijedeće izlaganje upotrijebljena veća količina vinkristina. Postupak je ponovljen više puta, sve do koncentracije 0,4 μM. Stanice su zatim klonirane te je izdvojen klon VK2 (Osmak, 1992). Stanice HEp2 i VK2 su uzgajane kao jednoslojna kultura u hranjivoj podlozi DMEM uz dodatak 10% seruma goveda (engl. *Bovine serum,* BS), DMEM-BS, pri 37°C u vlagom zasićenoj atmosferi s 5% $CO_2$.

Prije korištenja VK2 stanične linije u ovom radu, stanice su ponovo klonirane i umnožene kroz 15 pasaža. Pomoću MTT testa provjerena je njihova osjetljivost na vinkristin, prilikom čega nije primijećena promjena osjetljivosti. Osim toga, uspoređena je djelotvornost Ad5 transdukcije različitih pasaža, te nije primijećena

promjena (ovaj rad). U prikazanim eksperimentima korištene su stanice između 5. i 13. pasaže.

### 3.1.5. Replikacijski defektni adenovirusi

Adenovirusni vektori korišteni u ovom radu bili su Ad5wtRSVβgal, Ad5RGD4CRSVβgal, Ad5Δ639RSVβgal i Ad5wtCMVβgal:

- Ad5wtRSVβgal je replikacijski defektan adenovirus, s transgenom β-galaktozidazom ugrađenim u E1 područje genoma, pod kontrolom RSV promotora (engl. *Rous Sarcoma Virus Promoter*), dugog vlakna i bez ugrađenog preusmjeravajućeg motiva (zato u nazivu stoji divlji tip – wt (engl. *wild type*), označavajući tip vlakna,
- Ad5RGD4CRSVβgal je adenovirus koji se od prethodnog razlikuje po motivu za preusmjeravanje, RGD4C, koji se nalazi u HI–petlji proteina vlakna adenovirusa, te koji omogućuje ovom virusu vezanje na $\alpha_v$ integrine (Majhen i sur. 2009),
- Ad5Δ639RSVβgal je virus kratkog vlakna, koji ulazi u stanice neovisno o CAR receptoru. U dršku proteina vlakna nalazi se, umjesto 22 $\beta$ ponavljanja, samo 8 $\beta$ ponavljanja (Ambriović-Ristov i sur. 2003),
- Ad5wtCMVβgal (dobiven od prof. M. Eloit, Veterinarski fakultet, Maisons-Alfort, Francuska) je gotovo identičan virusu Ad5wtRSVβgal, ali ima transgen β-galaktozidazu u E1 području genoma pod kontrolom CMV promotora (engl. *Cytomegalovirus Promoter*) umjesto RSV promotora.

Svi virusi su konstruirani, namnoženi, pročišćeni i titrirani u Laboratoriju za genotoksične agense, Institut Ruđer Bošković (Ambriović-Ristov i sur. 2003, Majhen i sur. 2009).

**Tablica 1.**: Prikaz korištenih adenovirusa s njihovim karakteristikama

| Adenovirus | Promotor | Vlakno | Preusmjeravajući motiv |
|---|---|---|---|
| **Ad5wtRSVβgal** | **RSV** | **Dugačko** | **-** |
| **Ad5RGD4CRSVβgal** | **RSV** | **Dugačko** | **RGD4C** |
| **Ad5Δ639RSVβgal** | **RSV** | **Kratko** | **-** |
| **Ad5CMVβgal** | **CMV** | **Dugačko** | **-** |

### 3.1.6. Protutijela

Za određivanje ekspresije površinskih molekula na stanicama, te određivanje vezanja adenovirusa metodom protočne citometrije korištena su slijedeća primarna mišja monoklonska protutijela:

- za $\alpha_v\beta_3$ integrin: 23C6 (Pharmingen, SAD),
- za $\alpha_v\beta_5$ integrin: P1F6 (Chemicon, Njemačka),
- za $\alpha_v$ integrine: 272-17E6 (Merck, Njemačka),
- za CAR (engl. *Coxsackie adenovirus receptor*): RmcB (Upstate Cell Signaling Solutions, SAD),
- za penton adenovirusa: 1D2 protutijelo (Hong i sur. 2000),
- za izotipsku kontrolu korištena su mišja protutijela IgG1 (Sigma, Njemačka).

Sekundarna protutijela korištena za otkrivanje vezanja primarnih mišjih protutijela:

- protutijela usmjerena protiv mišjih imunoglobulina obilježena fikoeritrinom (PE) (DAKO, SAD).

### 3.1.7. Ostali materijal

- Ampule za smrzavanje stanica (Falcon Becton Dickinson, SAD)
- Automatska propipeta (Pipetboy)
- Erlenmayerove tikvice volumena 50 mL, 100 mL i 200 mL
- Kvarcne kivete volumena 100 µL

- Mikroepruvete za PCR (Eppendorf, Njemačka)
- Mikropipete (Eppendorf, Njemačka)
- Nastavci za mikropipete sa i bez filtera (Eppendorf, Njemačka)
- Petrijeve zdjelice za uzgoj kultura stanica promjera 10 cm (Falcon Becton Dickinson, SAD)
- Petrijeve zdjelice za uzgoj kultura stanica promjera 3,5 cm (Falcon Becton Dickinson, SAD)
- Plastične epruvete volumena 50 mL (Falcon Becton Dickinson, SAD)
- Plastične epruvete volumena 15 mL (Falcon Becton Dickinson, SAD)
- Plinski plamenik
- Pločice za uzgoj kultura stanica s 96 bunarića
- Spremnik ispunjen tekućim dušikom
- Staklene čaše različitih volumena
- Staklene pipete (Superior, Njemačka)

### 3.1.8. Uređaji:

- Automatski brojač stanica Coulter Counter (Beckman Coulter, UK)
- Centrifuga za stanice (Heraeus, Njemačka)
- Centrifuga za mikroepruvete (Ependorf, Njemačka)
- Inkubator za rast stanica (37°C, atmosfera zasićena vlagom, 5% $CO_{2,}$)
- Izvor napona struje (Amersham Biosiences, Švedska)
- Mikrovalna pećnica
- Protočni citometar (FACSCalibur, Becton-Dickinson, SAD)
- Spektrofotometar
- Sustav za horizontalnu elektroforezu (kalup za izlijevanje gela, češalj, kadica za elektroforezu) (Hoefer Scientific Instruments, SAD)
- Svjetlosni mikroskop (Zeiss, Njemačka)
- Termoblok (Thermomixer compact, Eppendorf, Njemačka)
- Tresilica (Tehtnica, Slovenija)
- Uređaj za lančanu reakciju polimerazom (PCR) (Eppendorf, Njemačka)
- Vaga (Tehtnica, Slovenija)
- Vodena kupelj (Tehtnica, Slovenija)

### 3.1.9. Priprema pufera i otopina

Sve otopine se pripremaju i zatim steriliziraju autoklaviranjem ili filtracijom ovisno o vrsti otopine:

- DMEM–BS: hranjiva podloga *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* s dodatkom 26,2 nM $NaHCO_3$ i 0,01% w/v streptomicin/kristalicina, pH 7, u koji se dodaje 10% (v/v) seruma goveda (engl. *Bovine serum*, BS),
- Fosfatni pufer (engl. *phosphate buffered saline,* PBS): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM $Na_2HPO_4$ x $7H_2O$, 1,4 mM $KH_2PO_4$, pH 7,4,
- Fosfatni pufer bez $Ca^{2+}$ i $Mg^{2+}$, PBSΔ (engl. *phosphate buffered saline*): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM $Na_2HPO_4$ x 7 $H_2O$, 1,4 mM $KH_2PO_4$, pH 7,4,
- MTT: 5 mg MTT otapa se u 1 mL PBS, filtrira kroz filtar – papir, čuva se u tamnoj boci pri 4°C,
- PBS-BSA: 10 mg BSA se otapa u 10 mL PBS-a, kako bi se dobilo 1% BSA u PBS, nakon čega se filtrira,
- Pufer za nanošenje uzoraka DNA u jažice agaroznog gela (6X): 20 mM EDTA, 0,25% Orange G boja, 50% glicerol,
- TAE: 40 mM Tris, 20 mM Natrijev acetat, 2 mM EDTA (pH 8,3)
- X-gal-S (supstrat za bojenje na β-galaktozidoznu aktivnost): K-ferocijanid konačne koncentracije 4 mM, K-fericijanid konačne koncentracije 4 mM, X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-beta-galaktozid) konačne koncentracije 3,2 mg/mL, $MgCl_2$ konačne koncentracije 2 mM, u PBS-u.

## 3.2. Metode:

Korištene su standardne metode molekularne biologije koje su detaljno opisane u priručniku „Metode u molekularnoj biologiji“ (Ambriović–Ristov i sur. 2007).

### 3.2.1. Uzgoj kultura stanica

Stanice rastu u Petrijevim zdjelicama za uzgoj kultura stanica, promjera 10 cm, u DMEM–BS, do popunjenosti površine od oko 80%. Nakon toga se stanice rasađuju, a višak se može smrznuti.

#### 3.2.1.1. Smrzavanje stanica

Stanice se odvajaju od podloge djelovanjem tripsina, koje se zaustavlja dodatkom 4 puta većeg volumena DMEM–BS, te se suspenzija stanica prebacuje u epruvetu za centrifugiranje. Potom se centrifugiraju 10 minuta pri 1000 x g kako bi se stanice dobilo u talogu. Najmanje $10^7$ stanica se resuspendira u 0,9 mL DMEM–BS, pa se suspenzija prebacuje u ampule za smrzavanje, te pohrani u led na 30 minuta. Ovako ohlađenoj suspenziji stanica, dodaje se 0,1 mL DMSO (konačna koncentracija DMSO 10%), pomiješa se, te se stavlja u pare tekućeg dušika ili u zamrzivač pri -80°C, kako bi se stanice polagano smrznule. Nakon barem dva sata, ili slijedeći dan, ampula sa stanicama se može pohraniti, za duže čuvanje, u spremnik s tekućim dušikom.

#### 3.2.1.2. Odmrzavanje stanica

Ampule sa smrznutim stanicama se prebacuju iz tekućeg dušika u vodenu kupelj zagrijanu pri 37°C. Nakon odmrzavanja, suspenzija stanica se prebaci u prethodno pripremljenu Petrijevu zdjelicu za uzgoj kulture stanica s hranjivom podlogom DMEM–BS zagrijanom pri 37°C. Nakon što se stanice prihvate za Petrijevu zdjelicu nakon nekoliko sati ili sutradan, može se promijeniti hranjiva podloga ili, ako je potrebno, stanice se presađuju.

### 3.2.2. Određivanje ekspresije Ad5–unesenog transgena β-galaktozidaze

U svaki bunarić pločice s 96 bunarića, nasađeno je $10^4$ HEp2, odnosno $10^4$ VK2 stanica. Dvadeset i četiri sata nakon nasađivanja, uklanja se hranjiva podloga pa se na stanice dodaju uzastopna dvostruka razrjeđenja adenovirusa, čija se djelotvornost transdukcije mjeri u volumenu 50 µL. Početni multiplicitet infekcije (engl. *multiplicity of infection*, MOI) virusnih čestica po stanici je bio za Ad5wtRSVβgal, Ad5RGD4CRSVβgal i Ad5wtCMVβgal $10^4$ virusnih čestica po stanici, dok je za Ad5Δ639RSVβgal bilo $10^5$ virusnih čestica po stanici.

Nakon sat vremena inkubacije pri 37°C adenovirusi se uklanjaju sa stanica, dodaje se svježa hranjiva podloga DMEM–BS (200 µL po bunariću pločice), a

pločica se potom vraća u inkubator. Dvadeset i četiri sata nakon transdukcije, uklanja se hranjiva podloga sa stanica, stanice se isperu sterilnim PBS-om, te se dodaje supstrat za β-galaktozidazu X-gal-S.

Nakon 24 sata, određuje se broj plavih stanica brojanjem pod svjetlosnim mikroskopom.

### 3.2.3. MTT test

Osjetljivost HEp2 i VK2 stanica na vinkristin određena je MTT testom. MTT test je kolorimetrijska metoda kojom se određuje preživljenje stanica nakon obrade citotoksičnim spojevima. Temelji se na mjerenju metaboličke aktivnosti stanica, odnosno na reakciji u kojoj sukcinat dehidrogenaza vijabilnih stanica reducira žutu, topljivu tetrazolijevu sol, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) u ljubičaste kristaliće formazana. Kristali formazana se zatim otapaju u dimetil-sulfoksidu, pa se mjeri apsorbancija pri 600 nm. Preživljenje stanica je proporcionalno izmjerenoj apsorbanciji.

Stanice (2500 stanica u 180 µL DMEM–BS po bunariću) se nasađuju u pločicu za rast kulture stanica s 96 bunarića, i ostavljaju se rasti tijekom 24 sata u inkubatoru. Nakon toga se dodaje vinkristin, u volumenu 20 µL, tako da je konačna koncentracija vinkristina 0,2 µg/mL, 0,1 µg/mL i 0,05 µg/mL. Nakon 72 sata od izlaganja vinkristinu, uklanja se hranjiva podloga DMEM–BS sa stanica naglim okretanjem pločice, pa se u svaki bunarić dodaje 40 µL 10 puta razrijeđene otopine MTT u DMEM–BS. Pločica se inkubira pri 37°C 4 sata, a nastali kristalići formazana se otapaju dodatkom 170 µL DMSO po bunariću. Kako bi se nastali kristalići formazana u potpunosti otopili, pločica je mehanički protresena na tresilici, a potom je mjerena apsorbancija pri 600 nm čitačem mikrotitarskih pločica. Kao slijepa proba, očitava se apsorbancija bunarića s otopinom MTT i DMSO. Preživljenje je izračunato po formuli:

$$\text{Preživljenje stanica (\%)} = \frac{\text{Apsorbancija tretiranih stanica - Apsorbancija "slijepe" probe}}{\text{Apsorbancija kontrolnih stanica - Apsorbancija "slijepe" probe}} \times 100\%$$

### 3.2.4. Određivanje količine vezanog Ad5wtRSVβgal na stanice HEp2 i VK2

HEp2 i VK2 stanice u rasle u Petrijevim zdjelicama za uzgoj stanica, do popunjenosti podloge od oko 80%. Odvojene su od podloge Versenom, isprane dva puta PBS-om centrifugiranjem (4 min pri 1000 x g), izbrojene i potom resuspendirane u PBS-u, tako da u 50 µL bude $5x10^5$ stanica. Dodan je Ad5wtRSVβgal kako bi MOI bio 750, odnosno 1500 virusnih čestica po stanici, a potom su stanice i adenovirusi ostavljeni na ledu tijekom jednog sata uz povremeno miješanje laganim udaranjem o stjenke mikroepruvete. Nakon toga, stanice se dva puta ispiru hladnim PBS-om. Ispiranje PBS-om se radi tako da se u svaki uzorak dodaje 450 µL PBS-a, pomiješa se, a zatim centrifugira (4 min pri 1000 x g), čime se stanice dobivaju u talog s kojeg se uklanja samo prethodno dodani volumen od 450 µL, odnosno, stanice ostaju u približno 50 µL PBS-a. Nakon ispiranja dodaje se supernatant hibridoma (150 µL), mišjeg monoklonskog protutijela 1D2 (specifično za penton Ad5) (Hong i sur. 2000) i inkubira se u ledu 1 sat. Stanice se ponovno ispiru 2 puta s PBS-om, kako je prethodno opisano. Nakon drugog ispiranja, stanice se resuspendiraju u preostalih 50 µL PBS-a, te se dodaje sekundarno, zečje protutijelo usmjereno protiv mišjih imunoglobulina obilježenih fikoeritrinom (PE) koje u kontaktu sa stanicama ostaje 30 minuta u ledu. Slijedi ponovno ispiranje hladnim PBS-om i to 3 puta, a na stanice u preostalih 50 µL PBS-a dodaje se PBS-1%-paraformaldehid za fiksaciju iza čega slijedi mjerenje količine vezanih adenovirusa protočnim citometrom. Uzorak se do analize protočnim citometrom drži u ledu.

### 3.2.5. Određivanje količine internaliziranog Ad5wtRSVβgal u HEp2 i VK2 stanice

HEp2 i VK2 stanice ($5x10^5$ stanica) su nasađene u Petrijeve zdjelice promjera 3,5 cm, tako da popunjenost bude oko 80%. Pročišćeni Ad5wtRSVβgal dodan je na stanice tako da MOI bude 5000 virusnih čestica po stanici. Nakon inkubacije od 40 minuta pri 37°C, uklanja se hranjiva podloga s virusima, stanice se ispiru dva puta hladnim tripsinom (400 µL), a zatim se odvajaju od podloge tripsinom (400 µL) tijekom 4 minute pri 37°C. Dodaje se 2 mL PBS-a, stanice se centrifugiraju (1000 x g), pa se još jednom ispiru s 2 mL PBS-a. Konačno, talog stanica se resuspendira u 200 µL PBS-a, a ukupna DNA (stanična i virusna) se izdvaja iz stanica

komercijalnim kompletom (DNeasy Kit, Qiagen). Postupak je proveden prema uputama proizvođača. Koncentracija DNA u uzorcima je određena mjerenjem apsorbancije pri 260 nm.

Kako bi se odredila količina internalizirane Ad5wtRSVβgal DNA u HEp2 i VK2 stanicama, korištena je metoda PCR, pri čemu je kao kalup korištena ukupna DNA (stanična i virusna) izdvojena iz stanica inficiranih jednakim multiplicitetom infekcije. Korištena su dvostruka uzastopna razrjeđenja kalupa, kako bi se omogućilo mjerenje razlika količine produkta reakcije PCR između uzoraka. Kao početnice za PCR reakciju su korištene pHIloopU i pHIloopD, koje su specifične za dio gena Ad5wtRSVβgal vlakna. PCR se izvodio tako da je započeo inicijalnom denaturacijom u trajanju 2 minute i 30 sekundi, a potom slijedi 30 ciklusa (30 sekundi denaturacije pri 95°C, 30 sekundi sparivanja početnica pri 53°C, 30 sekundi polimerizacije, odnosno produljivanja lanaca pri 72°C). Nakon 30 ciklusa slijedi završno produljivanje lanaca pri 72°C u trajanju od 7 minuta.

Produkti reakcije PCR pomiješani su s puferom za nanošenje uzoraka te razdvojeni elektroforezom u 1,2%-tnom agaroznom gelu (uz dodatak 10 mg/mL etidijeva bromida). Veličina odsječaka produkta reakcije PCR određivana je usporedbom sa standardom za duljinu odsječaka DNA. Po završetku elektroforeze gel je fotografiran, a slika je pohranjena u digitalnom obliku. Količine produkata reakcije PCR određene su analizom digitalnih slika pomoću programa ImageQuant TL.

### 3.2.6. Protočna citometrija – FACS

FACS (engl. *The Fluorescence-Activated Cell Sorter*) je uređaj koji mjeri i analizira veći broj fizikalnih značajki pojedinih čestica, najčešće stanica, dok prolaze kroz zraku svjetlosti u tankom mlazu tekućine. Karakteristike stanica, koje se mjere ovom metodom uključuju relativnu veličinu stanice, relativnu zrnatost ili složenost unutarnje građe i relativni intenzitet fluorescencije. Ove karakteristike određuje optičko – elektronski sustav, koji bilježi kako čestica raspršuje lasersko svjetlo i emitira fluorescenciju, pa FACS može odjeljivati stanice u suspenziji na bazi veličine i boje njihove fluorescencije.

Protočna citometrija je u ovom radu, korištena za mjerenje ekspresije integrina ($\alpha_v$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ i $\beta_1$) i CAR na površini HEp2 i VK2 stanica. Stanice (HEp2 i VK2) su uzgajane do popunjenosti staničnog sloja oko 80% u Petrijevim zdjelicama za uzgoj kulture stanica promjera 10 cm, te su zatim Versenom (neenzimski, sadrži EDTA) odvojene od podloge. Stanice prihvaćene za podlogu dva puta se ispiru Versenom, te zatim ostaju u 2 mL Versena dok se ne odvoje od podloge. Slijedi ispiranje centrifugiranjem (6 minuta pri 1000 x g) s 8 mL, te još jednom s 10 mL hladnog PBS-a. Stanice se zatim broje, ponovno centrifugiraju i resuspendiraju u hladnom PBS-u, tako da koncentracija stanica bude 5 x $10^5$ u 50 µL, što predstavlja pojedinačni uzorak. U svaki uzorak se dodaju mišja primarna protutijela koja su specifična za površinsku molekulu čija se ekspresija želi mjeriti, te se inkubira 1 sat u ledu. Istovremeno je za svako protutijelo korištena odgovarajuća izotipska kontrola. Primarna protutijela se uklanjaju dvostrukim ispiranjem PBS-om. Ispiranje se vrši tako da se u svaki uzorak dodaje 450 µL PBS-a, pomiješa se, a zatim se centrifugira (4 min 1000 x g) čime se stanice dobivaju u talogu s kojeg se uklanja dodani volumen od 450 µL, a stanice ostaju u približno 50 µL PBS-a. Nakon drugog ispiranja, stanice se resuspendiraju u preostalih 50 µL PBS-a, a potom se dodaje sekundarno, zečje protutijelo usmjereno protiv mišjih imunoglobulina obilježenim fikoeritrinom (PE) koje u kontaktu sa stanicama ostaje 30 minuta u ledu. Slijedi ponovno ispiranje s hladnim PBS-om 3 puta, a na stanice u preostalih 50 µL PBS-a dodaje se 250 µL PBS-a koji sadrži 0,1% BSA. Uzorak se do analize protočnim citometrom drži u ledu.

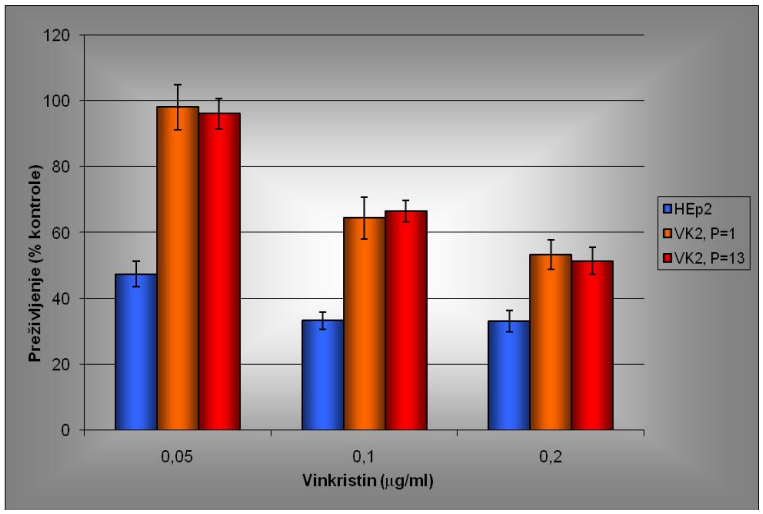
### 3.2.7. Statistička obrada podataka

Svi su dobiveni rezultati analizirani Studentovim t-testom i prikazani su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. Rezultati su smatrani značajnim ako je njihov $P<0,05$. Svi pokusi su izvedeni u triplikatu i ponovljeni barem tri puta. Podaci su obrađeni i grafovi nacrtani u programu Microsoft Excel, Microsoft Office programskog paketa.

# 4. REZULTATI

## 4.1. Stanice VK2 pokazuju stabilnu otpornost na vinkristin u usporedbi s roditeljskim stanicama HEp2

Stanice VK2 dobivene su iz stanica HEp2 dugotrajnim izlaganjem citostatiku vinkristinu (Osmak i Eljuga, 1992). Nakon što je klon VK2, koji je otporan na vinkristin izdvojen, stanice dalje rastu bez prisutnosti vinkristina, te nakon određenog broja pasaža može doći do gubitka njihove otpornosti. Kako bi provjerili da li se tijekom uzgoja stanica u kulturi mijenja otpornost VK2 stanica na vinkristin, u odnosu na HEp2 stanice, napravljen je test određivanja citotoksičnosti MTT s 1. i 13. pasažom VK2 stanica, te s roditeljskim HEp2 stanicama. Na slici 7. prikazan je rezultat ovog pokusa koji pokazuje kako su VK2 stanice oko dva puta otpornije na vinkristin u odnosu na roditeljske HEp2 stanice, te da je otpornost stabilna tijekom trinaest pasaža u kulturi.




**Slika 7.** Preživljenje HEp2 i VK2 stanica nakon izlaganja stanica vinkristinu.

Stanice su nasađene u pločicu za rast stanica s 96 bunarića. Nakon 24 sata dodane su različite koncentracije vinkristina. Nakon 72 sata od izlaganja vinkristinu, određivano je preživljenje stanica MTT testom. Rezultati za HEp2 i VK2 stanice su prikazani kao postotak preživljenja u odnosu na iste stanice koje nisu bile izložene djelovanju vinkristina. Prikazan je jedan od dva pokusa koji daje slične rezultate.

## 4.2. Promjene u ekspresiji molekula uključenih u transdukciju divljim tipom Ad5 na površini HEp2 i VK2 stanica

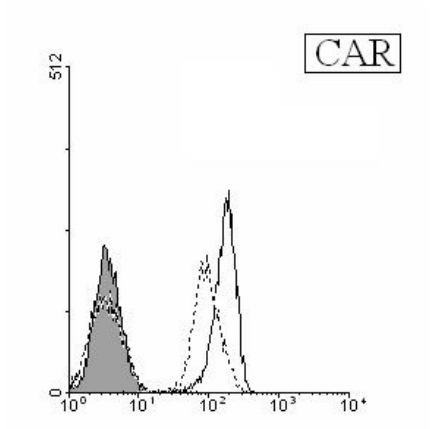
U tumorskim stanicama često se događaju promjene u ekspresiji Ad5 receptora, CAR i integrina, u odnosu na normalne stanice. Isto tako, primijećena je promjena u ekspresiji CAR i integrina uključenih u internalizaciju Ad5 ($\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$ i $\alpha_3\beta_1$) u tumorskim stanicama otpornim na citostatike u odnosu na roditeljske tumorske stanice, što onda može dovesti do promjena u ekspresiji Ad5-unesenog transgena (Ambriović–Ristov i sur. 2004, Ambriović–Ristov, neobjavljeni rezultati, Egami i sur. 2009, Shirakava i sur. 2001).

Kako bi istražili postoje li u VK2 stanicama, otpornima na vinkristin, u odnosu na roditeljske HEp2 stanice, promjene u ekspresiji molekula uključenih u transdukciju Ad5, mjerili smo ekspresiju primarnog (CAR) i sekundarnih Ad5 receptora metodom protočne citometrije. Mjerili smo ekspresiju heterodimera integrina $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ i podjedinica integrina $\alpha_v$, $\alpha_5$ i $\beta_1$. Na slici 8. prikazani su dobiveni rezultati za HEp2 i VK2 stanice kao histogrami ekspresije pojedine molekule na površini stanice u odnosu na histogram ekspresije izotipske kontrole, te kao srednje vrijednosti fluorescencije (engl. *mean fluorescence intensity*, MFI) i to za vrijednost za VK2 relativno u odnosu na HEp2 stanice.

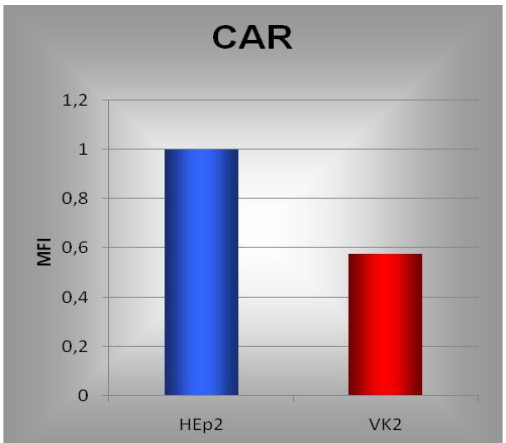
Iz dobivenih rezultata, vidljivo je kako VK2 stanice imaju manje CAR na površini stanice u usporedbi s HEp2 stanicama (Slika 8. A1 i A2). Stanice VK2 imaju povišenu ekspresiju integrina $\alpha_v\beta_3$ za otprilike 70% (Slika 8. B1 i B2), dok je ekspresija integrina $\alpha_v\beta_5$ u VK2 stanicama jednaka onoj na HEp2 stanicama (rezultati nisu prikazani). Ukupna količina podjedinice integrina $\alpha_v$ u VK2 stanicama je povećana za 30% (Slika 8. C1 i C2), a dio ove povećane ekspresije je vrlo vjerojatno posljedica povećane ekspresije integrina $\alpha_v\beta_3$. U VK2 stanicama, u odnosu na roditeljske HEp2 stanice, nalazimo smanjenu ekspresiju podjedinica integrina $\beta_1$ za otprilike 25% (Slika 8. D1 i D2), no kako je ekspresija podjedinica $\alpha_5$ jednaka u HEp2 i VK2 stanicama (rezultati nisu prikazani), možemo zaključiti kako je ekspresija $\alpha_5\beta_1$ isto jednaka. Naime, podjedinica integrina $\alpha_5$ se može vezati samo za $\beta_1$, dok se podjedinica $\beta_1$ može vezati za veliki broj različitih α podjedinica, između ostalog i za podjedinicu $\alpha_v$, kao $\alpha_v\beta_1$. Ekspresiju $\alpha_v\beta_1$ heterodimera integrina nismo mjerili, s obzirom da na tržištu ne postoji protutijelo koje ga specifično

prepoznaje. Budući da se podjedinica integrina $\beta_1$ nalazi vezana s velikim brojem α podjedinica ($\alpha_1$, $\alpha_2$, $\alpha_3$, $\alpha_4$, $\alpha_5$, $\alpha_6$, $\alpha_7$, $\alpha_8$, $\alpha_9$ i $\alpha_v$), iz naših rezultata ne možemo zaključiti koji je od ovih integrina smanjeno eksprimiran u VK2 stanicama u odnosu na HEp2.

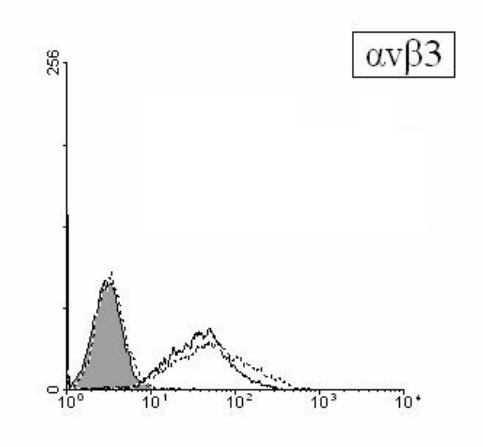
**A1**



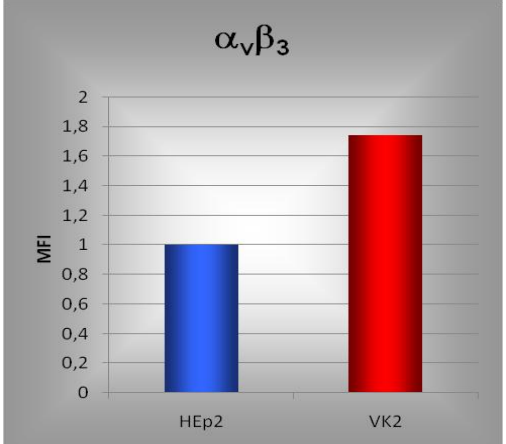

**A2**



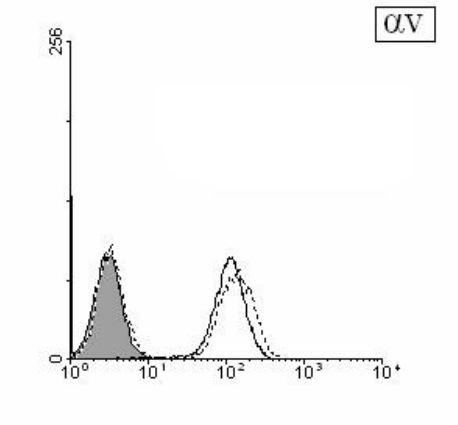

**B1**



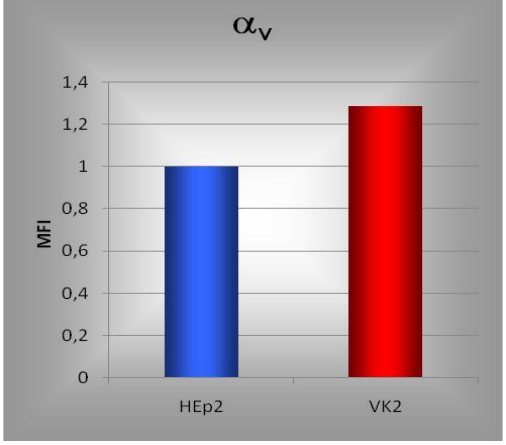

**B2**

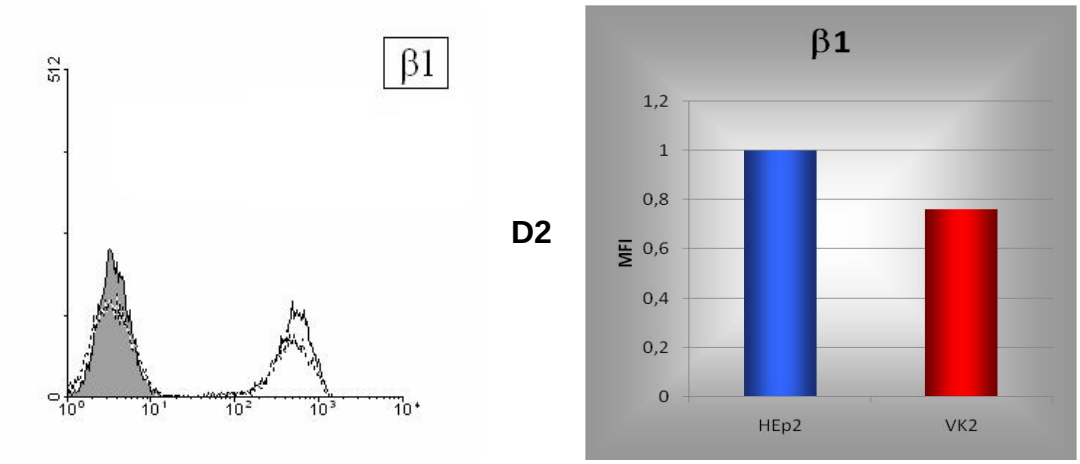



**C1**




**C2**






**Slika 8.** Ekspresija CAR, heterodimera integrina $\alpha_v\beta_3$, i podjedinica integrina $\alpha_v$ i $\beta_1$ na površini HEp2 i VK2 stanica.

Stanice su odvojene od podloge Versenom, inkubirane s protutijelima specifičnim za pojedinu molekulu ili s izotipskom kontrolom, a zatim inkubirane sa sekundarnim, zečjim protutijelom usmjerenim protiv mišjih imunoglobulina obilježenih fikoeritrinom (PE). Fluorescencija koja je odraz ekspresije pojedine molekule je potom mjerena protočnim citometrom. Prikazani su histogrami izmjerene fluorescencije za CAR (A1), $\alpha_v\beta_3$ (B1), $\alpha_v$ (C1), $\beta_1$ (D1) uz histograme fluorescencije dobivene mjerenjem izotipske kontrole (HEp2 puna linija, VK2 isprekidana linija). Isti rezultati su prikazani i kao MFI za VK2, relativno prema vrijednosti MFI za HEp2 i to za CAR (A2), $\alpha_v\beta_3$ (B2), $\alpha_v$ (C2) i $\beta_1$ (D2) Prikazan je jedan od tri pokusa koji daje slične rezultate.

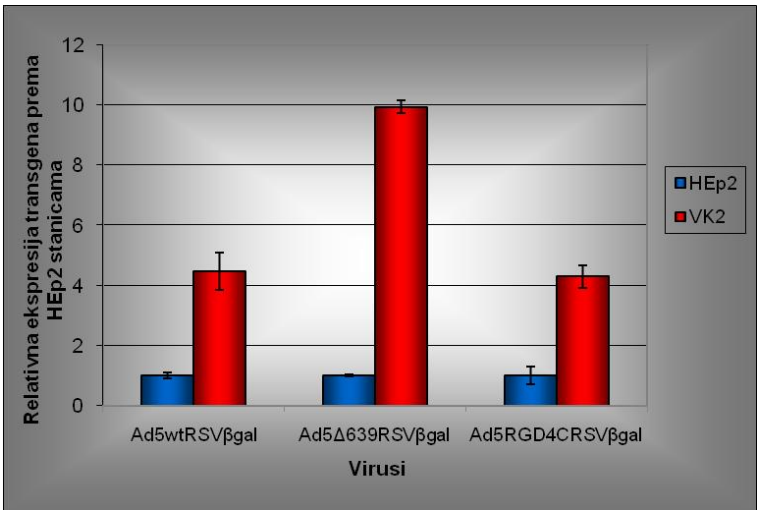
## 4.3. Stanice VK2, u odnosu na roditeljske HEp2 stanice, pokazuju povećanu ekspresiju Ad5-unesenog transgena β-galaktozidaze

Cilj genske terapije tumora Ad5 vektorima je u stanicu prenijeti terapeutski gen. U istraživanjima Ad5 vektora za gensku terapiju, umjesto terapeutskog gena, najčešće koristimo gene dojavljivače, kao što je primjerice β-galaktozidaza koja omogućuje lako otkrivanje i kvantifikaciju stanica transduciranih s Ad5. Kako bismo utvrdili postoje li promjene u ekspresiji Ad5-unesenog transgena β-galaktozidaze između roditeljskih HEp2 i stanica otpornih na vinkristin VK2, transducirali smo ih s Ad5wtRSVβgal. S obzirom na prethodno opisane rezultate promjene ekspresije nekoliko molekula uključenih u transdukciju Ad5, očekivali smo promjenu u ekspresiji Ad5-unesenog transgena β-galaktozidaze. Na slici 9. su prikazani rezultati ovog pokusa, koji pokazuje kako je ekspresija Ad5-unesenog transgena β-galaktozidaze veća 4,5 puta u VK2 stanicama otpornima na vinkristin, nego u roditeljskim HEp2 stanicama. Ovaj rezultat je neočekivan, s obzirom da je u VK2

stanicama pronađena manja ekspresija CAR nego u HEp2 stanicama, pa se prema tome mogla očekivati upravo obrnuta situacija, a to bi bila manja ekspresija Ad5-unesenog trasgena u VK2 stanicama, koje imaju manju ekspresiju primarnog Ad5 receptora CAR.

Kako bi istražili važnost ekspresije CAR na primjećenu razliku u ekspresiji Ad5-unesenog transgena, transducirali smo stanice replikacijski defektnim Ad5Δ639RSVβgal, čiji je ulaz u stanicu neovisan o ekspresiji CAR, zato što ima kratko (8 pseudoponavljajućih motiva umjesto 22 u divljem tipu) i kruto (umjesto savitljivo u trećem pseudopovljajućem motivu divljeg tipa) vlakno (Ambriović–Ristov i sur. 2003). Međutim, ekspresija transgena nakon Ad5Δ639RSVβgal transdukcije je bila čak 10 puta veća u VK2 stanicama nego u HEp2 stanicama (Slika 9.). Ovaj rezultat pokazuje da je povećana ekspresija Ad5 unesenog transgena neovisna o CAR ekspresiji, odnosno kako bi razlika u ekspresiji Ad5wtRSVβgal-unesene β-galaktozidaze između HEp2 i VK2 stanica bila još i veća da u VK2 stanicama nije došlo do smanjenja eskpresije CAR.

Mjerenjem ekspresije integrina uključenih u ulazak Ad5 u stanicu, pokazali smo povećanu ekspresiju podjedinice integrina $\alpha_v$ i heterodimera integrina $\alpha_v\beta_3$ u VK2 stanicama, u odnosu na HEp2 stanice, dok je ekspresija integrina $\alpha_v\beta_5$, drugog najvažnijeg integrina za internalizaciju, kao i ekspresija integrina $\alpha_5\beta_1$, jednaka u obje stanične linije. Kako bi istražili utjecaj promjene ekspresije integrina $\alpha_v$ na primjećenu razliku u ekspresiju Ad5-unesenog transgena transducirali smo stanice replikacijski defektnim Ad5RGD4CRSVβgal. Ovaj virus je preusmjeren na integrine $\alpha_v$ ugradnjom motiva RGD4C (CDCRGDCFC) u HI-petlju proteina vlakna (Majhen i sur. 2009). Na slici 9. prikazan je rezultat ovog mjerenja, ekspresija Ad5RGD4CRSVβgal-unesenog transgena β-galaktozidaze je veća 4,5 puta u VK2 stanicama otpornima na vinkristin nego u roditeljskim HEp2 stanicama. Dobivena razlika između VK2 i HEp2 stanica u ekspresiji β-galaktozidaze za Ad5RGD4CRSVβgal je jednaka onoj dobivenoj za Ad5wtRSVβgal. Prema tome zaključujemo da promjena u ekspresiji integrina $\alpha_v\beta_3$ nije glavni uzrok primijećene razlike između HEp2 i VK2 stanica.




**Slika 9.** Ekspresija transgena β-galaktozidaze unesenog s Ad5wtRSVβgal, Ad5Δ639RSVβgal i Ad5RGD4CRSVβgal.

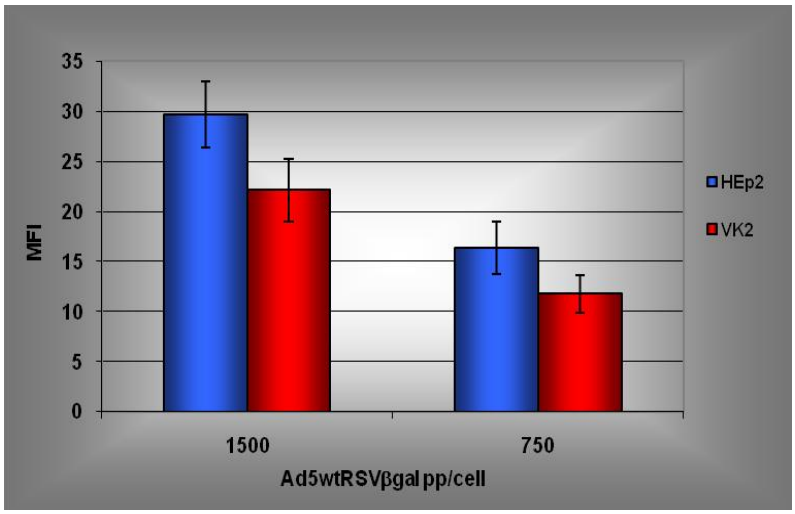
U pločicu s 96 bunarića nasađeno je $10^4$ HEp2 i VK2 stanica. Nakon 24 sata, na stanice se dodaju uzastopna dvostruka razrjeđenja adenovirusa. Nakon sat vremena inkubacije, adenovirusi se uklanjaju i dodaje se svježa hranjiva podloga. Nakon još 24 sata, uklanja se hranjiva podloga, stanice se fiksiraju te bojaju na aktivnost β-galaktozidaze. Broj plavih stanica određuje se brojenjem pod svjetlosnim mikroskopom u bunarićima gdje je broj plavih stanica između 50 i 150. Ekspresija transgena β-galaktozidaze unesenog pojedinim Ad5 je izražena za VK2 relativno prema ekspresiji transgena u HEp2 stanicama. Prikazan je jedan od tri pokusa koji daje slične rezultate.

## 4.4. Na VK2 stanice se veže 25–30% manje Ad5wtRSVβgal nego na HEp2 stanice

Ulazak Ad5 se može podijeliti u dvije faze. Prvo se Ad5 veže na primarni receptor CAR čime se virus koncentrira na površini stanice i zbog toga CAR zovemo receptor za vezanje (engl. *attachment receptor*). Nakon vezanja za CAR olakšava se vezanje RGD slijeda iz baze pentona za integrine ($\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$ i $\alpha_3\beta_1$) na površini stanice čime se omogućuje ulazak, odnosno internalizacija u stanicu. To je razlog da se spomenuti integrini nazivaju receptori za internalizaciju (engl. *internalisation receptors*) (Russell 2009, Liu i Muruve 2003).

Kako bismo izmjerili količinu vezanih Ad5wtRSVβgal na površini HEp2 i VK2 stanica iskoristili smo činjenicu kako se Ad5 veže na CAR, eksprimiran na površini stanica koje držimo na ledu, ali je pri tome onemogućena internalizacija virusa. Osim toga, treba napomenuti kako je vezanje Ad5 na CAR neophodno potrebno za

djelotvornu transdukciju, budući da je afinitet vezanja RGD slijeda baze pentona s integrinima puno manji (Kd 55 nM), u usporedbi s Kd 1,7nM za vezanje vlakna adenovirusa na CAR (Medina–Kauwe 2003). Stoga je eksperiment mjerenja vezanja Ad5 u ledu, prvenstveno odraz vezanja vlakna na CAR. Količinu vezanog adenovirusa mjerimo inkubacijom adenovirus specifičnim primarnim mišjim protutijelima, te sekundarnim protutijelima protiv mišjih imunoglobulina, koja su fluorescentno obilježena. Na slici 10. su prikazani rezultati ovako izvedenog pokusa. Na površini VK2 stanica nalazimo 25–30% manju količinu vezanih Ad5wtRSVβgal čestica u odnosu na HEp2 stanice. Isti rezultat je dobiven za dva različita multipliciteta infekcije; 750 i 1500 virusnih čestica po stanici. Kao što je prethodno objašnjeno, vezanje Ad5wtRSVβgal na površini stanice najviše ovisi o ekspresiji CAR, pa zaključujemo kako je ovaj rezultat smanjenog vezanja Ad5wtRSVβgal na VK2 u odnosu na HEp2 stanice uglavnom posljedica oko 40% manje ekspresije CAR na površini VK2 stanica što smo prethodno izmjerili metodom protočne citometrije (Slika 8.).

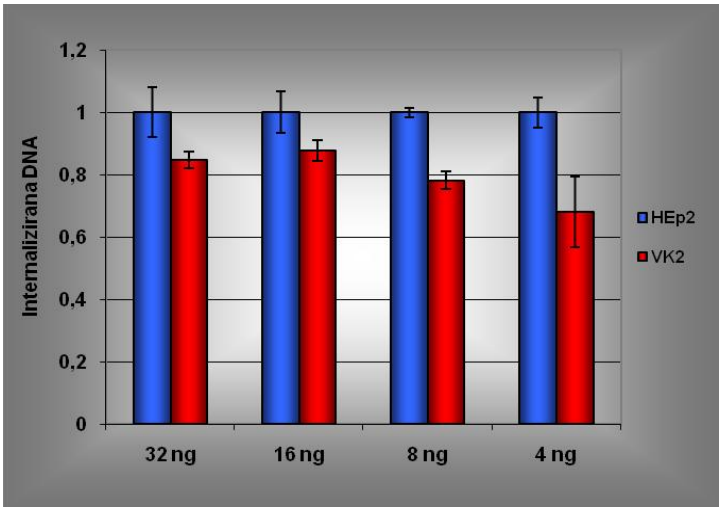



**Slika 10.** Vezanje Ad5RSVβgal na površinu HEp2 i VK2 stanice.

Stanice HEp2 i VK2 su odvojene Versenom od podloge i ohlađene na ledu. Zatim su HEp2 i VK2 stanicama dodani različiti MOI Ad5wtRSVβgal (1500 i 750 virusnih čestica po stanici). Nakon 1 sat inkubacije u ledu, stanice su isprane, kako bi se uklonio nevezani Ad5wtRSVβgal, a vezanje Ad5wtRSVβgal je mjereno dodatkom mišjeg monoklonskog protutijela 1D2, specifičnog za penton adenovirusa (Hong i sur. 2000), nakon čega slijedi inkubacija sa sekundarnim, zečjim protutijelom usmjerenim protiv mišjih imunoglobulina obilježenim fikoeritrinom (PE). Fluorescencija koja je odraz količine vezanih Ad5wtRSVβgal za HEp2 i VK2 stanice je mjerena protočnim citometrom. Rezultati su prikazani kao MFI za HEp2, odnosno VK2 stanice, umanjen za vrijednost izotipske kontrole. Prikazan je jedan od dva pokusa koji daje slične rezultate.

## 4.5. U stanice VK2 ulazi 15–30% manje Ad5wtRSVβgal DNA nego u HEp2 stanice

Vezanje Ad5wtRSVβgal na CAR nije jedini preduvjet za uspješnu transdukciju i ekspresiju transgena. Nakon vezanja na CAR, RGD slijed iz baze pentona veže se na integrine na površini stanice, te se pokreće internalizacija (Majhen i Ambriović–Ristov 2006, Russell 2009, Liu i Muruve 2003). Prema tome, kako bi mjerili kumulativni učinak svih promjena na površini VK2 stanica koje utječu na ulazak Ad5wtRSVβgal, mjerili smo količinu Ad5wtRSVβgal DNA koja uđe u stanicu nakon 40 minuta internalizacije pri 37°C. Na slici 12. je prikazano kako se 15-30% manje Ad5wtRSVβgal DNA internalizira u VK2 stanice nego u HEp2 stanice. Na temelju rezultata vezanja i unosa Ad5wtRSVβgal DNA u HEp2 i VK2 stanice, može se zaključiti da je smanjenje ekspresije CAR osnovni razlog smanjenoj internalizaciji Ad5wtRSVβgal u VK2 stanice, u odnosu na HEp2. Ipak, ne može se sa sigurnosti isključiti i manja uloga promjene integrina na površini VK2 stanica u određivanju djelotvornosti ekspresije Ad5-unesenog transgena. Ono što možemo sa sigurnošću tvrditi je da povećana ekspresija Ad5-unesenog transgena u VK2 stanicama nije posljedica unosa Ad5wtRSVβgal DNA u stanicu.



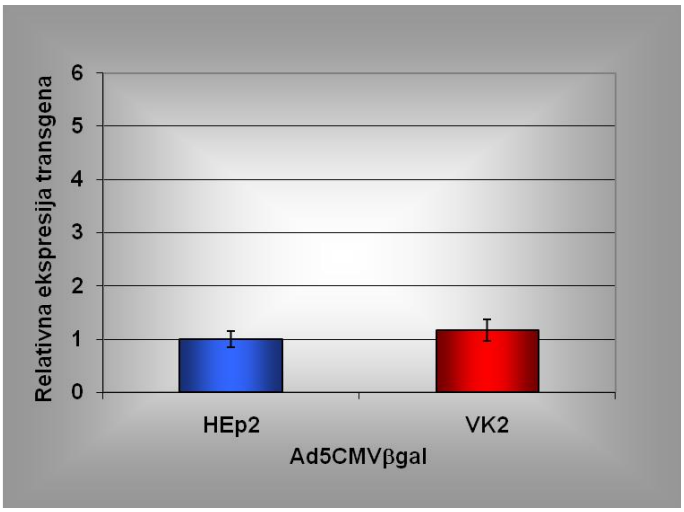

**Slika 11.** Unos Ad5wtRSVβgal DNA u HEp2 i VK2 stanice.

Stanice HEp2 i VK2 su nasađene u Petrijeve zdjelice tako da je popunjenost površine 70-80%, nakon čega je dodan Ad5wtRSVβgal s MOI 1000 virusnih čestica po stanici. Nakon 40 minuta HEp2 i VK2 stanice su isprane, te je izdvojena ukupna (stanična i virusna) DNA. Količina internalizirane Ad5wtRSVβgal DNA je određena reakcijom PCR s početnicama specifičnim za Ad5wtRSVβgal. Reakcija PCR je napravljena s uzastopnim razrjeđenjima kalupa ukupne DNA, nakon čega je količina umnoženih odsječaka DNA kvantificirana denzitometrijskom analizom. Rezultati za VK2 stanice su prikazani relativno prema vrijednostima dobivenim za HEp2 stanice. Prikazan je jedan od tri pokusa koji daje slične rezultate.

## 4.6. Stanice HEp2 i VK2 pokazuju jednaku ekspresiju Ad5wtCMVβgal-unesenog transgena β-galaktozidaze

Na temelju dobivenih rezultata koji pokazuju kako usprkos gotovo zanemarivoj razlici u vezanju, a posebice ulasku Ad5wtRSVβgal u HEp2 i VK2 stanice, u VK2 stanicama nalazimo čak 4,5 puta povećanu ekspresiju Ad5wtRSVβgal-unesenog transgena β-galaktozidaze, pretpostavili smo da bi uzrok ovoj razlici mogla biti aktivnost promotora pod kojim je smješten transgen β-galaktozidaza. Stoga smo transducirali stanice replikacijski defektnim Ad5wtCMVβgal, koji je u potpunosti jednak prethodno korištenom Ad5wtRSVβgal, osim što je transgen β-galaktozidaza umjesto pod RSV promotorom smješten pod CMV promotor. Naša pretpostavka se pokazala točnom zato što je ekspresija Ad5wtCMVβgal-unesenog transgena u VK2 stanicama jednaka ekspresiji u HEp2 stanicama, što korelira s izmjerenom razlikom količine unesene Ad5wtRSVβgal DNA (Slika 12). Kako se virusi Ad5wtRSVβgal i

Ad5wtCMVβgal razlikuju samo po promotoru pod kojim je smješten gen za β-galaktozidazu, pretpostavili smo da je osnovna razlika između roditeljskih HEp2 stanica i stanica otpornih na vinkristin VK2, a koja je rezultirala promjenom u ekspresiji Ad5wtRSVβgal-unesenog transgena β-galaktozidaze, upravo različita aktivnost promotora RSV u HEp2 i VK2 stanicama.




**Slika 12.** Ekspresija transgena β-galaktozidaze unesenog s Ad5wtCMVβgal.

U pločicu s 96 bunarića nasađeno je $10^4$ HEp2 i VK2 stanica. Nakon 24 sata, na stanice se dodaju uzastopna dvostruka razrjeđenja adenovirusa. Nakon sat vremena inkubacije, adenovirusi se uklanjaju, a dodaje se svježa hranjiva podloga. Nakon još 24 sata, uklanja se hranjiva podloga, stanice se fiksiraju te bojaju na aktivnost β-galaktozidaze. Nakon Broj plavih stanica određuje se brojanjem pod svjetlosnim mikroskopom u bunarićima gdje je broj plavih stanica između 50 i 150. Ekspresija transgena β-galaktozidaze unesenog pojedinim Ad5 je izražena za VK2 relativno prema ekspresiji transgena u HEp2 stanicama. Prikazan je jedan od tri pokusa koji daje slične rezultate.

# 5. RASPRAVA

Otpornost na protutumorske lijekove je najvažnije ograničenje uspješnom liječenju tumora. Stoga se razvijaju novi pristupi terapiji tumora, a jedan od njih je genska terapija. Očekuje se kako će genska terapija prvo biti korištena kod pacijenata koji su prethodno bili podvrgnuti kemoterapiji, odnosno kod pacijenata čiji su tumori razvili otpornost na neki od prethodno primijenjenih protutumorskih lijekova. Uspješnost genske terapije tumora posredovane Ad5, odnosno uspješnost ekspresije terapeutskog gena unesenog Ad5 vektorom, ovisi ne samo o uspješnosti Ad5 ulaska, odnosno o uspješnoj translokaciji Ad5 DNA u jezgru tumorske stanice, nego i o uspješnoj transkripciji terapeutskog gena s ugrađenog promotora. Isto tako, u nevirusnom prijenosu gena ishod genske terapije ovisi o djelotvornosti unosa plazmida u stanicu, te o snazi promotora koji kontrolira ekspresiju terapeutskog gena.

U literaturi je opisano više slučajeva u kojima je Ad5-genska terapija tumora otpornih na neki protutumorski lijek uspješnija nego terapija ishodišnog tumora prije razvoja otpornosti. Tako je pokazano kako su ljudske stanice tumora mjehura otporne na terapiju protutumorskim lijekovima, osjetljivije na terapiju Ad5p53, ali mehanizam nije pronađen (Shirakawa i sur. 2001). U laboratoriju za genotoksične agense, u kojem je ovaj diplomski rad izrađen, prethodno je pokazano da je Ad5 posredovan unos gena djelotvorniji u klon-stanica karcinoma grkljana čovjeka koji je otporan na cisplatinu (CA3ST) u usporedbi s roditeljskim stanicama HEp2. Razlog tome je povećana ekspresija primarnog Ad5 receptora CAR, te povećana ekspresija sekundarnog Ad5 receptora integrina $\alpha_v\beta_3$ (Ambriović-Ristov i sur. 2004).

Poznato je da se protutumorski lijekovi mogu koristiti za povećanje Ad5-posredovane ekspresije transgena u kliničkim pokusima. Hemminki i suradnici (2003) su pokazali kako različiti protutumorski lijekovi povećavaju ekspresiju CAR, a time i ulazak Ad5. Egami i suradnici (2009) su pokazali *in vitro* i *in vivo* da 5–fluorouracil, cisplatina i etopozid povećavaju Ad5-posredovani prijenos gena, ali nisu pokazali mehanizam kako do toga dolazi. Za male doze etopozida je pokazano da povećavaju aktivnost promotora hTERT i povećavaju infekciju Ad5 i to povećanjem ekspresije CAR u stanicama karcinoma mjehura (Shieh i sur. 2006). Konačno, u više staničnih linija tumora primjećena je povećana ekspresija gena s CMV

promotora ugrađenima u Ad5 nakon izlaganja stanica cisplatini (Park i sur. 2002, Zacal i sur. 2005).

U literaturi postoje podaci kako je citoskelet uključen u provođenje signala koji mijenjaju ekspresiju gena. Tako, na primjer, vinkristin i neki drugi depolimerizirajući protutumorski lijekovi djeluju preko modulacije promotorske aktivnosti (Arai i sur. 2006, Meissner i sur. 2008). U stanicama melanoma miša B16F10 pokazano je povećanje ekspresije mRNA za klasu II izotip β tubulina nakon djelovanja vinkristina. Pronađena je povećana aktivnost promotora klase II β izotipa tubulina mTUBB2 u B16F10 stanicama otpornima na vinkristin (Arai i sur. 2006). Vinblastin, koji je također inhibitor polimerizacije mikrotubula inducira povećanje ekspresije c-Myc putem translokacije NF-κB (engl. *nuclear factor-κB*), ukazujući na to da *Vinca* alkaloidi mogu djelovati ne samo na depolimerizaciju mikrotubula već mogu biti i transkripcijski modulatori (Bourgarel–Rey i sur. 2001). Nokodazol i vinblastin koji također djeluju na depolimerizaciju mikrotubula smanjuju ekspresiju mRNA za receptor 2 endotelnog fakora rasta (VEGFR2, engl. *vascular endothelial growth factor receptor-2*) (Meissner i sur. 2008).

U ovom radu pokazana je povećana ekspresija transgena β-galaktozidaze unesenog Ad5 vektorom u stanicama karcinoma grkljana čovjeka otpornima na vinkristin VK2 u usporedbi s roditeljskim stanicama HEp2 i to za 4,5 puta. Na temelju iznesenih rezultata pokazano je kako primijećeni učinak nije posljedica povećanog vezanja ni povećanog ulaska Ad5 DNA u stanice VK2 u usporedbi s HEp2. Na stanicama HEp2 i VK2 mjerena je ekspresija primarnog Ad5 receptora CAR i sekundarnih receptora integrina za koje je poznato da su uključeni u internalizaciju Ad5. Iako su pokazane neke promjene u njihovoj ekspresiji, nije pronađena korelacija koja bi ukazivala da su ove promjene uzrok primijećene povećane ekspresije Ad5-unesenog transgena u VK2 stanice u usporedbi s HEp2. Čak što više, na temelju ekspresije CAR koja je bila smanjena u VK2 stanicama u odnosu na HEp2 očekivao bi se suprotni učinak. S druge strane u stanicama VK2 pokazana je povećana ekspresija integrina $\alpha_v\beta_3$, te integrinske podjedinice $\alpha_v$ u usporedbi s HEp2 stanicama, što bi bilo u skladu s povećanjem ulaska virusa u stanice VK2. No kumulativni učinak ovih promjena u HEp2 i VK2 stanicama najbolje se može procijeniti iz mjerenja ukupne količine Ad5 DNA metodom PCR koja je pokazala tek nešto manju količinu Ad5 DNA u VK2 stanicama u odnosu na HEp2

stanice. Korištenjem dva dodatna Ad5 rekombinantna adenovirusa koji ulaze različitim putem nego divlji tip Ad5 isključena je glavna uloga CAR i $\alpha_v$ integrina u primijećenom fenomenu povećanja ekspresije Ad5-unesenog transgena β-galaktozidaze u VK2 stanicama u odnosu na HEp2. Svi ovi podaci naveli su nas na pretpostavku da bi snaga promotora mogla biti razlog uočenih razlika. Potvrda ove hipoteze je dobivena mjerenjem ekspresije transgena β-galaktozidaze nakon transdukcije HEp2 i VK2 stanica s Ad5 koji umjesto RSV promotora ispred transgena β-galaktozidaze ima CMV promotor. Rezultati ovog mjerenja su u VK2 stanicama pokazali približno jednaku ekspresiju β-galaktozidaze u usporedbi s onom izmjerenom u HEp2 stanicama, što se u potpunosti slaže s rezultatima dobivenim mjerenjem količine internalizirane Ad5wtRSVβgal DNA.

Budući da je rad koji uključuje rezultate opisane u ovom diplomskom radu već objavljen (Majhen i sur 2010) sa znatno dopunjenim eksperimentalnim podacima, koji u potpunosti potvrđuju ovu hipotezu potrebno ih je i detaljno raspraviti. Transfekcijskim eksperimentima s plazmidima, koji sadrže RSV ili CMV promotor, pokazano je kako RSV promotor u VK2 stanicama ima povećanu aktivnost u odnosu na aktivnost u HEp2 stanicama i to za 33 puta. Iako ova promjena ne mora biti povezana s mehanizmom otpornosti na vinkristin, ipak upućuje na činjenicu da se aktivnost promotora može mijenjati tijekom razvoja otpornosti na vinkristin. Vrlo je vjerojatno da ove promjene uključuju povećanje ekspresije više različitih transkripcijskih faktora. Zanimljiv je i odnos jačine promotora RSV i CMV u HEp2 i VK2 stanicama. U HEp2 stanicama promotor RSV je 8 puta manje aktivan nego u VK2 stanicama. U VK2 stanicama je upravo obrnuto, RSV promotor je 4 puta aktivniji nego u HEp2 stanicama (Majhen i sur. 2010).

Iz rezultata opisanih u ovom radu, koji su dio rada Majhen i sur. (2010), možemo zaključiti da je klon stanica VK2 otporan na vinkristin, nastao višestrukim izlaganjem HEp2 stanica vinkristinu, bolja meta za Ad5-posredovanu gensku terapiju tumora i to upravo zbog povećane ekpsresije Ad5-unesenog transgena s RSV promotora. U dizajnu Ad5 za gensku terapiju tumora, ali i u dizajnu plazmida koji se koriste za nevirusni prijenos terapeutskih gena s ciljem genske terapije tumora, terapeutski geni se stavljaju pod kontrolu konstitutivno aktivnih promotora. Najčešće korišteni promotori su upravo CMV i RSV i to zato što su sposobni koristiti transkripcijske faktore prisutne u većini tipova stanica. Ovi rezultati dovode u pitanje da je CMV

promotor uvijek bolji izbor za ekspresiju terapeutskog gena nego CMV promotor. Clesham i suradnici (1996) su bili među prvima koji su pokazali da uspješna translokacija Ad5 DNA ne dovodi uvijek do ekspresije Ad5-unesenog gena. Naime, oni su pokazali kako je u stanicama glatkog mišića endotela aktivnost CMV promotora ograničena. Slično je pokazano u mišićnim stanicama srca štakora u kojima je Ad5 infekcija vrlo uspješna no aktivnost CMV promotora je vrlo mala. U istim ovim stanicama aktivnost RSV promotora je stabilna i snažna (Maass i sur. 2003).

Većina radova ukazuje na činjenicu da je promotor CMV snažniji od RSV promotora u *in vitro* i *in vivo* ekspresiji, što je eksperimentalno pokazano u radu Ambriović i sur. (1997) u kojem ekspresija antigena s Ad5 vektora pod CMV promotorom potiče snažniji imunološki odgovor u usporedbi s ekspresijom antigena s Ad5 vektora pod RSV promotorom. Promotor CMV je dokazano snažniji od RSV u ekspresiji timidin kinaze s Ad5-vektora za gensku terapiju stanica mokraćnog mjehura *in vitro* i *in vivo* (Freund i sur. 2000). Međutim, zanimljivo je kako Tong i sur. (1999) nisu zabilježili znatno produženje preživljenja imunološki deficijentnih miševa (engl. *nude mice*) koji nose tumor jajnika čovjeka pri usporedbi učinka genske terapije Ad5 vektorima koji nose timidin kinazu pod kontrolom CMV i RSV promotora. Pretpostavili su da je taj rezultat posljedica kinetike ekspresije potaknute CMV i RSV promotorima. Kako su opisali Chen i suradnici (2008), ekspresija s RSV promotora je slabija nego ona s CMV promotora, ali traje duže vrijeme *in vivo*. Konačno, pokazano je da na aktivnost oba promotora, CMV i RSV, mogu djelovati citokini (Qin i sur. 1997).

U radu Majhen i suradnici (2010), u kojem su uključeni rezultati ovog diplomskog rada, pokazano je kako veličina i/ili nizvodni sljedovi u Ad5 genomu mogu utjecati na aktivnost promotora. U transfekcijskim eksperimentima, kojima je dokazana različita aktivnost promotora, u HEp2 i VK2 stanice transficirani su plazmidi pRSVCAT i pCMVCAT. Ovi plazmidi sadrže kompletni lijevi dio Ad5 genoma (ekspresijske kazete RSVCAT i CMVCAT su ugrađene na lijevi kraj genoma umjesto E1 područja Ad5 genoma), uključujući obrnuto ponavljajuće sljedove (ITR, engl. *Inverted Terminal Repeat*), enkapsidacijski signalni slijed i pojačivač E1A promotora (Ambriović i sur. 1997). Međutim, razlika u ekspresiji transgena CAT nakon transfekcije VK2 i HEp2 stanica je 33 puta. Kako bi odgovorili na pitanje

zašto je razlika između VK2 i HEp2 stanica nakon transdukcije Ad5 puno manja nego što bi se očekivalo iz razlike u aktivnosti promotora, Majhen i suradnici (2010) su transficirali u VK2 i HEp2 stanice plazmid koji sadrži kompletnu Ad5wtRSVβgal DNA i dobili razliku od 4,7 puta što je gotovo jednako izmjerenoj razlici u ekspresiji transgena nakon transdukcije s Ad5wtRSVβgal koja iznosi 4,5 puta. Prema tome veličina ne samo uzvodnih, nego i nizvodnih sljedova ekspresijske kazete RSVβgal, može utjecati na ekspresiju u ciljnoj stanici.

Podaci iz literature pokazuju više primjera povećane transdukcije i/ili ekspresije trangena u stanicama tumora otpornima na protutumorske lijekove nego u izvornom tumoru (Shirakawa i sur. 2001, Ambriović–Ristov i sur. 2004, Majhen i sur. 2010, Egami i sur. 2009). Smatramo da je aktivnost promotora većinom zanemarena u analizi uspjeha nevirusne i virusne genske terapije tumora, posebice tumora otpornih na protutumorske lijekove koji će u budućnosti biti prvi na listi za liječenje ovim novim pristupom. U ovom diplomskom radu te u radu Majhen i sur. (2010), dokazali smo kako su stanice otporne na vinkristin bolja meta za gensku terapiju tumora nego roditeljske stanice tumora, bilo Ad5 vektorima (virusni prijenos gena) ili plazmidima (nevirusni prijenos gena) i to zbog povećane aktivnosti RSV promotora u otpornim stanicama. *In vivo* podatke koji bi poduprli ove *in vitro* rezultate je vrlo teško dobiti. Stanice bi morale biti izdvojene prije kemoterapije i djelotvornost ekspresije transgena ovih stanica bi morala biti uspoređena s izdvojenim stanicama tumora nakon terapije, a koje su postale na primijenjenu terapiju otporne. Prema tome *in vitro* istraživanja klonova stanica otpornih na protutumorske lijekove mogu nam pomoći u otkrivanju općih mehanizama koji bi se mogli iskoristiti za gensku terapiju tumora *in vivo*. Smatramo da kombinacija preusmjeravajućih vektora i/ili upotreba odgovarajućih promotora za terapeutske gene može dovesti do mnogo uspješnije genske terapije tumora.

# 6. ZAKLJUČAK

1. Unatoč promjenama u ekspresiji molekula uključenih u mehanizam ulaska Ad5 na površini VK2 stanica u odnosu na HEp2 stanice, te promjene nisu glavni uzrok primijećenom fenomenu povećanja ekspresije Ad5-unesenog transgena β-galaktozidaze u VK2 stanicama u odnosu na HEp2 stanice.

2. Objašnjenje primijećenog fenomena povećanja ekspresije Ad5-unesenog transgena β-galaktozidaze u VK2 stanicama u odnosu na HEp2 stanice je u jačini promotora RSV u HEp2 i VK2 stanicama. Zbog razlike u jačini RSV promotora u HEp2 i VK2 stanicama, u VK2 stanicama nalazimo 4,5 puta veću ekspresiju transgena β-galaktozidaze nego u HEp2 stanicama.

3. Naši rezultati upućuju na činjenicu kako razvoj otpornosti na vinkristin može biti popraćen promjenama u aktivnosti promotora, te da izbor promotora za ekspresiju terapeutskog gena u vektorima za gensku terapiju tumora može doprinijeti smanjenju potrebne količine vektora potrebne za terapeutski efekt.

# 7. LITERATURA

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002): Molecular Biology of the Cell. Garland Science, New York.

Amalfitano A., Hauser M. A., Hu H., Serra D., Begy C. R., Chamberlain J. S. (1998): Production and characterisation of improved adenovirus vectors with E1, E2B and E3 genes deleted. Journal of Virology **72**: 926–933.

Ambriović A., Adam M., Monteil M., Paulin D., Eloit M. (1997): Efficacy of replication-defective adenovirus-vectored vaccines: protection following intramuscular injection is linked to promoter efficiency in muscle representative cells. Virology **238**: 327–335.

Ambriović-Ristov A., Brozović A., Bruvo Mađarić B., Ćetković H., Herak Bosnar M., Hranilović D., Katušić Hećimović S., Meštrović Radan N., Mihaljević S., Slade N., Vujaklija D. (2007): Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković, Zagreb.

Ambriović-Ristov A., Gabrilovac J., Čimbora-Zovko T., Osmak M. (2004): Increased adenoviral efficacyin human laryngeal carcinoma cells resistant to cisplatin is associated with increased expression of integrin alphavbeta3 and coxsackie adenovirsus receptor. International Journal of Cancer **110**: 660–667.

Ambriović-Ristov A., Mercier S., Eloit M. (2003): Shortening adenovirus type 5 fiber shaft decreases the efficiency of postbinding steps in CAR-expressing and nonexpressing cells. Virology **312**: 425–433.

Ambriović-Ristov A., Osmak M. (2006): Integrin-Mediated Drug Resistance. Current Signal Transduction Therapy **1**: 227–37.

Anderson, W. F. (1998): Human gene therapy. Nature **392**: 25–30.

Arai K., Matsumoto Y., Nagashima Y., Yagasaki K. (2006): Regulation of class II beta–tubulin expression by tumor suppressor p53 protein in mouse melanoma cells in response to Vinca alcaloid. Molecular Cancer Research **4**: 247–255.

Arap W., Pasqualini R, Ruoslahti E. (1998): Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. Science **279**: 377–380.

Ashbourne Excoffon K. J. D., Moninger T., Zabner J (2003): The Coxsackie B Virus and Adenovirus Receptor Resides in a Distinct Membrane Microdomain. Journal of Virology **77**: 2559–2567.

Barczyk M., Carracedo S., Gullberg D. (2010): Integrins. Cell and Tissue Research **339**: 269–280.

Bergelson J. M., Cunningham J. A., Droguett G., Kurt-Jones E. A., Krithivas A., Hong J. S., Horwitz M. S., Crowell R. L., Finberg R. W. (1997): Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. Science **275**: 1320–1323.

Bourgarel–Rey V., Vallee S., Rimet O., Champion S., Braguer D., Desobry A., Briand C., Barra Y. (2001): Involvement of nuclear factor kappaB in c–Myc induction by tubulin polymerization inhibitors. Molecular Pharmacology **59**: 1165–1170.

Chen P., Tian J., Kovesdi I., Bruder J. T. (2008): Promoters influence the kinetics of transgene expression following adenovector gene delivery. The Journal of Gene Medicine **10**: 123–131.

Clavel M, Vermorken JB, Cognetti F et al. (1994): Randomised comparison of cisplatin, methotrexate, bleomycin and vincristine (CABO) versus cisplatin and 5-flurouracil versus cisplatin in recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of head and neck. Annals of Oncology **5**: 521–526.

Clesham G. J., Browne H., Efstathiou S., Weissberg P. L. (1996): Enhancer stimulation unmasks latent gene transfer after adenovirus-mediated gene delivery into human vascular smooth muscle cells. Circulation Research **79**: 1188–1195.

Davison AJ, Benko M, Harrach B. (2003): Genetic content and evolution of adenoviruses. The Journal of General Virology **84**: 2895–2908.

Dmitriev I., Krasnykh V., Miller C. R., Wang M., Kashentseva E., Mikheeva G., Belousova N., Curiel D. T. (1998): An Adenovirus Vector with Genetically Modified

Fibers Demonstrates Expanded Tropism via Utilization of a Coxsackievirus and Adenovirus Receptor-Independent Cell Entry Mechanism, Journal Of Virology **72**: 9706–9713.

Egami T., Ohuchida K., Mizumoto K., Onimaru M., Toma H., Sato N., Matsumoto K., Tanaka M. (2009): Chemotherapeutic agents potentiate adenoviral gene therapy for pancreatic cancer. Cancer Science **100**: 722–729.

Einfeld D. A., Schroeder R., Roelvink P. W., Lizonova A., King C. R., Kovesdi I., Wickham T. J. (2001): Reducing the native tropism of adenovirus vectors requires removal of both CAR and integrin interactions. Journal of Virology **75**: 11284–11291.

Forastiere AA. (1994): Overview of platinum chemotherapy in head and neck cancer. Seminars in Oncology **21**: 20–27.

Freund C. T., Tong X. W., Block A., Contant C. F., Kieback D. G., Eowley D. R., Lerner S. P. (2000): Adenovirus–mediated suicide gene therapy for bladder cancer: comparison of the Cytomegalovirus and Rous sarcoma virus–promoter. Anticancer Research **20**: 2811–2816.

Ganly I., Kaye S. B. (2000): Recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck: Overview of current therapy and future prospects. Annals of Oncology **11**: 11–16.

Gidding C. E. M., Kellie S. J., Kamps W. A., Graaf S. S. N. (1999): Vincristine revisited. Critical reviews in Oncology/Hematology **29**: 267–287.

Graham F. L., Smiley J., Russell W. C., Nairn R. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. The Journal of General Virology **36**: 59–74.

Graham F. L., Van Der Eb A. J. (1973): A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. Virology **52**: 456–67.

Hemminki A., Kanerva A., Liu B., Wang M., Alvarez R. D., Siegal G. P., Curiel D. T. (2003): Modulation of Coxsackie–Adenovirus Receptor Expression for Increased Adenoviral Transgene Expression. Cancer Research **63**: 847–853.

Hong S. S., Bardy M., Monteil M., Gay B., Denesvre C., Tournier J., Martin G., Eloit M.,Boulanger P. (2000): Immunoreactive Domains and Integrin–Binding Motifs in Adenovirus Penton Base Capsomer. Viral Immunology **13**: 353–371.

Hong, S. S., Magnusson M.K., Henning P., Lindholm L., Boulanger P. A. (2003): Adenovirus stripping: A versatile method to generate adenovirus vectors with new cell target specificity. Molecular Therapy **7**: 692–699.

Hynes R. O. (2002): Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. Cell **110**: 673–687.

Jacobs C, Lyman G, Velez-Garcia E. (1992): A phase III randomized study comparing cisplatin and fluorouracil as single agents and in combination for advanced squamous–cell carcinoma of the head and neck. Journal of Clinical Oncology **10**: 257–263.

Jordan M. A., Thrower D., Wilson L. (1991): Mechanisms of inhibition of cell proliferation by *Vinca* alkaloids. Cancer Research **51**: 2212–2222.

Kralj M., Husnjak K., Körbler T., Pavelić J. (2003): Endogenous p21WAF1/CIP1 status predicts the response of human tumor cells to wild-type p53 and p21WAF1/CIP1 overexpression. Cancer Gene Therapy **10**: 457–467.

Krasnykh V., Dmitriev I., Mikheeva G., Miller C. R., Belousova N., Curiel D. T. (1998): Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob. Journal of Virology **72**: 1844–1852.

Krasnykh V. N., Douglas J. T., Van Beusechem V.W. (2000): Genetic targeting of adenoviral vectors. Molecular Therapy **1**: 391–405.

Kvackajova-Kisucka J., Barancik M., Breier A. (2001): Drug transporters and their role in multidrug resistance of neoplastic cells. General Physiolology and Biophysics **20**: 215–237.

Lieber, A., Steinwaerder D. S., Carlson C. A., Kay M. A. (1999): Integrating adenovirus–adeno–associated virus hybrid vectors devoid of all viral genes. Journal of Virology **73**: 9314–9324.

Liu Q., Nuruve D.A. (2003): Molecular basis oft he inflammatory response to adenovirus vectors. Gene Therapy **10**: 935–940.

Lonning, P. E. (2004): Genes causing inherited cancer as beacons to identify the mechanisms of chemoresistance. Trends in Molecular Medicine **10**: 113–118.

Lusky M., Christ M., Rittner K., Dieterle A., Dreyer D., Mourot B., Schultz H., Stoeckel F., Pavirani A., Mehtali M. (1998): In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A or E1/E4 deleted. Journal of Virology **72**: 2022–2032.

Maass A., Langer S. J., Oberdorf–Mass S., Bauer S., Neyses L., Leinwand L. A. (2003): Rational promoter selecrion for gene transfer into cardiac cells. Journal of Molecular and Cellular Cardiology **35**: 823-831.

Majhen D., Brozović A., Buger T., Gabrilovac J., Osmak M., Ambriović-Ristov A. (2010): Vincristine–resistant human laryngeal carcinoma cells demonstrate increased Rous sarcoma virus promoter activity. Life Sciences **87**: 468–474.

Majhen D., Nemet J., Richardson J., Gabrilovac J., Hajsig M., Osmak M., Eloit M., Ambriović-Ristov A. (2009): Differential role of $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_v\beta_3$ integrins in internalization and transduction effcacies of wild type and RGD4C fiber–modified adenoviruses. Virus Research **139**: 64–73.

Majhen D. (2005): Preusmjeravanje adenovirusa tip 5 na aminopeptidazu N. Magistarski rad, Zagreb, Prirodoslovno – matematički fakultet.

Majhen D., Ambriović-Ristov A. (2006): Adenoviral vectors – How to use them in cancer gene therapy? Virus Research **119**: 121–133.

Majhen D, Gabrilovac J, Eloit M, Richardson J, Ambriović-Ristov A. (2006): Disulfide bond formation in NGR fiber-modified adenovirus is essential for retargeting to

aminopeptidase N. Biochemical and Biophysical Research Communications **348**: 278–87.

Martin K., Brie A., Saulnier P., Perricaudet M., Yeh P., Vigne E. (2003): Simultaneous CAR and alpha V integrin-binding ablation fails to reduce Ad5 liver tropism. Molecular Therapy **8**: 485–494.

Maschler S., Wirl G., Spring H., Bredow D., Sordat I., Beug H., Reichmann E. (2005): Tumor cell invasiveness correlates with changes in integrin expression and localization. Oncogene **24**: 2032–2041.

Medina-Kauwe L. K. (2003): Endocytosis of adenovirus and adenovirus capsid proteins. Advanced Drug Delivery Reviews **55**: 1485–96.

Meier O., Greber U. F. (2004): Adenovirus endocytosis. Journal of Gene Medicine **6**: 152–163.

Meissner M., Pinter A., Michailidou D., Hrgovic I., Kaprolat N., Stein M., Holtmeier W., Kaufmann R., Gille J. (2008): Microtubule–targeted drugs inhbit VEGF receptor–2 expression by both transcriptional and post–transcriptional mechanisms. Journal of Investigative Dermatology **128**: 2084–2091.

Moore A. E., Sabachewsky L., Toolan H.W. (1955): Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. Cancer Research **15**: 598–602.

Nayak B. S., Pinto Pereira L. M. (2006): Catharanthus roseus flower extract has wound-healing activity in Sprague Dawley rats. BMC complementary and alternative medicine **6**: 41.

Nemerov G. R., Stewart P. L. (1999): Role of $\alpha_v$ Integrin sin Adenovirus Cell Entry and Gene Delivery. Microbiology and Molecular Biology Reviews **63**: 725–734.

Nicklin S. A., White S. J., Watkins S. J., Hawkins R. E., Baker A. H. (2000): Selective targeting of gene transfer to vascular endothelial cells by use of peptides isolated by phage display. Circulation **102**: 231–237.

Nicklin, S. A., Von Seggern D. J., Work L. M., Pek D. C., Dominiczak A. F., Nemerow G. R., A. H. Baker (2001): Ablating adenovirus type 5 fiber-CAR binding and HI loop insertion of the SIGYPLP peptide generate an endothelial cell-selective adenovirus. Molecular Therapy **4**: 534–542.

Noble R. L. (1990): The discovery of *Vinca* alkaloids; chemotherapeutic agents against cancer. Biochemistry and Cell Biology **68**: 1344–1351.

Osmak M., Eljuga D. (1992): The response of two vincristine resistant human larinx carcinoma cell clones to chemotherapeutic drugs. Radiology and Oncology **26**: 140–144.

Park J. O., Lopez C. A., Gupta V. K., Brown C. K., Mauceri H. J., Darga T. E., Manan A., Hellman S., Posner M. C., Kufe D. W., Weichselbaum R. R. (2002): Transcriptional control of viral gene therapy by cisplatin. Journal of Clinical Investigation **110**: 403–410.

Pasqualini R., Arap W., McDonald D. M. (2002): Probing the structural and molecular diversity of tumor vasculature. Trends in Molecular Medicine **8**: 563–571.

Pickles R. J., Fahrner J. A., Petrella J. E. M., Boucher R. C., Bergelson J. M. (2000): Retargeting the Coxsackievirus and Adenovirus Receptor to the Apical Surface of Polarized Epithelial Cells Reveals the Glycocalyx as a Barrier to Adenovirus-Mediated Gene Transfer. Journal of Virology **74**: 6050–6057.

Qin I., Ding Y., Pahud D. R., Chang E., Imperiale M. J., Bromberg J. S. (1997): Promoter attenuationin gene therapy: interferon–gamma and tumor necrosis factor–alpha inhibit transgene expression. Human Gene Therapy **8**: 2019–2029.

Roelvink P. W., Mi Lee G, Einfeld D. A., Kovesdi I., Wickham T. J. (1999): Identification of a conserved receptor-binding site on the fiber proteins of CAR-recognizing adenoviridae. Science **286**: 1568–1571.

Russel, W. C. (2000): Update on adenovirus and its vectors. Journal of General Virology **81**: 2573–2604.

Russel, W. C. (2009): Adenoviruses: update on structure and function. Journal of General Virology **90**: 1–20.

Schiedner G., Morral N., Parks R. J. (1998): Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. Nature Genetics **18**: 180–183.

Schiedner G., Bloch W., Hertel S., Johnston M., Molojavyi A., Dries V., Varga G., Van Rooijen N., Kochanek S. (2003): A hemodynamic response to intravenous adenovirus vector particles is caused by systemic Kupffer cell-mediated activation of endothelial cells. Human Gene Therapy **14**: 1631–1641.

Shayakhmetov D. M., Lieber A. (2000): Dependence of Adenovirus Infectivity on Length of the Fiber Shaft Domain. Journal of Virology **74**: 10274–10286.

Shieh G. S., Shiau A. L., Chang C. C., Tzai T. S., Wu C. L. (2006): Lowe–dose etoposide enhances telomerase–dependent adenovirus–mediated cytosine deaminase gene therapy through augmentation od adenoviral infection of transgene expression in a synegeic bladder tumor model. Cancer Research **66**: 9957–9966.

Shirakawa T., Sasaki R., Gardner T. A., Kao C., Zhang Z. J., Sugimura K., Matsuo M., Kamidono S., Gotoh A. (2001): Drug–resistant human bladder-cancer cells are more sensitive to adenovirus-mediated wild-type p53 gene therapy compared to drug-sensitive cells. Journal of Cancer **94**: 282–289.

Smith T., Idamakanti N., Kylefjord H., Rollence M., King L., Kaloss M., Kaleko M., Stevenson S. C. (2002): In vivo hepatic adenoviral gene delivery occurs independently of the coxsackievirus-adenovirus receptor. Molecular Therapy **5**: 770–779.

Stewart P. L., Chiu C. Y., Huang S., Muir T., Zhao Y., Chait B., Mathias P., Nemerow G. R. (1997): Cryo-EM visualization of an exposed RGD epitope on adenovirus that escapes antibody neutralization. The EMBO Journal **16**: 1189–1198.

Sugarman B. J., Hutchins B. M., Mcallister L., Lu F., Thomas K. B. (2003): The Complete Nucleic Acid Sequence of the Adenovirus Type 5 Reference Material (ARM) Genome. BioProcessing Journal **2**: 27–32.

Thomas, C. E., Ehrhardt A., Kay M. A. (2003): Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. Nature Reviews Genetics **4**: 346–358.

Tomko R. P., Xu R., Philipson L. (1997): HCAR and MCAR: The human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**: 3352–3356.

Tong X., Engehausen D. G., Freund C. T., Agoulnik I., Oehler M. K., Kim T. E., Hasenburg A., Guo Z., Contant C. F., Woo S. I., Kieback D. G. (1999): Comparison of long–term survival of cytomegalovirus promoter verus Rous Sarcoma virus promoter–driven thymidine kinase gene therapy in nude mice bearing human ovarian cancer. Hybridoma **18**: 93–97.

Van Beusechem V. W., van Rijswijk A. L., van Es H. H., Haisma H. J., Pinedo H. M., Gerritsen W. R. (2000): Recombinant adenovirus vectors with knobless fibers for targeted gene transfer. Gene Therapy **7**:1940–1946.

Vokes E. E., Athanasiadis I. (1996): Chemotherapy for squamous-cell carcinoma of head and neck. Annals of Oncology **7**: 15–29.

Vuković L. (2005): Apoptoza i otpornost tumorskih stanica na citostatike. Doktorska disertacija, Zagreb, Prirodoslovno – matematički fakultet.

Walters R. W., Grunst T., Bergelson J. M., Finberg R. W., Welsh M. J., Zabner J. (1999): Basolateral localization of fiber receptors limits adenovirus infection from the apical surface of airway epithelia. Journal of Biological Chemistry **274**: 10219–10226.

Wickham T. J., Mathias P., Cheresh D. A., Nemerow G. R. (1993): Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. Cell **73**: 309–319.

Wiethoff, C. M., Middaugh C. R. (2003): Barriers to nonviral gene delivery. Journal of Pharmaceutical Science **92**: 203–217.

Wiley Database (2012): http://wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/

Wold W. S. M. (1999): Adenovirus methods and protocols. Humana Press Inc., New Jersey.

Zacal N. J., Francis M. A., Rainbow A. J. (2005): Enhanced expression from the human cytomegalovirus immediate–early promoter in a non–replicating adenovirus encoded reporter gene following cellular to chemical DNA damaging agents. Biochemical and Biophysical Research Communications **332**: 441–449.

# 8. ŽIVOTOPIS

Rođen sam u Rijeci 7. lipnja 1983. godine. Osnovnu školu sam završio 1998. godine, kada sam upisao Gimnaziju Andrije Mohorovičića u Rijeci, opći smjer, koju sam završio s odličnim uspjehom 2002. godine. Potom upisujem Prirodoslovno–matematički fakultet, Biološki odsjek, smjer dipl. ing. biologije-ekologije.

Koautor sam na jednom znanstvenom radu: Majhen D., Brozović A., Buger T., Gabrilovac J., Osmak M., Ambriović-Ristov A. (2010): Vincristine–resistant human laryngeal carcinoma cells demonstrate increased Rous sarcoma virus promoter activity. Life Sciences 87: 468–474.

Sudjelovao sam na Danima bioinformatike 2005. godine u Zagrebu, u sklopu kojih sam održao predavanje pod nazivom Genom prokariota. U rujnu 2008. godine sudjelovanje na radionici: Adenoviruses: Basic biology to gene therapy, s posterom CHANGES IN PROMOTERS ACTIVITY IN HUMAN LARYNGEAL CARCINOMA CELLS RESISTANT TO VINCRISTINE ARE RESPONSIBLE FOR INCREASED ADENOVIRAL TRANSGENE EXPRESSION. U studenom 2008. godine u Zagrebu sudjelovao sam kongresu: 50 godina molekularne biologije u Hrvatskoj, s posterom CHANGES IN PROMOTERS ACTIVITY IN HUMAN LARYNGEAL CARCINOMA CELLS RESISTANT TO VINCRISTINE ARE RESPONSIBLE FOR INCREASED ADENOVIRAL TRANSGENE EXPRESSION.

Aktivno se služim engleskim jezikom, a pasivno talijanskim jezikom. Vrlo se dobro služim računalom.