

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Katja HROVAT

**VPLIV UTIŠANJA HELIKAZE RECQ1 NA  
PROLIFERACIJO GLIOBLASTOMSKIH CELIC V  
CEBRICAH**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Katja HROVAT

**VPLIV UTIŠANJA HELIKAZE RECQ1 NA PROLIFERACIJO  
GLIOBLASTOMSKIH CELIC V CEBRICAH**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja

**THE EFFECT OF RECQ1 HELICASE DEPLETION ON  
PROLIFERATION OF GLIOBLASTOMA CELLS IN ZEBRAFISH**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa Molekulska in funkcionalna biologija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Delo je bilo opravljeno na Oddelku za genetsko toksikologijo in biologijo raka Nacionalnega inštituta za Biologijo v Ljubljani.

Po sklepu Komisije za študij 1. in 2. stopnje oziroma Senata oddelka z dne 20. 2. 2015 je bila za mentorico imenovana doc. dr. Lilijana Bizjak Mali, za somentorja asist. dr. Miloš Vittori in za recenzenta prof. dr. Rok Kostanjšek.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Nada ŽNIDARŠIČ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Mentorica: doc. dr. Lilijana BIZJAK MALI  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Somentor: asist. dr. Miloš VITTORI  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Recenzent: prof. dr. Rok KOSTANJŠEK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 27. 9. 2016

Podpisana izjavljam, da je magistrsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Katja Hrovat

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2  
DK UDK 577:616.831-006(043.)=163.6  
KG glioblastom/helikaza RECQ1/proliferacija/zarodki cebric  
AV HROVAT, Katja, diplomirana biologinja (UN)  
SA BIZJAK MALI, Lilijana (mentorica)/VITTORI, Miloš (somentor)/KOSTANJŠEK, Rok (recenzent)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Magistrski študijski program 2. stopnje Molekulska in funkcionalna biologija  
LI 2016  
IN VPLIV UTIŠANJA HELIKAZE RECQ1 NA PROLIFERACIJO GLIOBLASTOMSKIH CELIC V CEBRICAH  
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)  
OP prim.: XVI, 51 str., 6 pregl., 19 sl., 2 pril., 113 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Glioblastom je najbolj malignen možganski tumor z visoko stopnjo smrtnosti. Zaradi slabe prognoze in kratke povprečne dobre preživetja bolnikov kljub zdravljenju, so raziskave za odkritje novih terapevtskih pristopov nujno potrebne. Kot potencialna molekularna tarča za zdravljenje z RNA-interferenco se kaže helikaza RECQ1, ki sodeluje pri podvojevanju in popravljanju DNA ter tako vzdržuje stabilnost genoma. Vpliv utišanja RECQ1 na proliferacijo glioblastomskih celic smo preverili v magistrski nalogi. Izvedli smo tako *in vitro* kot *in vivo* poskus v zarodkih cebric (*Danio rerio*), ki so zaradi svoje prosojnosti in visoke genetske homologije z ljudmi odličen vretenčarski modelni organizem. S fluorescenčno mikroskopijo smo spremljali spreminjanje jakosti fluorescence glioblastomskih celic in ugotovili, da utišanje helikaze RECQ1 vpliva na proliferacijo celic *in vitro* ter tudi *in vivo*. Rezultati so pokazali, da mesto ksenotransplantacije celic vpliva na proliferacijo celic v zarodkih cebric. Poleg tega smo z imunocitokemijskim barvanjem proteina Ki-67 ugotovili proliferacijski potencial glioblastomskih celic, z barvilom akridin oranžno pa število apoptotičnih celic v zarodkih cebric.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2  
DC UDK 577:616.831-006(043.)=163.6  
CX glioblastoma/RECQ1 helicase/proliferation/zebrafish embryos  
AU HROVAT, Katja  
AA BIZJAK MALI, Lilijana (supervisor)/VITTORI, Miloš (co-advisor)/KOSTANJŠEK, Rok (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Master Study Programme Molecular and functional biology  
PY 2016  
TI THE EFFECT OF RECQ1 HELICASE DEPLETION ON PROLIFERATION OF GLIOBLASTOMA CELLS IN ZEBRAFISH  
DT Master Thesis (Master Study Programmes)  
NO XVI, 51 p., 6 tab., 19 fig., 2 ann., 113 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Glioblastoma is the most malignant brain tumour with the highest mortality rate. Due to poor prognosis and short median survival, new therapeutic approaches are urgently needed. RECQ1 helicase is a promising molecular target for RNAi-based cancer therapy. This DNA helicase participates in DNA replication and repair and thus maintains genome integrity. The aim of our work was to evaluate the effect of RECQ1 helicase depletion on proliferation of glioblastoma cells. We performed both *in vitro* and *in vivo* assays. Zebrafish (*Danio rerio*) represents a vertebrate model organism with several advantages, such as transparent embryos and high genetic homology to humans. To evaluate the fluorescence intensity of glioblastoma cells, we used fluorescence microscopy. Results show that RECQ1 depletion affects cellular proliferation both *in vitro* and *in vivo*. Not only depletion but also the site of xenotransplantation have affected cell proliferation in zebrafish embryos. Additionally, we used immunocytochemistry to determine the proliferation rate of glioblastoma cells and acridine orange as a dye to identify apoptotic cells in zebrafish embryos.

## KAZALO VSEBINE

str.

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>XI</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XII</b>
<b>SLOVARČEK.....</b>	<b>XIV</b>
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA .....	1
1.2 NAMEN DELA .....	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE .....	1
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>2</b>
2.1 GLIOBLASTOM.....	2
<b>2.1.1 Lastnosti GBM.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.2 Proliferacija celic GBM.....</b>	<b>5</b>
2.2 HELIKAZE RECQ.....	5
<b>2.2.1 Helikaza RECQ1.....</b>	<b>6</b>
2.2.1.1 RNA-interferenca .....	7
2.3 CEBRICE ( <i>Danio rerio</i> ).....	8
<b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>10</b>
3.1 MATERIAL.....	10
<b>3.1.1 Kemikalije in reagenti .....</b>	<b>10</b>
<b>3.1.2 Laboratorijska oprema in plastični ter stekleni pripomočki.....</b>	<b>10</b>
<b>3.1.3 Protitelesa .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1.4 Celična linija U87-MG .....</b>	<b>12</b>
3.1.4.1 Ekspresijski vektor pCMV DsRed-Express2 (Clontech) .....	13
3.1.4.2 Ekspresijski vektor pSUPER.puro (Oligoengine) .....	13

<b>3.1.5</b>	<b>Gojišča in raztopine za celične klonе .....</b>	<b>14</b>
3.1.5.1	Sestava gojišča za divji tip celic U87-MG DsRed.....	14
3.1.5.2	Sestava gojišča za celična klonа non-shRNA in shRNA.....	14
3.1.5.3	Priprava 1× PBS .....	15
3.1.5.4	Priprava 4% BSA.....	15
3.1.5.5	Priprava 0,1% Triton X-100 .....	15
<b>3.1.6</b>	<b>Mediji in raztopine za delo z zarodki cebric .....</b>	<b>15</b>
3.1.6.1	Sestava vode ISO s PTU .....	15
3.1.6.2	Priprava 0,08% trikaina (trikain metansulfonat) .....	15
3.1.6.3	Priprava 4% PFA (formalina).....	15
3.2	METODE.....	16
<b>3.2.1</b>	<b>Delo s celičnimi linijami .....</b>	<b>16</b>
3.2.1.1	Gojenje celične linije .....	16
3.2.1.2	Štetje celic.....	16
<b>3.2.2</b>	<b>Proliferacija celic U87-MG DsRed <i>in vitro</i> .....</b>	<b>17</b>
3.2.2.1	Priprava celičnih klonov za poskus <i>in vitro</i> .....	17
3.2.2.2	Slikanje celic v poskusu <i>in vitro</i> .....	17
<b>3.2.3</b>	<b>Test proliferacije z imuncitokemijskim barvanjem proti označevalcu Ki-67 .....</b>	<b>17</b>
3.2.3.1	Priprava poli-L-lizinskih stekelc .....	17
3.2.3.2	Nasajanje celic U87-MG DsRed na poli-L-lizinska stekelca.....	18
3.2.3.3	Imuncitokemijsko barvanje .....	18
3.2.3.4	Štetje deleža celic U87-MG DsRed, pozitivnih za Ki-67.....	18
<b>3.2.4</b>	<b>Proliferacija celic U87-MG DsRed <i>in vivo</i> v zarodkih cebric (<i>Danio rerio</i>) .....</b>	<b>19</b>
3.2.4.1	Priprava celičnih klonov za ksenotransplantacijo.....	19
3.2.4.2	Priprava zarodkov za poskus <i>in vivo</i> ter ksenotransplantacija U87-MG DsRed v zarodke cebric .....	19
3.2.4.3	Slikanje in gojenje zarodkov cebric.....	20
3.2.4.4	Fiksacija zarodkov s 4% paraformaldehidom.....	20
<b>3.2.5</b>	<b>Detekcija apoptotičnih celic U87-MG DsRed v zarodkih cebric z barvilom akridin oranžno.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.6</b>	<b>Analiza slik in obdelava podatkov .....</b>	<b>21</b>
3.2.6.1	Analiza slik proliferacije celic <i>in vitro</i> ter obdelava podatkov.....	21

3.2.6.2	Analiza slik proliferacije celic <i>in vivo</i> ter obdelava podatkov.....	22
<b>3.2.7</b>	<b>Obdelava slik.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2.8</b>	<b>Statistična obdelava podatkov.....</b>	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>23</b>
4.1	UGOTAVLJANJE ŠTEVILA PROLIFERIRAJOČIH CELIC U87-MG DSRED V POSKUSU <i>IN VITRO</i> .....	23
4.2	UGOTAVLJANJE DELEŽA PROLIFERIRAJOČIH CELIC U87-MG DSRED Z IMUNOCITOKEMIJSKIM BARVANJEM PROTEINA KI-67.....	25
4.3	UGOTAVLJANJE PROLIFERACIJE CELIC U87-MG DSRED V POSKUSU <i>IN VIVO</i> V ZARODKIH CEBRIC ( <i>Danio rerio</i> ).....	26
<b>4.3.1</b>	<b>Proliferacija celic U87-MG DsRed v rumenjaskovi vrečki zarodkov cebric.....</b>	<b>27</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Proliferacija celic U87-MG DsRed v možganih zarodkov cebric.....</b>	<b>28</b>
4.4	UGOTAVLJANJE APOPTOTIČNIH CELIC V MOŽGANIH ZARODKOV CEBRIC ( <i>Danio rerio</i> ).....	30
4.5	POTOVANJE GLIOBLASTOMSKIH CELIC V POSKUSU <i>IN VIVO</i> .....	31
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA.....</b>	<b>33</b>
5.1	PROLIFERACIJA CELIC U87-MG DSRED V POSKUSU <i>IN VITRO</i> .....	33
5.2	TEST PROLIFERACIJE Z IMUNOCITOKEMIJSKIM BARVANJEM PROTI OZNAČEVALCU KI-67.....	34
5.3	PROLIFERACIJA CELIC U87-MG DSRED <i>IN VIVO</i> V ZARODKIH CEBRIC ( <i>Danio rerio</i> ).....	35
<b>5.3.1</b>	<b>Proliferacija celic U87-MG DsRed v rumenjaskovi vrečki zarodkov cebric.....</b>	<b>35</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Proliferacija celic U87-MG DsRed v možganih zarodkov cebric.....</b>	<b>36</b>
5.4	APOPTOZA CELIC U87-MG DSRED V MOŽGANIH ZARODKOV CEBRIC ( <i>Danio rerio</i> ).....	38
5.5	POTOVANJE GLIOBLASTOMSKIH CELIC V POSKUSU <i>IN VIVO</i> .....	39
<b>6</b>	<b>SKLEPI.....</b>	<b>41</b>
<b>7</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>42</b>
<b>8</b>	<b>VIRI.....</b>	<b>43</b>
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	



## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
<b>Pregl. 1.</b> Okvara genov za helikaze RecQ v povezavi z genetskimi motnjami in pojavnostjo raka. ....	6
<b>Pregl. 2.</b> Uporabljene kemikalije in reagenti ter njihovi proizvajalci. ....	10
<b>Pregl. 3.</b> Uporabljena laboratorijska oprema in njihovi proizvajalci. ....	10
<b>Pregl. 4.</b> Uporabljeni plastični, stekleni pripomočki in drobni laboratorijski material ter njihovi proizvajalci. ....	11
<b>Pregl. 5.</b> Uporabljena protitelesa in njihovi proizvajalci. ....	11
<b>Pregl. 6.</b> Uporabljeni celični kloni in njihov opis. ....	12

## KAZALO SLIK

str.

<b>Sl. 1.</b> Povprečna stopnja preživetja bolnikov z glioblastomom, ki z leti po postavitvi diagnoze močno upada. ....	2
<b>Sl. 2.</b> Gliomi lahko migrirajo po različnih strukturah v možganih.....	3
<b>Sl. 3.</b> Genetske spremembe, ki so povezane z nastankom primarnih in sekundarnih GBM... ..	5
<b>Sl. 4.</b> Ektopično (levo) in ortotopično (desno) injicirane celice glioblastoma v 48 ur starih zarodkih cebric pri 40× povečavi .....	9
<b>Sl. 5.</b> Divji tip glioblastomskih celic U87-MG v celični kulturi pri 100× povečavi. ....	12
<b>Sl. 6.</b> Shema ekspresijskega vektorja pCMV DsRed-Express2.....	13
<b>Sl. 7.</b> Shema ekspresijskega vektorja pSUPER.puro z vstavljenim promotorjem gena za polimerazo-III H1-RNA .....	14
<b>Sl. 8.</b> Časovni prikaz proliferacije glioblastomskih celic U87-MG DsRed (shRNA, non-shRNA, divji tip) v poskusu <i>in vitro</i> .....	23
<b>Sl. 9.</b> Spreminjanje relativnega števila glioblastomskih celic U87-MG DsRed (shRNA, non-shRNA, divji tip) v odvisnosti od časa. ....	24
<b>Sl. 10.</b> Prikaz testa proliferacije s fluorescentnim barvanjem označevalca Ki-67 v glioblastomskih celicah U87-MG DsRed pri 200× povečavi.....	25
<b>Sl. 11.</b> Relativni delež proliferirajočih glioblastomskih celic v odvisnosti od celičnega klona (shRNA, non-shRNA, divji tip).....	26
<b>Sl. 12.</b> Časovni prikaz proliferacije glioblastomskih celic U87-MG DsRed (shRNA, non-shRNA, divji tip) v rumenjaskovi vrečki zarodkov cebric. ....	27
<b>Sl. 13.</b> Spreminjanje relativne jakosti fluorescence v rumenjaskovi vrečki zarodkov cebric v odvisnosti od časa. ....	27
<b>Sl. 14.</b> Časovni prikaz proliferacije glioblastomskih celic U87-MG DsRed (shRNA, non-shRNA, divji tip) v možganih zarodkov cebric.....	28
<b>Sl. 15.</b> Spreminjanje relativne jakosti fluorescence v možganih zarodkov cebric v odvisnosti od časa. ....	29

- Sl. 16.** Primerjava spreminjanja relativne jakosti fluorescence glede na mesto ksenotransplantacije celic *in vivo* v zarodkih cebric v odvisnosti od časa. .... 30
- Sl. 17.** Apoptotične glioblastomske celice U87-MG DsRed (shRNA, non-shRNA, divji tip) v možganih zarodkov cebric, označene s puščico, 100× povečava..... 31
- Sl. 18.** Zarodek cebrice z injiciranimi glioblastomskimi celicami U87-MG DsRed v možganih zadnji dan poskusa, pri katerem smo opazili potovanje tumorskih celic v posteriorni del (obkroženo) vzdolž hrbtenjače pri 40× povečavi. .... 31
- Sl. 19.** Fluorescenčni kanal slik invazije celic U87-MG DsRed (obkroženo) iz možganov v posteriorni del zarodka vzdolž hrbtenjače pri 40× povečavi. .... 32

## KAZALO PRILOG

**Pril. A.** Preglednica s prvotnimi slikami barvanja zarodkov cebric z akridin oranžnim, ki smo jih za prikaz v rezultatih (poglavje 4.4) obdelali s programoma GIMP in Adobe Photoshop.

**Pril. B.** Preglednica s prvotnima slikama zarodka cebrice, pri katerem smo opazili potovanje tumorskih celic v posteriorni smeri.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<b>AKT</b>	protein-kinaza B (tudi PKB; angl. <i>protein kinase B</i> )
<b>AKT/mTOR</b>	signalna pot
<b>ATP</b>	adenozin trifosfat
<b>BLM</b>	helikaza RecQ, povezana z Bloomovim sindromom (angl. <i>Bloom syndrome RecQ like helicase</i> )
<b>BSA</b>	goveji serumski albumin (angl. <i>bovine serum albumin</i> )
<b>DMEM</b>	Dulbeccov modificiran Eaglov medij (angl. <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> )
<b>DPBS</b>	Dulbeccov fosfatni pufer s soljo (angl. <i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i> )
<b>DSB</b>	popravljanje dvojnega preloma DNA (angl. <i>double-strand break repair</i> ),
<b>dsH<sub>2</sub>O</b>	destilirana sterilna voda
<b>DsRed</b>	rdeč fluorescentni protein, izoliran iz korale <i>Discosoma</i> sp. (angl. <i>Discosoma sp. red fluorescent protein</i> )
<b>EDTA</b>	etilendiaminotetraacetna kislina (angl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
<b>EGFR</b>	receptor za epidermalni rastni faktor (angl. <i>epidermal growth factor receptor</i> )
<b>EXO1</b>	eksonukleaza 1
<b>FBS</b>	fetusni serum goveda (angl. <i>fetal bovine serum</i> )
<b>GBM</b>	glioblastom
<b>helikaza RECQ1</b>	od ATP odvisna DNA helikaza Q1 (angl. <i>ATP-dependent DNA helicase Q1</i> )
<b>ID</b>	angl. <i>integrated density</i>
<b>LOH 10q</b>	izguba heterozigotnosti na daljši ročici desetega kromosoma (angl. <i>loss of heterozygosity on chromosome 10q</i> )
<b>MEM</b>	minimalni Eaglov medij (angl. <i>minimum essential medium</i> )
<b>MLH1-PMS2</b>	heterodimer, sestavljen iz popravljalnega proteina MLH1 (angl. <i>DNA mismatch repair protein Mlh1</i> ) in eksonukleaze PMS2 (angl. <i>mismatch repair endonuclease PMS2</i> )
<b>MSH2/6</b>	kompleks popravljalnih proteinov MSH2 in MSH6 (angl. <i>DNA mismatch repair protein Msh</i> )
<b>mTOR</b>	signalna pot (angl. <i>mammalian target of rapamycin</i> )
<b>NEAA</b>	raztopina neesencialnih aminokislin (angl. <i>non-essential amino acid solution</i> )
<b>NTP</b>	nukleozid trifosfat
<b>P/S</b>	penicilin-streptomycin
<b>PDGFR</b>	receptor za trombocitni rastni faktor (angl. <i>platelet-derived growth factor receptor</i> )
<b>PFA</b>	paraformaldehid

<b>PI</b>	propidijev jodid (angl. <i>propidium iodide</i> )
<b>PTEN</b>	homolog fosfataze in tenzina (angl. <i>phosphatase and tensin homolog</i> )
<b>PTU</b>	N-feniltiourea (angl. <i>N-phenylthiourea</i> )
<b>RB</b>	retinoblastom
<b>RNAi</b>	RNA-interferenca
<b>RQC</b>	domena RecQ na C-terminalnem koncu
<b>SE</b>	standardna napaka (angl. <i>standard error</i> )
<b>shRNA</b>	kratka lasnična RNA (angl. <i>short hairpin RNA</i> )
<b>siRNA</b>	mala interferenčna RNA (angl. <i>small interfering RNA</i> )
<b>SZO</b>	svetovna zdravstvena organizacija
<b>Top1</b>	DNA topoizomeraza 1
<b>U87-MG</b>	celice malignega glioma
<b>U/mL</b>	enot na mililiter raztopine (angl. <i>units per volume solution</i> )
<b>V/V</b>	volumski odstotek
<b>WRN</b>	helikaza RecQ, povezana z Wernerjevim sindromom (angl. <i>Werner syndrome RecQ like helicase</i> )
<b>γ-H2AX</b>	gama-H2AX

## SLOVARČEK

<b>angiogeneza</b>	proces nastajanja novih krvnih žil iz že obstoječih žil
<b>astrociti</b>	najštevilčnejše celice glije, ki so pomembne za energijski metabolizem celotnih možganov
<b>astroцитom</b>	možganski tumor, ki se razvije iz celic astrocitov
<b>Baller-Geroldov sindrom</b>	redka genetska bolezen, pri kateri pride do prezgodnjega zraščanja možganskih kosti ter deformacije obraznih kosti, kosti v podlakti in dlani
<b>Bloomov sindrom</b>	vrsta pritlikavosti, ki se deduje avtosomno recesivno, bolniki pa so občutljivi na sončne žarke in imajo slabšo splošno imunsko zaščito
<b>celice glije</b>	podporne celice v centralnem živčnem sistemu, ki jih nadalje razdelimo na astrocite, oligodendrocite in celice mikroglije
<i>de novo</i>	od začetka, na novo
<b>difuzna infiltracija</b>	razpršeno širjenje oz. vdor celic v tkiva (organe), kjer običajno niso prisotne
<b>ekstracelularni (zunajcelični) matriks</b>	ali medceličnina je snov, ki zapolnjuje prostor med celicami in jim nudi oporo, orientacijo, omogoča medcelične interakcije ter nastanek vezivnega tkiva
<b>homologen</b>	enak po zgradbi in delovanju ali pa izhaja iz istega izvora (razvojno)
<i>in vitro</i>	izven živega, v epruveti ali v posodi za kulturo tkiva; izraz se v naravoslovju nanaša na procese v epruveti oziroma v umetnem okolju (laboratoriju)
<i>in vivo</i>	v živem organizmu; izraz se v naravoslovnem izrazoslovju uporablja za poskuse in procese, ki potekajo znotraj živega organizma
<b>konfluenca</b>	zlivanje, preraščenost dna gojitvene posodice s celicami; če so celice konfluentne, pomeni, da so popolnoma prerasle dno posode

<b>krvno-možganska bariera</b>	pregrada iz endotelijskih celic, bazalne membrane, aksonov astrocitov in pericitov, ki selektivno uravnava vnos snovi iz krvi v možgane
<b>ksenotransplantacija</b>	presaditev celic, tkiva ali organa iz ene vrste v drugo vrsto (darovalec in prejemnik nista iste vrste); <ul style="list-style-type: none"><li>– ortotopična ~ presaditev na normalno mesto</li><li>– ektopična ~ presaditev na drugo mesto glede na mesto odvzema</li></ul>
<b>maligen</b>	celica oz. skupina celic izgubi zmožnost strukturne diferenciacije, postanejo invazivne in tvorijo zasevke oz. metastaze
<b>metabolizem DNA</b>	proces vzdrževanja celične DNA – sinteza in razgradnja DNA, ki sta vpleteni tudi v podvojevanje in popravljanje DNA
<b>metastaza</b>	ali zasevek je skupek rakastih celic, ki se razširi iz prvotnega žarišča na drugo mesto v telesu, kjer začne enako bolezen
<b>mitotična smrt</b>	celična smrt v času mitoze
<b>možganske ovojnice</b>	možgane ovijajo tri ovojnice – pia mater, arahnoida in dura mater
<b>nekroza</b>	neprogramirana celična smrt, do katere pride zaradi poškodbe celice
<b>oligoastrocitom</b>	možganski tumor, ki se razvije iz dveh vrst celic, astrocitov in oligodendrocitov
<b>oligodendrogliom</b>	možganski tumor, ki se razvije iz celic oligodendrocitov
<b>ortolog</b>	ortologni geni so prisotni v različnih vrstah in so podobni zaradi skupnega izvora, nastajajo s speciacijo
<b>pleomorfen</b>	celice so različnih oblik in velikosti
<b>prognoza</b>	napoved za potek bolezni glede na histološki tip tumorja, lokacijo, velikost, lokalno širjenje, zasevanje, starost in splošno stanje bolnika ter radio- in kemorezistentnost
<b>proliferacija</b>	rast in razmnoževanje celic
<b>proteaza</b>	encim, ki katalizira hidrolizo peptidnih vezi v proteinih



<b>RAPADILINO sindrom</b>	avtosomno recesivna bolezen, bolniki so nizke rasti in imajo še druge deformacije; kratica izhaja iz angl. <i>radial hypoplasia/aplasia, patellae hypoplasia/aplasia and cleft or highly arched palate, diarrhoea and dislocated joints, little size and limb malformation, nose slender and normal intelligence</i>
<b>reaktivna gliozna</b>	molekularne, celične in funkcionalne spremembe astrocita, ki se pojavijo kot odgovor na poškodbe ali bolezni centralnega živčnega sistema
<b>Rothmund-Thomsonov sindrom</b>	redka avtosomno recesivna bolezen, ki se kaže kot motnja v pigmentaciji kože in občutljivost bolnika na svetlobo
<b>senescenca</b>	proces, ki vodi v prenehanje delitve celic, akumulacijo metabolnih produktov ali celično smrt
<b>subarahnoidni prostor</b>	prostor, ki se nahaja med možganskima ovojnicama pia mater in arahnoido in je zapolnjen s cerebrospinalno tekočino
<b>Wernerjev sindrom</b>	avtosomno recesivna bolezen prezgodnjega staranja

## 1 UVOD

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Hitra rast, invazija, nekroza in angiogeneza so lastnosti izredno agresivnega glioblastoma (v nadaljevanju GBM), ki je med možganskimi tumorji najpogostejši. Slaba prognoza in kratka doba preživetja bolnikov ob standardnem zdravljenju s kirurgijo, kemoterapijo in radioterapijo sta glavna razloga za odkrivanje novih terapevtskih pristopov (Ocvirk, 2009; Kesari, 2011; Marumoto in Saya, 2012). Kot potencialna tarča se kaže encim RECQ1 iz družine helikaz RecQ, ki vzdržujejo stabilnost genoma (Hickson, 2003).

V našem delu smo z uporabo fluorescenčne mikroskopije želeli preučiti vpliv utišanja helikaze RECQ1 na proliferacijo humanih glioblastomskih celic U87-MG, ki izražajo gen za rdeč fluorescentni protein DsRed. Proliferacijo celic smo spremljali tako *in vitro* kot tudi *in vivo* v zarodkih cebric. Cebrice (*Danio rerio*) so odličen vretenčarski model za raziskave rakavih celic in za razliko od mišjih modelov zahtevajo manj časa in laboratorijskega dela. Ksenotransplantacija fluorescentno označenih tumorskih celic omogoča opazovanje le teh v prosojnih zarodkih cebric pri visoki ločljivosti v realnem času (Yang in sod., 2013; Vittori in sod., 2015).

### 1.2 NAMEN DELA

Namen magistrskega dela je ugotoviti, ali utišanje RECQ1 vpliva na proliferacijo humanih glioblastomskih celic U87-MG DsRed in ali utišanje vpliva na njihov proliferacijski potencial oziroma na podvrženost celic k apoptozi.

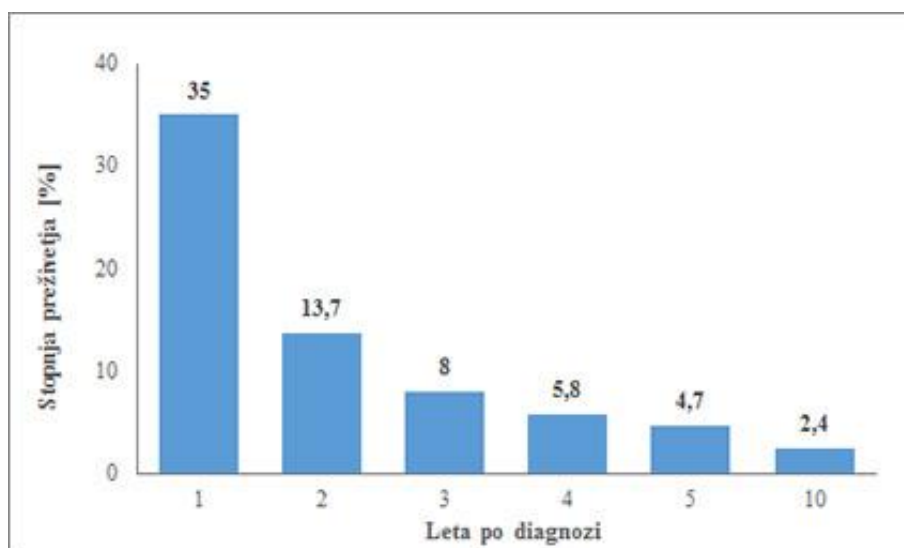
### 1.3 DELOVNE HIPOTEZE

- I. Utišanje izražanja helikaze RECQ1 bo upočasnilo proliferacijo celic U87-MG DsRed *in vitro* ter *in vivo*.
- II. Utišanje helikaze RECQ1 bo upočasnilo proliferacijo celic GBM ali zmanjšalo njihovo preživetje tako pri ortotopični implantaciji celic GBM v možgane zarodkov kot pri ektopični implantaciji v rumenjarkovo vrečko.
- III. Utišanje helikaze RECQ1 bo povečalo podvrženost celic GBM k apoptozi *in vivo*.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 GLIOBLASTOM

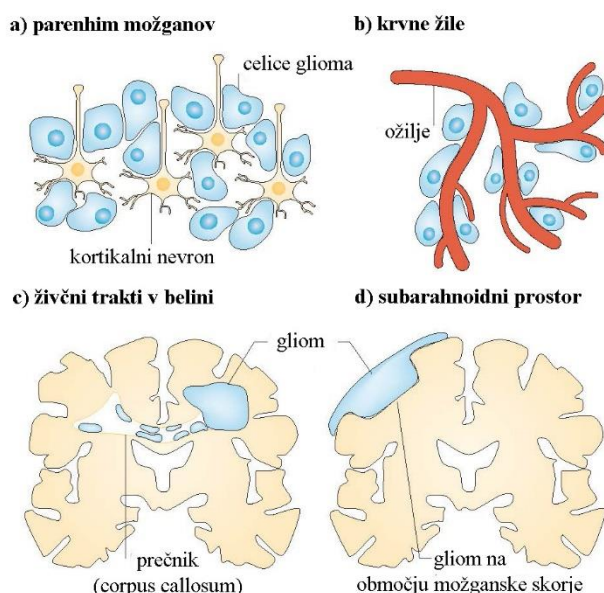
Tumorje, ki se razvijejo iz celic glije, imenujemo gliomi in so najpogostejši tumorji v centralnem živčnem sistemu. Histološko jih razdelimo na astrocitome, oligodendrogliome in oligoastrocitome. Svetovna zdravstvena organizacija (angl. *World Health Organization*; WHO) glede na stopnjo malignosti deli astrocitome v štiri razrede (I–IV). GBM sodi v razred IV zaradi najnevarnejših značilnosti malignosti (nekroza, proliferacija ožilja, pleomorfizem) in je prav zaradi teh lastnosti tudi najbolj agresiven možganski tumor (Marumoto in Saya, 2012). Hkrati predstavlja tudi najpogostejšo vrsto možganskih tumorjev s povprečno dobo preživetja okoli 15 mesecev. Incidenca GBM je do 3/100.000 prebivalcev na leto, prognoza bolnikov z GBM pa je slaba, saj 5 let po diagnozi preživi manj kot 5% bolnikov (Sl. 1) (Ocvirk, 2009; Thakkar in sod., 2014).



**Slika 1. Povprečna stopnja preživetja bolnikov z glioblastomom, ki z leti po postavitvi diagnoze močno upada (Thakkar in sod., 2014: 22).**

GBM se pojavljajo v predelu velikih možganov (najpogosteje v senčnem in temenskem režnju), možganskega debla ali malih možganov (Bruce in Kennedy, 2009; Urbańska in sod., 2014). Metastaze izven možganov so zelo redke na račun hitre rasti tumorja in kratkega poteka bolezni ter zaradi odsotnosti limfnih žil v možganih (Bernstein in Woodard, 1995; Urbańska in sod., 2014). Kljub temu, da celice GBM ne vdirajo v krvne žile v možganih, pa ožilje vseeno predstavlja glavno pot migracije tumorskih celic v druge predele možganov (Bernstein in Woodard, 1995; Cuddapah in sod., 2014). Celice glioma med migracijo po žilah izpodrivajo aksone astrocitov, ki obdajajo krvne žile v možganih in so del krvno-možganske bariere. Poleg tega razgrajujejo tudi bazalno membrano in tesne stike med celicami endotela, zaradi česar pride do izhajanja snovi iz žil. Razgradnja fizičnih ovir, med katere sodi tudi ekstracelularni matriks, je ena izmed lastnosti malignih celic. Celice GBM lahko migrirajo po perivaskularnem prostoru, ki obdaja ožilje v subarahnoidnem prostoru ali

preko možganskega parenhima, v katerem se nahajajo nevroni in celice glije. Sestava ekstracelularnega matriksa znotraj parenhima onemogoča migracijo tumorskih celic, zato le te izločajo različne proteaze, ki razgrajujejo komponente ekstracelularnega matriksa. Migracija celic lahko poteka tudi preko živčnih traktov v belini ali po subarahnoidnem prostoru (Sl. 2) (Alves in sod., 2011; Gritsenko in sod., 2012; Cuddapah in sod., 2014).



**Slika 2. Gliomi lahko migrirajo po različnih strukturah v možganih (a, b, c, d).** Te poti je prvi opisal Hans Joachim Scherer leta 1938 (Cuddapah in sod., 2014: 4).

Invazija tumorskih celic v druge predele možganov je pogost pojav, metastaziranje izven možganov pa zelo redko. Eden izmed dejavnikov, ki, poleg že naštetih, lahko vpliva na nizko pojavnost možganskih tumorjev izven možganov, je tudi pomanjkanje rastnih faktorjev oz. neustrezno okolje za rast tumorja v drugih predelih telesa (Alves in sod., 2011; Cuddapah in sod., 2014). Huang in sod. (1995) so ugotovili, da je pojav metastaz izven možganov pri kar 95,9% bolnikov povezan z možganskimi operacijami (odstranitev tumorja, vstavljanje drenažnega spoja (angl. *shunt*)). Pri operaciji namreč lahko pride do poškodb možganskih ovojnic ali krvno-možganske bariere, kar omogoči prehod tumorskih celic v krvne ali limfne žile (Bernstein in Woodard, 1995; Kim in sod., 2014).

Standardno zdravljenje GBM zajema maksimalno kirurško odstranitev tumorja, ki ji sledi kombinacija radioterapij in kemoterapij (običajno s temozolomidom) (Carlsson in sod., 2014; Gallego, 2015). Način zdravljenja je odvisen predvsem od lokacije, lastnosti tumorja, med katerimi je pomembnejša heterogenost tumorja (Mrugala, 2013; Motaln in sod., 2015), ter starosti bolnika ob odkritju bolezni (Carlsson in sod., 2014). S prej naštetimi terapijami pa pogosto ne odstranimo vseh rakavih celic, zaradi česar se bolezen ponovi ali napreduje (Ocvirk, 2009; Gallego, 2015). Popolna odstranitev GBM s kirurškim posegom ni mogoča zaradi difuznih infiltrirajočih robov tumorja ali poškodb zdravega tkiva, ki bi nastale pri posegu (Mrugala, 2013; Gallego, 2015). Tudi zdravljenje s kemoterapijami ima svoje omejitve – veliko kemoterapevtikov namreč ne more prečkati krvno-možganske bariere. Ker

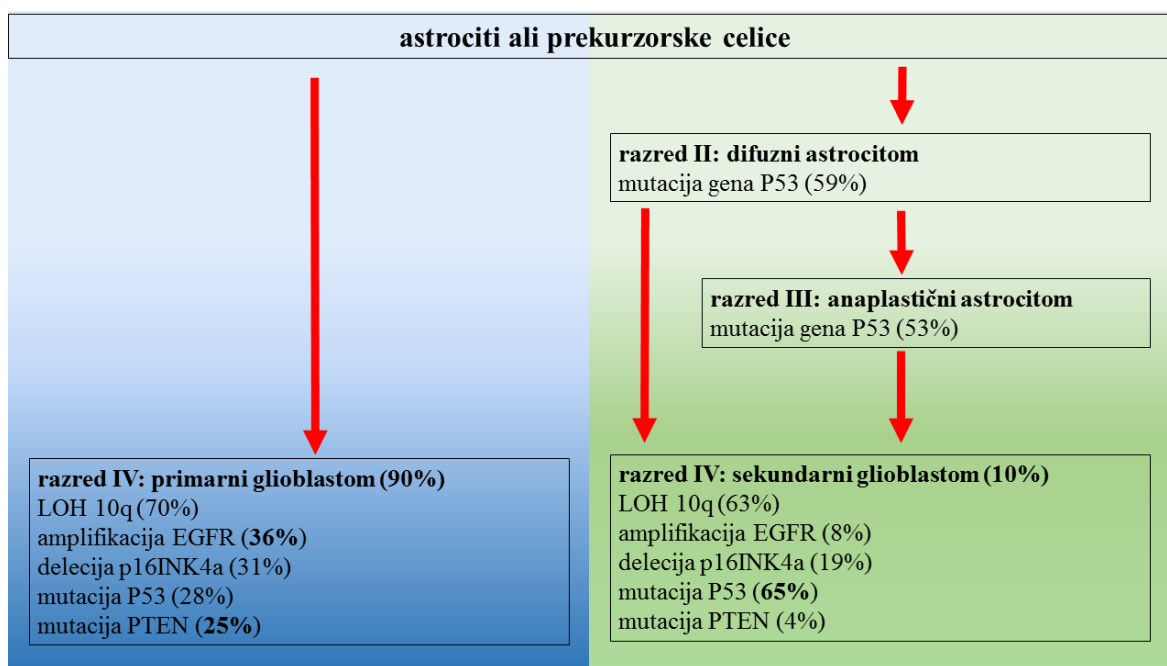
GBM sestavljajo različne vrste celic, kemoterapija ni enako učinkovita za vse vrste celic GBM (Mrugala, 2013; Motaln in sod., 2015). Poleg tega tumorske celice lahko razvijejo kemorezistenco, npr. zaradi hipoksije v tumorskem mikrookolju (Haar in sod., 2012), ki vpliva tudi na učinkovitost radioterapije (Chang in sod., 2007).

Povprečna doba preživetja brez zdravljenja je le 3 mesece (Bruce in Kennedy, 2009), zato znanstveniki iščejo nove načine zdravljenja. Eden izmed teh pristopov je tarčno zdravljenje, s katerim vplivamo na prenos signalov, in pa biološka ter genska terapija, ki ponujata novo upanje za bolnike z GBM (Serša, 2009).

### 2.1.1 Lastnosti GBM

Aktivacija onkogenov in inaktivacija tumor-supresorskih genov vodita v nastanek GBM zaradi spremenjenega izražanja genov za proteine, ki sodelujejo pri ohranjanju celične homeostaze, regulaciji celičnega cikla in interakciji z drugimi celicami v centralnem živčnem sistemu (Goldlust in sod., 2008). Spremenjeno izražanje genov je povezano z malignimi značilnostmi GBM, kot so nekontrolirana delitev celic, difuzna infiltracija v okoliško tkivo možganov, nekroza, angiogeneza, upiranje celični smrti in genomska nestabilnost (Furnari in sod., 2007).

GBM razdelimo v dve skupini, na primarne in sekundarne GBM. Večino GBM (90%) predstavljajo primarni GBM, ki nastanejo *de novo* in se pojavljajo pri starejših pacientih. Sekundarni GBM se običajno razvijejo iz difuznih (razred II po SZO) ali anaplastičnih astrocitomov (razred III po SZO) pri pacientih, mlajših od 45 let, prognoza pri teh bolnikih pa je bistveno boljša. Ti dve skupini GBM sta si histološko zelo podobni, medtem ko se genetsko in epigenetsko razlikujeta (Marumoto in Saya, 2012; Ohgaki in Kleihues, 2013). Pogosta genetska nepravilnost, ki jo najdemo pri 60–90% GBM, je izguba heterozigotnosti na daljši ročici desetega kromosoma (Sl. 3). Mutacija je značilna predvsem za GBM in redka pri drugih vrstah gliomov (Bruce in Kennedy, 2009). Za primarne GBM je značilna amplifikacija in/ali mutacija v genu EGFR, ki vodi v stalno aktivnost tega receptorja in lahko privede do proliferacije ter invazije tumorskih celic. Gen PTEN sodi med tumor-supresorske gene, njegova delecija pa sproži signalno pot AKT/mTOR, ki spodbuja preživetje, proliferacijo in invazijo celic primarnega GBM (Gladson in sod., 2010). Mutacije v tumor-supresorskem genu P53 in amplifikacija ali povečano izražanje gena PDGFR so značilne za sekundarne GBM (Bruce in Kennedy, 2009).



**Slika 3. Genetske spremembe, ki so povezane z nastankom primarnih in sekundarnih GBM.** Delecija gena p16INK4a vodi v nenadzorovano delitev celic. Odebeljeno zapisani odstotki se statistično značilno razlikujejo med obema skupinama GBM (Ohgaki in sod., 2004: 3).

Zaradi genetskih razlik med primarnimi in sekundarnimi GBM Kesari (2011) predpostavlja, da bo tudi odziv teh dveh skupin na tarčna zdravljenja drugačen. Seveda pa je poleg mutacij v genih potrebno upoštevati tudi vpliv tumorskih matičnih celic, heterogenost tumorja in tumorskega mikrookolja. Le s poznavanjem biologije tumorja lahko izboljšamo diagnozo in pripomoremo k razvoju tarčnih zdravil (Kesari, 2011).

### 2.1.2 Proliferacija celic GBM

Številne mutacije v genih, ki so vpleteni v uravnavanje celičnega cikla, vplivajo tudi na proliferacijo in senescenco celic GBM (Furnari in sod., 2007). p16Ink4a je od ciklina odvisen kinazni inhibitor, ki preko drugih proteinov vpliva na fosforilacijo proteina RB, ta pa je eden izmed proteinov, ki nadzirajo prehod celic iz faze G<sub>1</sub> v fazo S celičnega cikla (Hahn in Weinberg, 2002; Sherr in McCormick, 2002). Nepravilnosti v signalni poti RB sprožijo signalno pot P53, ki poskrbi, da celice izstopijo iz celičnega cikla ali gredo v apoptozo (Sherr in McCormick, 2002). Mutacije genov p16INK4a, RB in P53 v GBM so pogoste, kar pomeni, da tumor-supresorski poti P53 in RB ne delujeta in tako se tumorske celice lahko kljub mutacijam delijo, se ne starajo in ne gredo v apoptozo (Campisi, 2003; Ohgaki in sod., 2004).

### 2.2 HELIKAZE RECQ

Geni skrbniki (angl. *caretakers*) s procesi popravljanja DNA vzdržujejo stabilnost genoma in tako preprečujejo nastanek tumorjev (Kinzler in Vogelstein, 1997; Bunz, 2008; Chu in

Hickson, 2009). Med gene skrbnike sodijo tudi helikaze DNA iz družine RecQ, katerih ortologe najdemo v prav vseh kraljestvih, od bakterij pa vse do ljudi (Hickson, 2003). Pri enoceličnih organizmih običajno najdemo le en protein iz družine RecQ, pri mnogoceličarjih pa več (Campisi, 2003; Sharma in sod., 2006). Ljudje imamo pet različnih helikaz RecQ – WRN, BLM, RECQ4, RECQ1 in RECQ5. Mutacije v genih treh homologov so povezane z avtosomno recesivnimi boleznimi, katerih sindromi so prezgodnje staranje in povečana nagnjenost bolnikov k razvoju raka (Pregl. 1) (Furuichi, 2001; Brosh, 2013).

**Preglednica 1. Okvara genov za helikaze RecQ v povezavi z genetskimi motnjami in pojavnostjo raka (Brosh, 2013: 36; Sidorova in Monnat, 2015: 2).**

Gen	Bolezen	Vrsta tumorja	Funkcija helikaze
WRN	Wernerjev sindrom	tumor na ščitnici, melanomi, meningeomi, sarkomi, kostni rak, levkemije in limfomi	popravilo DSB, odziv na stres pri podvojevanju DNA
BLM	Bloomov sindrom	epitelijski tumorji (npr. rak na debelem črevesu, dojkah in pljučih), levkemije, limfomi, redke vrste otroških tumorjev (npr. retinoblastom)	popravilo DSB, popravilo napak, ki nastanejo pri podvojevanju DNA
RECQ4	Rothmund-Thomsonov sindrom, Baller-Geroldov sindrom, RAPADILINO sindrom	kostni rak, limfomi	podvojevanje DNA, vzdrževanje stabilnosti mitohondrijske DNA, popravilo endogenih poškodb baz

Helikaze RecQ so encimi, ki energijo, pridobljeno s hidrolizo NTP (običajno ATP), uporabijo za odvijanje dvojne vijačnice DNA (Sharma in sod., 2006). Ti proteini se nahajajo v jedru celice (Furuichi, 2001) in so udeleženi pri podvojevanju DNA, rekombinaciji, popravljalnih mehanizmih (Bachrati in Hickson, 2008; Bohr, 2008), transkripciji (Croteau in sod., 2014) ter vzdrževanju dolžine telomer. Sodelujejo tudi pri prehodu celic iz faze G<sub>1</sub> v fazo S celičnega cikla (Hickson, 2003; Sharma in sod., 2006). DNA helikaze RecQ interagirajo tudi med seboj, tako da se njihove vloge v različnih metabolnih poteh DNA prekrivajo ali dopolnjujejo (Croteau in sod., 2014).

### 2.2.1 Helikaza RECQ1

RECQ1 (imenovana tudi RECQL ali RECQL1) je najmanjša (molekulska masa 73 kDa), a hkrati najpogostejša helikaza v človeških celicah (Sharma in Brosh, 2008). Protein sestavljata dve domeni – osrednja helikazna domena, katere vloga je vezava in hidroliza ATP, ter domena RQC, ki je odgovorna za vezavo DNA in interakcijo z drugimi proteini (Bennett in Keck, 2004; Chu in Hickson, 2009). Helikaza RECQ1 sodeluje pri odvijanju dvojne vijačnice DNA od konca 3' proti koncu 5' (Mendoza-Maldonado in sod., 2011), odvija pa tudi zanke D (angl. *displacement loop*) in Holliday-eve strukture (angl. *Holliday Junction*), ki nastanejo med homologno rekombinacijo (Sharma in sod., 2005). Sharma in Brosh (2007) sta ugotovila, da utišanje RECQ1 z RNA-interferenco vodi do povišanja izmenjave sestrskih kromatid (angl. *sister chromatid exchange*), kar je posledica neuspešnega popravljanja dvojnega preloma DNA s homologno rekombinacijo (Sharma in

Brosh, 2007). RECQ1 preprečuje izmenjavo sestrskih kromatid in tako vzdržuje stabilnost genoma (Sharma in Brosh, 2007; Sharma in Brosh, 2008). Preko interakcij s popravljalnimi encimi DNA (EXO1, MSH2/6, MLH1-PMS2) je RECQ1 vpletena v popravljanje neujemanja (angl. *mismatch repair*) in popravljanje z rekombinacijo (Doherty in sod., 2005). Helikaza RECQ1 posreduje tudi pri prilaganju dveh komplementarnih enoverižnih molekul DNA (Sharma in sod., 2005). Rezultati raziskave Li in sod. (2014) kažejo na to, da RECQ1 vpliva tudi na razvoj in napredovanje tumorjev, saj nadzoruje izražanje genov, ki spodbujajo migracijo, invazijo in metastaziranje rakavih celic (Li in sod., 2014).

V hitro delečih se celicah, med katere sodijo tudi rakave, je sinteza proteina RECQ1 povišana (Futami in sod., 2008a). Povišano izražanje RECQ1 so zaznali pri GBM (Mendoza-Maldonado in sod., 2011), raku jajčnikov (Sanada in sod., 2013) in raku spodnjega dela žrela (Arai in sod., 2011), kar je verjetno posledica popravljanja DNA-intermediatov, ki nastanejo med podvojevanjem (Sharma in Brosh, 2008). Za pravilno podvojevanje DNA je potreben encim Top1, ki prekine eno od verig DNA, spusti segment vijačnice skozi prelom in ponovno združi verigo DNA pred replikacijskimi vilicami ter na ta način zmanjša napetost, ki nastane zaradi odvijanja DNA (Avendaño in Menendez, 2008). Inhibitorji Top1 (npr. kamptotecin) so protirakave učinkovine, ki stabilizirajo komplekse Top1-DNA (angl. *Top1-DNA cleavage complex*) (Pommier, 2009) in zaustavijo podvojevanje DNA. Helikaza RECQ1 sodeluje pri ponovni vzpostavitvi aktivnih replikacijskih vilic, ki so se zaustavile zaradi inhibicije Top1 (Berti in sod., 2013).

Mutacije v genu za helikazo RECQ1 niso neposredno povezane z genetskimi boleznimi (Pregl. 1), vendar so polimorfizmi posameznih nukleotidov (angl. *single nucleotide polymorphism*) v tem genu povezani z zmanjšano možnostjo preživetja pacientov z rakom trebušne slinavke. Polimorfizem posameznih nukleotidov v genu za RECQ1 bi zato lahko služil kot napovedni dejavnik za potek bolezni in izid zdravljenja (Li in sod., 2006a; Li in sod., 2006b).

### 2.2.1.1 RNA-interferenca

RNA-interferenca (v nadaljevanju RNAi) je proces posttranskripcijskega utišanja genov z nastankom dvoverižne RNA (v nadaljevanju dsRNA), ki inducira razgradnjo pripadajoče informacijske RNA (v nadaljevanju mRNA). RNazni encim Dicer razreže dsRNA na ~22 nukleotidov dolge male interferenčne RNA (v nadaljevanju siRNA), ki se povežejo s kompleksom RISC (angl. *RNA induced silencing complex*) in utišajo mRNA (Hannon in Rossi, 2004). Mehanizem RNAi je evolucijsko ohranjen pri številnih organizmih (rastline, *Neurospora*, *Drosophila*, *Caenorhabditis*, sesalci) in služi kot obramba pred virusi, sodeluje pri utišanju transpozonov, hkrati pa je lahko tudi del razvojnega programa pri evkariontih (Tijsterman in sod., 2002; Agrawal in sod., 2003). Sprva so znanstveniki mehanizem uporabljali za raziskovanje funkcij genov, danes pa RNAi skušajo uporabiti za zdravljenje različnih bolezni (Deng in sod., 2014). Gene v celicah sesalcev utišamo z uporabo siRNA. Za izražanje 21–23 nukleotidov dolge molekule dsRNA z dvema štrlečima nukleotidoma na koncu 3' se uporabljajo vektorski sistemi (Tuschl, 2002). Protismerne molekule siRNA se



povežejo s kompleksi nukleaz RISC in jih vodijo do tarčnih mRNA, ki so komplementarne protismernim siRNA. Kompleks RISC nato razreže tarčno mRNA, prepreči translacijo in tako je gen utišan (Chiu in Rana, 2003; Jackson in Linsley, 2010).

Futami in sod. (2008a) so z utišanjem helikaze RECQ1 sprožili proces t. i. »mitotične katastrofe« oz. mitotične celične smrti ter s tem preprečili proliferacijo rakavih celic. Učinkovitost utišanja RECQ1 je odvisna od hitrosti celičnega cikla, okvare nadzornih točk zaradi mutacij, npr. v genu P53, ter od nivoja izražanja RECQ1. Ker RNAi ni imela vpliva na rast normalnih celic, bi RECQ1 lahko postala ena izmed molekularnih tarč v protirakavih zdravljenjih. Kljub vsem obetom za zdravljenje s siRNA pa ostaja glavni problem varna in specifična dostava molekul do tarčnih organov in tkiv (Futami in sod., 2008a; Futami in sod., 2008b).

V magistrski nalogi smo uporabili humane glioblastomske celice U87-MG DsRed, ki so jim raziskovalci na sinhrotonu Elettra v Bazovici pri Trstu vstavili ekspresijski vektor pSUPER.puro (Oligoengine) z zapisom za siRNA, ki se veže na mRNA za helikazo RECQ1 in jo tako utiša.

### 2.3 CEBRICE (*Danio rerio*)

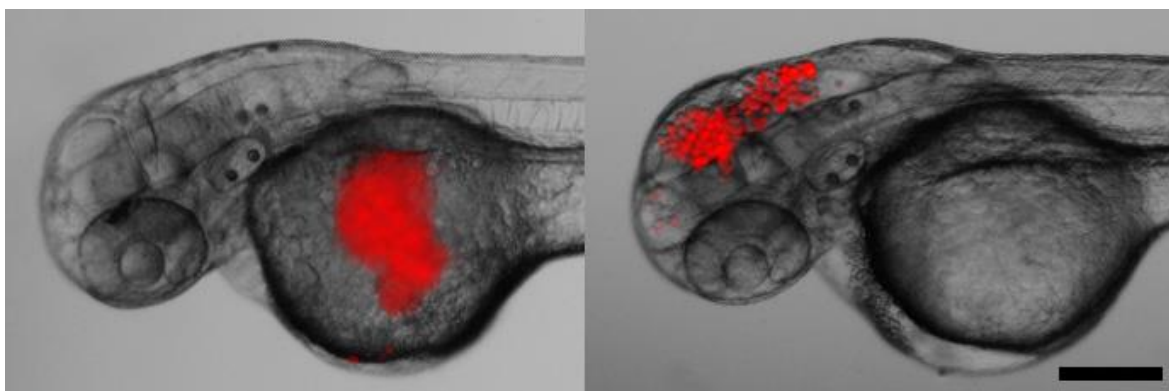
Cebrice (angl. *zebrafish*) so majhne sladkovodne ribe, pomembne kot modelni organizmi v raziskavah razvojne biologije, molekularne genetike, človeških bolezni ter tudi v toksikoloških študijah (Langheinrich, 2003). Prednosti cebric kot modelnih organizmov so (Langheinrich, 2003; Hill in sod., 2005; Kari in sod., 2007):

- fiziološke in genetske podobnosti z ljudmi;
- zunanja oploditev in razvoj, ki omogočata opazovanje in manipulacijo z zarodki;
- majhna velikost (< 1 mm v premeru) in prosojnost zarodkov omogočata relativno preprosto opazovanje notranjih organov pod mikroskopom;
- številčen zarod, saj samička v enem tednu lahko izleže več kot 100 jajčec;
- hiter razvoj zarodkov, saj se 48 ur po oploditvi že razvijejo glavni organi;
- med organogenezo so zarodki prepustni za majhne molekule, kar olajša vnos snovi;
- preprosto vzdrževanje, saj zarodke lahko gojimo kar v mikrotitrskih ploščah in s tem zmanjšamo stroške vzreje in stroške izvedbe poskusov.

Raziskave *in vitro* so za razliko od raziskav *in vivo* bolj preproste, hitrejše, potekajo na celičnih ali tkivnih kulturah v strogo nadzorovanih pogojih in omogočajo lahko kvantifikacijo rezultatov ter dobro ponovljivost. Poskusi potekajo v umetnem okolju in poenostavljeno posnemajo pogoje v organizmu ter nam omogočajo preučevanje molekularnih mehanizmov. Kljub temu pa pogoji v raziskavah *in vitro* ne odražajo dejanskih razmer v živem organizmu, zato je rezultate teh raziskav treba potrditi še z raziskavami *in vivo*. Cebrice predstavljajo odličen vretenčarski modelni organizem za raziskave proliferacije rakavih celic v realnem času (Batista Napotnik in Mlinarič-Raščan, 2005; Trdan Lušin in Trontelj, 2011; Vittori in sod., 2015). Ljudje si s cebricami delimo veliko genetskih

ter fizioloških podobnosti in kar 70% človeških genov ima vsaj en homologni gen v cebricah (Howe in sod., 2013; Zhao in sod., 2015). Vseeno pa je pri interpretaciji rezultatov potrebno upoštevati, da se mikrookolje v zarodkih cebric zaradi filogenetske oddaljenosti lahko razlikuje od tistega v človeškem telesu (Konantz in sod., 2012; Vittori in sod., 2015).

V poskusih za magistrsko nalogo smo zarodkom cebric v možgane (ortotopično) ali rumenjarkovo vrečko (ektotopično) injicirali humane glioblastomske celice. Celice izražajo gen za rdeč fluorescentni protein DsRed, kar nam je omogočilo opazovanje zarodkov s fluorescenčnim mikroskopom (Sl. 4).



**Slika 4. Ektotopično (levo) in ortotopično (desno) injicirane celice glioblastoma v 48 ur starih zarodkih cebric pri 40× povečavi. Merilo: 200 μm.**

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Kemikalije in reagenti

Preglednica 2. Uporabljene kemikalije in reagenti ter njihovi proizvajalci.

Kemikalija ali reagent	Proizvajalec
Akridin oranžno (A-6014)	Sigma
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O (kalcijev klorid dihidrat, 1176 mg/L, 102382)	Merck Millipore
DMEM (D5921)	Sigma
Fetusni serum goveda (10500-064)	Gibco
Fosfatni pufer s soljo (10×, 14200-067)	Gibco
Geneticin (1 mg/mL, 11811-023)	Gibco
Goveji serumski albumin (A9418)	Sigma
KCl (kalijev klorid, 22 mg/L, 104936)	Merck Millipore
L-glutamin (2 mM, G7513)	Sigma
MEM (1×, 51200-046)	Gibco
MEM NEAA (100×, M7145)	Sigma
Metanol (100%, 106009)	Merck Millipore
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (magnezijev sulfat heptahidrat, 493 mg/L, 105886)	Merck Millipore
NaHCO <sub>3</sub> (natrijev hidrogen karbonat, 252 mg/L, 131638)	Panreac AppliChem
Na-piruvat (100 mM, 100×, 11360-039)	Gibco
N-feniltiourea (≥98%, P7629)	Sigma-Aldrich
Paraformaldehid (95%, 158127)	Sigma-Aldrich
Penicilin in streptomycin (10,000 U/mL penicilina, 10 mg/mL streptomicina, 100×, P0781)	Sigma
Poli-L-lizin (založna koncentracija 400 µg/mL, P6282)	Sigma
Propidijev jodid (P4170)	Sigma
Puomicin (založna koncentracija 1 mg/mL)	Sigma
Sredstvo proti bledenju fluorescence (P36930)	Molecular Probes
Trikain (98%, E10521)	Sigma-Aldrich
Tripan modro (0,4%, T-8154)	Sigma
Tripsin-EDTA (0,25%, 1×, 25200-056)	Gibco
Triton X-100 (T8787)	Sigma

##### 3.1.2 Laboratorijska oprema in plastični ter stekleni pripomočki

Preglednica 3. Uporabljena laboratorijska oprema in njihovi proizvajalci.

Laboratorijska oprema	Tip in proizvajalec
Analitska tehtnica	CP225D, Sartorius
Avtomatska pipeta (angl. <i>pipetboy</i> )	IBS Integra Biosciences
Brezprašna komora – laminarij	Biosafe 2, Ehret GmbH c-[MaxPro] <sup>3</sup> -130, Iskra Pio M12, Iskra
Celični inkubator	Sanyo
Centrifuga	PLC-322, Tehnica Železniki
Hladilnik (4 °C)	Gorenje

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 2. Uporabljena laboratorijska oprema in njihovi proizvajalci.

Laboratorijska oprema	Tip in proizvajalec
Inkubator za cebrice	ICP 500, Memmert
Invertni mikroskop	Nikon Diaphot Nikon Eclipse TS100 Fluorescenčni invertni mikroskop Nikon Eclipse Ti s programsko opremo NIS elements Nikon Eclipse TE300 – s programsko opremo NIS elements (različica F 2.30)
Mikroinjektor	Tritech research
Namizni vibracijski stresalnik	MS 1 Minishaker, IKA MS 3 digital, IKA
Pipete	0,5–10 µL, 10–100 µL, 20–200 µL, 100–1000 µL, Corning Lambda
Stereomikroskop	Nikon SMZ1500
Vakuumski sesalnik (Vacuboy in Vacusafe)	Integra Biosciences
Zamrzovalnik	-20 °C, Beko -80 °C, Angelantoni scientifica

**Preglednica 4. Uporabljeni plastični, stekleni pripomočki in drobni laboratorijski material ter njihovi proizvajalci.**

Plastični in stekleni pripomočki	Tip in proizvajalec
Borosilikatna steklena kapilara	Naprava za vlečenje kapilar P-97, Sutter Instrument
Centrifugirke	15 mL, 50 mL, Corning
Gojitvene platenke	25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , Corning
Hemocitometer	0,00025 mm <sup>2</sup> ; Bürker-Türk, Blau Brand
Kapalke (angl. <i>Pasteur pipettes</i> )	3 mL, Brand
Krovno stekelce	24 · 40 mm, Thermo Scientific
Magnetno mešalo in magnetne palčke	Tehtnica Železniki
Mikrocentrifugirke	0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL, Corning
Mikrotitrne plošče	24 vdolbinic, Cellstar; 48 in 96 vdolbinic, Nunclon
Nastavki za pipete	0,5–10 µL, 10–100 µL, 20–200 µL, 100–1000 µL, Costar
Objektno stekelce	76 · 36 mm, Thermo Scientific
Okrogla krovna stekelca	Premer 12 mm, 1001/12, Assistent
Parafilm	American National Can.
Petrijevke	100 · 20 mm, Costar
Pinceta	SS135-Inox-E, Dumont
Stripete	5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL, Costar

### 3.1.3 Protitelesa

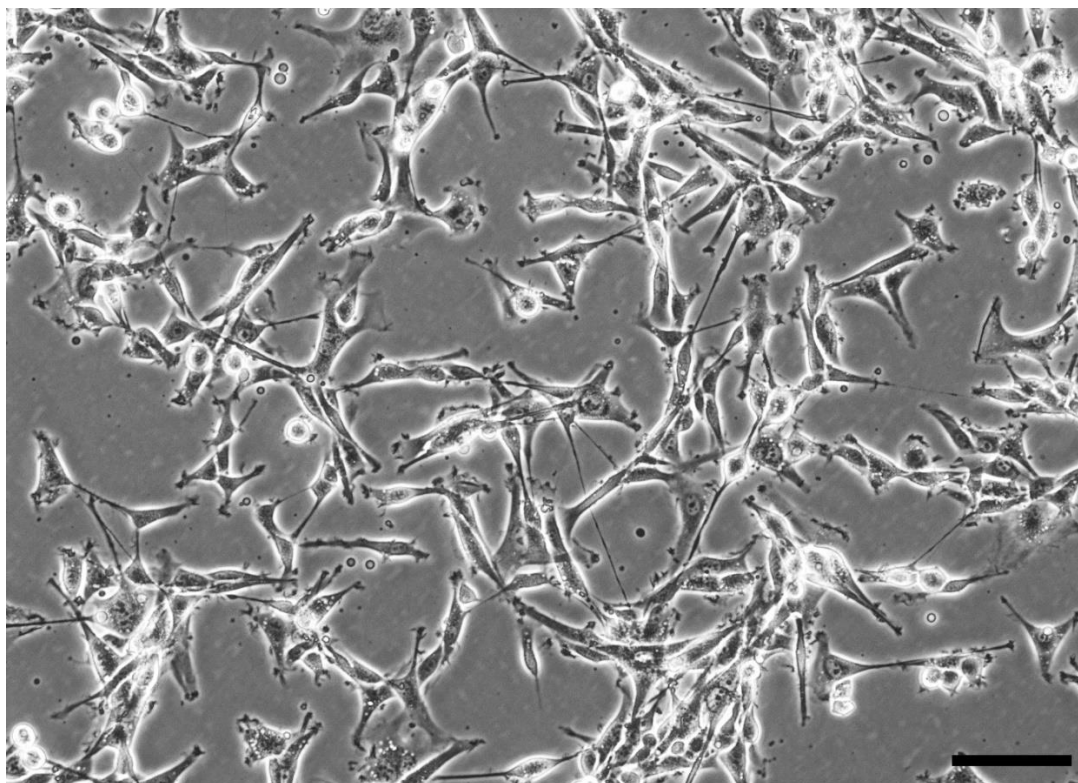
**Preglednica 5. Uporabljena protitelesa in njihovi proizvajalci.**

Protitelo	Proizvajalec
Kunčja poliklonska primarna protitelesa proti Ki-67 (ab15580)	Abcam
Kozja protikunčja sekundarna protitelesa, konjugirana z Alexa Fluor® 488 (A-11054)	Molecular probes

Ki-67 je jedrni protein, ki se izraža samo v aktivnih fazah celičnega cikla, zato ga uporabljamo kot označevalec za proliferirajoče celice (Scholzen in Gerdes, 2000).

### 3.1.4 Celična linija U87-MG

V vseh poskusih smo uporabili celično linijo U87-MG (ATCC® HTB-14™)<sup>1</sup>, ki so jo leta 1966 izolirali iz 44-letnega belopoltega moškega. Morfološko gre za epitelijske celice, ki rastejo pritrjene na podlago (Sl. 5) (ATCC, 2014).



**Slika 5. Divji tip glioblastomskih celic U87-MG v celični kulturi pri 100× povečavi.** Celice so morfološko podobne astroцитom in z večanjem konfluente začnejo tvoriti mreže. Merilo: 100 μm (fotografirala Barbara Breznik).

**Preglednica 6. Uporabljeni celični kloni in njihov opis.**

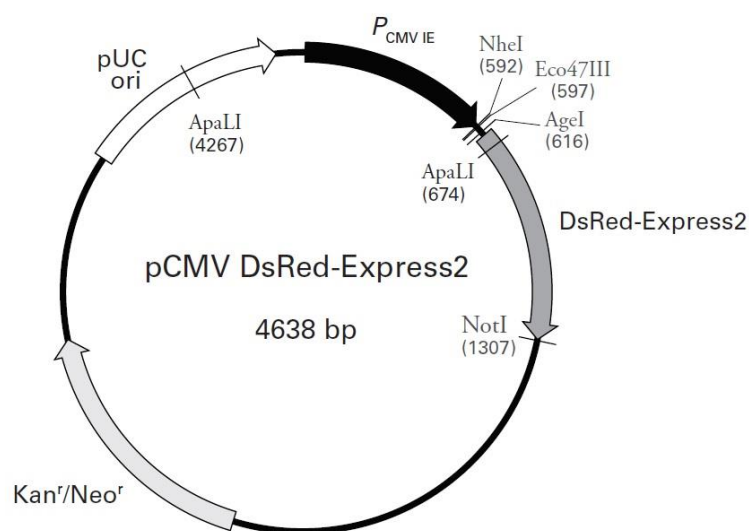
Oznaka celičnega klona	Lastnosti
U87-MG DsRed (divji tip)	U87-MG z vstavljenim vektorjem pCMV DsRed-Express2
U87-MG DsRed non-shRNA RECQ1	U87-MG z vstavljenima vektorjema pCMV DsRed-Express2 in pSUPER.puro brez zapisa za shRNA RECQ1
U87-MG DsRed shRNA RECQ1	U87-MG z vstavljenima vektorjema pCMV DsRed-Express2 in pSUPER.puro z zapisom za shRNA, katere tarča je mRNA za RECQ1

V besedilu, na slikah in na grafih smo zaradi boljše preglednosti uporabili krajše oznake za posamezen celični klon in sicer **divji tip** (namesto U87-MG DsRed (divji tip)), **non-shRNA** (namesto U87-MG DsRed non-shRNA RECQ1) in **shRNA** (namesto U87-MG DsRed shRNA RECQ1).

<sup>1</sup> ATCC – angl. *American Type Culture Collection*; HTB-14 – dostopna koda celične linije

### 3.1.4.1 Ekspresijski vektor pCMV DsRed-Express2 (Clontech)

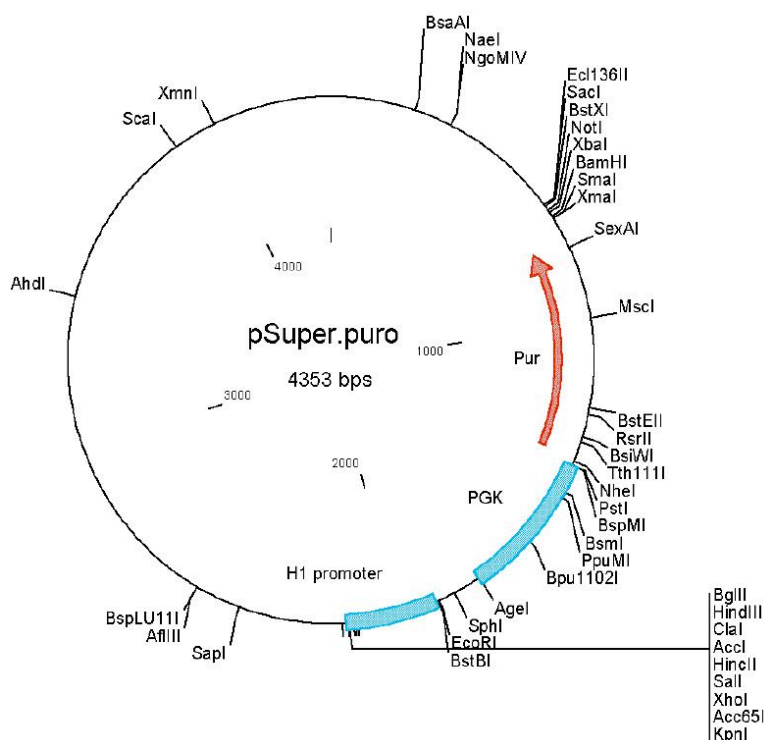
Celično linijo U87-MG so na Nacionalnem inštitutu za Biologijo genetsko modificirali z vnosom ekspresijskega vektorja pCMV DsRed-Express2 (Sl. 6). Gen DsRed-Express2 se nahaja za aktivnim promotorjem  $P_{CMV IE}$  (angl. *human cytomegalovirus immediate early promoter*), kar omogoča stalno izražanje gena za rdeč fluorescentni protein DsRed. Celice, v katerih nastaja rdeč fluorescentni protein, lahko zaznamo s fluorescenčno mikroskopijo, kar olajša vizualizacijo celic glioblastoma. Ekscitacijska valovna dolžina proteina DsRed je okoli 554 nm, emisijski maksimum pa okoli 591 nm. Kaseto z rezistenco proti neomicinu ( $Neo^r$ ) omogoča selekcijo celic z vstavljenim vektorjem in sicer tako, da v gojišče dodamo geneticin (Clontech, 2015).



Slika 6. Shema ekspresijskega vektorja pCMV DsRed-Express2 (Clontech, 2015).

### 3.1.4.2 Ekspresijski vektor pSUPER.puro (Oligoengine)

Na sinhrotronu Elettra v Bazovici pri Trstu (Elettra-Sincrotrone Trieste) so v celice U87-MG DsRed vnesli vektor pSUPER.puro (Sl. 7). V celice U87-MG DsRed non-shRNA RECQ1 so vnesli prazen vektor pSUPER.puro, celicam U87-MG DsRed shRNA RECQ1 pa vektor pSUPER.puro, v katerega so med restrikcijski mesti BgIII in HindIII vstavili dvoverižno zaporedje oligonukleotidov. Veriga oligonukleotidov vsebuje smerno (angl. *sense*) in protismerno (angl. *antisense*) zaporedje devetnajstih nukleotidov (angl. *N-19 target sequence*), ki sta ločena z devetimi nukleotidi, ki po transkripciji tvorijo lasnico. S transkripcijo nastane kratka lasnična RNA (shRNA), ki se nato cepi na smerno in protismerno siRNA. Protismerna siRNA se veže na tarčno zaporedje v mRNA za helikazo RECQ1. Celice z vstavljenim vektorjem selekcioniramo z dodatkom puomicina v gojišče (Oligoengine, 2011).



Slika 7. Shema ekspresijskega vektorja pSUPER.puro z vstavljenim promotorjem gena za polimerazo-III H1-RNA (Oligoengine, 2011).

### 3.1.5 Gojišča in raztopine za celične klon

Vsa pripravljena gojišča smo do uporabe hranili v hladilniku (4 °C). Zaradi zakasnjene dostave medija DMEM smo za pripravo gojišč namesto DMEM en teden uporabljali medij MEM, ki je prav tako priporočen medij za gojenje celic U87-MG.

#### 3.1.5.1 Sestava gojišča za divji tip celic U87-MG DsRed:

- 86% (V/V) DMEM
- 10% (V/V) FBS
- 1 mL NEAA (100× založna raztopina)
- 1 mL P/S (100 U/mL penicilina in 0,1 mg/mL streptomicina)
- 0,02 mM L-glutamin
- 1 mM Na-piruvat
- 0,1 mg/mL geneticina

#### 3.1.5.2 Sestava gojišča za celična klon non-shRNA in shRNA:

- 86% (V/V) DMEM
- 10% (V/V) FBS
- 1 mL NEAA (100× založna raztopina)
- 1 mL P/S (100 U/mL penicilina in 0,1 mg/mL streptomicina)

- 0,02 mM L-glutamin
- 1 mM Na-piruvat
- 0,25 µg/mL puromicina

#### 3.1.5.3 Priprava 1× PBS:

50 mL 1× PBS pripravimo tako, da zmešamo 5 mL 10× PBS in 45 mL dsH<sub>2</sub>O.

#### 3.1.5.4 Priprava 4% BSA:

10 mL 4% BSA pripravimo tako, da zatehtamo 0,4 g BSA in do oznake 10 mL dolijemo 1× PBS.

#### 3.1.5.5 Priprava 0,1% Triton X-100:

10 mL 0,1% Triton X-100 pripravimo tako, da zatehtamo 0,01 g Triton X-100 in dolijemo 10 mL 1× PBS.

### 3.1.6 Mediji in raztopine za delo z zarodki cebric

#### 3.1.6.1 Sestava vode ISO s PTU:

- 294 mg/L CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O
- 5,5 mg/L KCl
- 123,25 mg/L MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O
- 63 mg/L NaHCO<sub>3</sub>
- 0,005% PTU

#### 3.1.6.2 Priprava 0,08% trikaina (trikain metansulfonat):

100 mL raztopine trikaina pripravimo tako, da zatehtamo 0,08 g trikaina in do oznake za 100 mL dolijemo vodo ISO.

#### 3.1.6.3 Priprava 4% PFA (formalina):

Najprej smo pripravili založno raztopino 8% PFA in sicer tako, da smo zatehtali 4 g PFA in do oznake za 50 mL dolili dsH<sub>2</sub>O. Raztopino smo nato segreli do 60 °C in po kapljicah dodajali 1 M NaOH do pH 7,5. Na koncu smo raztopino redčili z 2× PBS v razmerju 1:1 (V/V).



## 3.2 METODE

### 3.2.1 Delo s celičnimi linijami

#### 3.2.1.1 Gojenje celične linije

Celice smo gojili v plastenkah za gojenje celic pod stalnimi pogoji v celičnem inkubatorju (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, z vlago nasičena atmosfera). Rast celic smo opazovali pod invertnim mikroskopom in ko so dosegle 70–80% konfluentnost, smo celice presadili. Presajanje celic je potekalo v aseptičnih pogojih v laminariju. Najprej smo z vakuumskim sesalnikom odstranili gojišče in celice sprali s 5 mL 1× PBS. Po 2 min smo PBS odstranili ter dodali 1,5 mL 0,25% tripsin-EDTA, ki celice odlepi s površine. Plastenko smo med 5 minutno inkubacijo rahlo stresali, po 5 min pa dodali 5 mL svežega gojišča in tako zaustavili delovanje tripsina. Suspenzijo celic smo prenesli v 15 mL centrifugirko in centrifugirali 3 min pri 1000 obr./min. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant ter resuspendirali celice v 1 mL svežega gojišča. Celice smo prešteli, nato pa ustrezeni volumen celic prenesli v novo plastenko za gojenje celic, v katero smo predhodno dodali približno 5 mL ustreznega gojišča (odvisno od volumna celic, ki smo ga dodali v plastenko). Plastenke smo po presaditvi prenesli v celični inkubator.

#### 3.2.1.2 Štetje celic

Celice smo po vsaki tripsinizaciji prešteli in sicer tako, da smo 10 µL celične suspenzije dodali v 40 µL barvila tripan modro, vse skupaj dobro premešali in nato na hemocitometer prenesli 10 µL celične suspenzije z barvilom. Barvilo tripan modro prodre samo v mrtve celice, medtem ko žive celice ostanejo neobarvane. Pod invertnim mikroskopom smo prešteli žive celice v štirih kvadratih velikosti 1 mm<sup>2</sup>, ter po enačbi (1) izračunali število celic v celični suspenziji.

$$\frac{(A + B + C + D) \cdot R \cdot K_p \cdot V_{\text{suspenzije}}}{4} \dots (1)$$

**A, B, C, D** število celic v 1 mm<sup>2</sup> kvadratu

**R** faktor redčenja (v primeru, da 10 µL celične suspenzije zmešamo s 40 µL tripan modrega, je faktor redčenja 5)

**K<sub>p</sub>** 10<sup>4</sup> (volumen suspenzije pod stekelcem je 0,1 µL in če želimo izračunati število celic v 1 mL suspenzije, moramo vrednost pomnožiti z 10<sup>4</sup>)

**V<sub>suspenzije</sub>** volumen suspenzije

### 3.2.2 Proliferacija celic U87-MG DsRed *in vitro*

#### 3.2.2.1 Priprava celičnih klonov za poskus *in vitro*

Teden dni pred poskusom *in vitro* smo vse celične klone gojili v mediju z geneticinom ter tako preprečili, da bi na rezultate poskusa vplivala vrsta antibiotika v gojišču. V vsakem poskusu smo hkrati uporabili vse tri celične klone (shRNA, non-shRNA in divji tip), ki smo jih pripravili po enakem postopku. Po odstranitvi gojišča smo celice spirali 2 min s 5 mL  $1\times$  PBS, nato pa tripsinizirali 5 min. Tripsin-EDTA uporabljamo za ločevanje celic z dna gojitvene plastenke – tripsin je proteolitični encim, ki cepi proteine celičnih stikov med celicami ter stikov celic s podlago, medtem ko EDTA veže kalcijeve in magnezije ione, ki bi inaktivirali tripsin (Gilbert in sod., 2006). Delovanje tripsina smo zaustavili tako, da smo dodali 5 mL gojišča z geneticinom. Po centrifugiranju (3 min pri 1000 obr./min) smo odstranili supernatant, celice resuspendirali v 1 mL gojišča z geneticinom ter odvzeli 10  $\mu$ L celične suspenzije za štetje celic s hemocitometrom. Ko smo izračunali število celic v 1 mL, smo izračunali ustrežno redčitev, da smo dobili 3000 celic v 200  $\mu$ L gojišča. Po 200  $\mu$ L gojišča s 3000 celicami smo prenesli v posamezne vdolbinice mikrotitrsko plošče s 96 vdolbinicami. Mikrotitrsko ploščo smo nato prenesli v celični inkubator (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, z vlago nasičena atmosfera) ter počakali tri ure, da so se celice pritrdile na dno vdolbinic. Za vsak celični klon smo uporabili 12 vdolbinic, celoten poskus pa smo ponovili trikrat.

#### 3.2.2.2 Slikanje celic v poskusu *in vitro*

Celice smo prvič slikali tri ure po tem, ko smo jih prenesli v mikrotitrsko ploščo, ter enkrat dnevno naslednje tri dni. Vsako vdolbinico mikrotitrsko plošče smo slikali na invertnem mikroskopu (Nikon Eclipse TE300) pri 40 $\times$  povečavi in z enakimi nastavitvami, uporabili pa smo set filtrov za ekscitacijo z zeleno svetlobo ter zajem emisije v rdečem delu spektra. Čas zajemanja slike je bil 2 s. Po vsakem slikanju smo mikrotitrsko ploščo prenesli nazaj v celični inkubator. Poskus je trajal štiri zaporedne dni, kot dan 0 pa štejemo tisti dan, ko smo nastavili poskus.

### 3.2.3 Test proliferacije z imuncitokemijskim barvanjem proti označevalcu Ki-67

#### 3.2.3.1 Priprava poli-L-lizinskih stekelc

Najprej smo pripravili 15 mL raztopine poli-L-lizina in sicer tako, da smo zmešali 14,250  $\mu$ L dsH<sub>2</sub>O in 750  $\mu$ L poli-L-lizina (končna koncentracija raztopine je bila 20  $\mu$ g/mL). Molekule poli-L-lizina so namreč pozitivno nabite in se dobro vežejo na trdne površine ter hkrati tudi z negativno nabitimi molekulami, npr. tistimi na površini celic (Mazia in sod., 1975). Raztopino poli-L-lizina smo prelili čez okrogla krovna stekelca v sterilni petrijevki za tkivne kulture. Petrijevko smo zatesnili s parafilmom, jo za tri ure položili na namizni stresalnik (sobna temperatura, 300 stresljajev na min) ter ves čas preverjali, da so stekelca res potopljena – v nasprotnem primeru smo stekelca potopili s sterilnim nastavkom za pipeto. Po triurni inkubaciji smo odstranili raztopino poli-L-lizina, dodali 8 mL dsH<sub>2</sub>O in petrijevko stresali na namiznem stresalniku (sobna temperatura, trikrat po 15 min). Po spiranju smo

petrijevko prenesli v laminarij in s sterilno pinceto stekelca postavili na rob petrijevke. Stekelca smo čez noč pustili v prižganem laminariju, da so se posušila, naslednji dan pa jih prenesli v sterilno petrijevko, ki smo jo nato zatesnili s parafilmom.

### 3.2.3.2 Nasajanje celic U87-MG DsRed na poli-L-lizinska stekelca

V mikrotitrsko ploščo s 24 vdolbinicami smo prenesli pripravljena poli-L-lizinska stekelca – za vsak celični klon po dve stekelci. Postopek priprave celičnih suspenzij je bil enak kot postopek priprave celičnih klonov za poskus *in vitro* (poglavje 3.2.2.1), le da smo celice redčili tako, da smo imeli v 1 mL gojišča 5000 celic, ki smo jih nato prenesli v vdolbinico mikrotitrskе plošče na stekelce. Za vsak celični klon smo tako pripravili dve paraleli, celoten poskus pa smo ponovili dvakrat. Mikrotitrsko ploščo s celicami smo za 24 ur prenesli v celični inkubator (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, z vlago nasičena atmosfera). Naslednji dan smo z vakuumskim sesalnikom odstranili gojišče in v vsako vdolbinico dodali 0,5 mL 100% metanola, s katerim smo celice fiksirali. Nato smo mikrotitrsko ploščo zatesnili s parafilmom in jo prenesli v zamrzovalnik (-80 °C).

### 3.2.3.3 Imunocitokemijsko barvanje

Pred barvanjem smo mikrotitrsko ploščo vzeli iz zamrzovalnika (-80 °C), odstranili metanol in stekelca petkrat sprali z 1× PBS. Sledila je permeabilizacija celic z 0,1% Triton X-100. Po inkubaciji (10 min) pri sobni temperaturi smo stekelca petkrat sprali z 1× PBS. Na vsako stekelce smo kanili 3–4 kapljice 4% BSA in tako blokirali nespecifična vezavna mesta, po 15 min inkubaciji pri sobni temperaturi pa petkrat sprali stekelca z 1× PBS. Sledilo je dodajanje kunčjih poliklonskih primarnih protiteles proti Ki-67, ki smo jih redčili 500×, tako da je bila končna koncentracija protiteles 1 µg/mL. Na vsako stekelce smo dodali 60 µL redčenega protitelesa in jih inkubirali eno uro pri sobni temperaturi. Stekelca smo po inkubaciji petkrat sprali z 1× PBS, nato pa na vsako stekelce dodali 80 µL redčenih kozjih protikunčjih sekundarnih protiteles (500× redčenje, končna koncentracija sekundarnega protitelesa je bila 1 µg/mL) ter stekelca inkubirali 90 min pri sobni temperaturi. Po barvanju označevalca Ki-67 s sekundarnimi protitelesi smo stekelca sprali (petkrat z 1× PBS) in dodali 80 µl redčenega propidijevega jodida (PI, končna koncentracija je bila 2 µg/mL), s katerim smo obarvali jedra oz. DNA. Inkubaciji (5 min) pri sobni temperaturi je sledilo spiranje (petkrat z 1× PBS). Krovna stekelca smo dobro osušili in jim na stran, na kateri so bile nasajene celice, dodali dve kapljici sredstva proti bledenju fluorescence (angl. *antifade mountant*). Z isto stranjo smo krovna stekelca prenesli na objektna stekelca. Robove krovnih stekelc smo premazali s prozornim lakom in jih do slikanja hranili v zamrzovalniku (-20 °C).

### 3.2.3.4 Štetje deleža celic U87-MG DsRed, pozitivnih za Ki-67

Celice smo prešteli s pomočjo invertnega fluorescenčnega mikroskopa Nikon Eclipse Ti. Najprej smo uporabili set filtrov za ekscitacijo z zeleno svetlobo, s katero smo zaznali s PI obarvana jedra celic, ki so svetila rdeče. Z uporabo seta filtrov za ekscitacijo z modro svetlobo smo zaznali zeleno obarvana jedra, ki so bila pozitivna za jedrni protein Ki-67.

Razmerje med pozitivnimi jedri in vsemi jedri, obarvanimi s PI, nam pove delež proliferirajočih celic v vzorcu.

### 3.2.4 Proliferacija celic U87-MG DsRed *in vivo* v zarodkih cebric (*Danio rerio*)

#### 3.2.4.1 Priprava celičnih klonov za ksenotransplantacijo

Za poskuse *in vivo* smo hkrati uporabili vse tri celične klone, ki smo jih teden dni pred poskusom gojili v gojišču za divji tip celic z dodatkom geneticina, tako da so celice pred poskusom rasle v enakih pogojih. Vse tri celične klone smo za injiciranje v zarodke pripravili po enakem postopku.

Začeli smo z odstranitvijo gojišča in spiranjem le tega z dodatkom 5 mL 1× PBS. Po 2 min smo odstranili PBS in dodali 1,5 mL 0,25% tripsin-EDTA ter stresali platenko s celicami. Po 5 min smo dodali gojišče z geneticinom ter celice pred prenosom v 15 mL centrifugirko dobro resuspendirali s pipeto, da smo »razbili« skupke celic. Celično suspenzijo smo centrifugirali 3 min pri 1000 obr./min, odstranili medij s tripsinom in dodali 1 mL 1× PBS ter celice dobro resuspendirali s pipeto in namiznim stresalnikom, nato pa odvezli 10 µL celične suspenzije za štetje celic. Nato smo dodali še 9 mL 1× PBS, da smo medij dodatno sprali, in ponovno centrifugirali 3 min pri 1000 obr./min. Po centrifugiranju smo odstranili čim več PBS. Glede na število celic v posameznem celičnem klonu smo celice dobro resuspendirali v določenem volumnu 1× PBS, da smo dobili končno koncentracijo  $3 \cdot 10^7$  celic/ml. Suspenzijo celic smo previdno prenesli v 0,5 mL mikrocentrifugirko.

#### 3.2.4.2 Priprava zarodkov za poskus *in vivo* ter ksenotransplantacija U87-MG DsRed v zarodke cebric

Postopki uporabe zarodkov cebric so bili odobreni s strani Komisije za medicinsko etiko Republike Slovenije pri Ministrstvu za zdravje Republike Slovenije (št. dovoljenja 92/06/12).

Poskusi so bili izvedeni na zarodkih rib cebric (divji tip, linija AB), ki smo jih vzgojili v akvariju Oddelka za genetsko toksikologijo in biologijo raka na Nacionalnem inštitutu za Biologijo v Ljubljani v skladu s smernicami za vzdrževanje rib cebric OECD (OECD, 2006). Zarodke smo 24 ur po oploditvi premestili iz akvarijske vode v petrijevko z vodo ISO v skladu s standardom ISO 7346-3 (ISO, 1996), z dodatkom 0,005% PTU (postopek priprave vode ISO je opisan v poglavju 3.1.6.1). PTU inhibira encim tirozinazo, ki sodeluje pri pretvorbi tirozina v melanin, zaradi odsotnosti pigmenta pa je omogočena lažja vizualizacija struktur v notranjosti zarodkov (Camp in Lardelli, 2001; Li in sod., 2012). Vsak poskus je trajal štiri zaporedne dni – dan 0 predstavlja dan, ko smo nastavili poskus.

Pred poskusom smo zarodke cebric uspavali z 0,08% trikainom, tako da je bila končna koncentracija trikaina v petrijevki z vodo ISO 0,02%. Zarodkom smo s pincetami pod stereomikroskopom previdno odstranili horionsko ovojnico, po tem pa še večino tekočine v petrijevki, kar je olajšalo injiciranje celic v zarodke. S podaljšanim nastavkom za pipeto smo

v borosilikatno stekleno kapilaro prenesli 5  $\mu$ L celične suspenzije ter kapilaro namestili v mikroinjektor. Z mikroinjektorjem smo injicirali 50–100 celic ortotopično v možgane ali ektopično v rumenjarkovo vrečko dva dneva starih zarodkov cebric. Zarodke, v katere nismo vnesli dovolj celic, smo izločili iz nadaljnje analize. Posamezen zarodek z injiciranimi celicami smo z 1 mL tekočine prenesli v vdolbinico mikrotitrne plošče z 48 vdolbinicami. Po prenosu vseh zarodkov v vdolbinice je sledilo slikanje. Poskus z injiciranjem celic U87-MG DsRed v možgane zarodkov smo ponovili trikrat, v rumenjarkovo vrečko pa petkrat in na ta način dokazali preverljivost in ponovljivost poskusa ter točnost podatkov.

#### 3.2.4.3 Slikanje in gojenje zarodkov cebric

Zarodke cebric smo slikali štiri zaporedne dni – na dan, ko smo injicirali celice U87-MG DsRed v rumenjarkovo vrečko ali možgane ter še naslednje tri dni. Slikali smo z invertnim mikroskopom (Nikon Eclipse TE300) pri 40 $\times$  povečavi, vsako vdolbinico oz. zarodek z enakimi nastavitvami. Uporabili smo set filtrov za ekscitacijo z zeleno svetlobo in zaznali emisijo celic v rdečem delu spektra. Čas zajemanja slike je bil 333 ms.

Po prvem slikanju smo v vsako vdolbinico mikrotitrne plošče skoraj do vrha dolili vodo ISO z 0,005% PTU in prenesli mikrotitrne plošče v inkubator pri 31 °C. Pred vsakim naslednjim slikanjem smo zarodke cebric uspravili z 0,08% trikainom (v vsako vdolbinico smo kanili 3–4 kapljice), po slikanju pa zamenjali vso tekočino s svežo vodo ISO z 0,005% PTU.

#### 3.2.4.4 Fiksacija zarodkov s 4% paraformaldehidom

Po štiridnevnem opazovanju in slikanju smo zarodke cebric s čim manj vode ISO prenesli v 2 mL mikrocentrifugirke – zarodke smo dali v tri mikrocentrifugirke, odvisno od tega, kateri celični klon (shRNA, non-shRNA, divji tip) smo jim injicirali. Nato smo s pipeto odstranili še preostanek tekočine ter v vsako mikrocentrifugirko dolili 1 mL 4% PFA. Po 24 urah smo 4% PFA nadomestili z 1 $\times$  PBS ter mikrocentrifugirke shranili v hladilniku pri 4 °C.

#### **3.2.5 Detekcija apoptotičnih celic U87-MG DsRed v zarodkih cebric z barvilom akridin oranžno**

Izbrali smo štiri dni stare zarodke cebric, ki so v možganih imeli injicirane celice U87-MG DsRed (približno 10 osebkov za vsak celični klon) ter jim po slikanju in menjavi tekočine v vdolbinicah mikrotitrne plošče dodali 4  $\mu$ L barvila akridin oranžno. Naslednji dan smo tumorske celice v zarodkih slikali z invertnim mikroskopom (Nikon Eclipse TE300) pri 100 $\times$  povečavi – najprej smo uporabili set filtrov za ekscitacijo z zeleno svetlobo za detekcijo celic U87-MG DsRed, nato pa še set filtrov za ekscitacijo z modro svetlobo za detekcijo apoptotičnih celic U87-MG DsRed.

### 3.2.6 Analiza slik in obdelava podatkov

Vse slike smo shranjevali v formatu .tif, slike proliferacije celic *in vitro* ter *in vivo* pa nadalje analizirali s programom ImageJ (različica 1.49v; Abramoff in sod., 2004; Ferreira in Rasband, 2012). Podatkov, pridobljenih z analizo slik na dan 0 (takrat ko smo nastavili poskus), nismo upoštevali pri obdelavi podatkov. Ti podatki niso relevantni, saj se celice *in vitro* med dnevnoma 0 in 1 pritrjajo na površino ter se premikajo, pri poskusu *in vivo* pa se prav tako premeščajo v možganih in oblikujejo skupke.

#### 3.2.6.1 Analiza slik proliferacije celic *in vitro* ter obdelava podatkov

Slike smo odprli s programom ImageJ, izbrali 8-bitno vrsto slike ter za vsak celični klon nastavili zgornjo in spodnjo mejo (angl. *Threshold*) sivine, ki jo bo program zajel za analizo. S funkcijo »analiza delcev« (angl. *Analyze particles*) smo analizirali delce oz. celice, večje od 20 pikslov<sup>2</sup> in dobili parameter »Integrated density« (v nadaljevanju ID), ki predstavlja seštevek vrednosti pikslov oz. je produkt površine in srednje vrednosti sivine izbranih območij slike (Ferreira in Rasband, 2012). Površino in ID vsake slike smo shranili v programu Microsoft Office Excel 2013.

Najprej smo izračunali povprečen ID posamezne celice za posamezen celičen klon v programu Microsoft Office Excel 2013, ki smo ga uporabili v kasnejših izračunih. Povprečen ID posamezne celice smo izračunali iz ID na dan 0 poskusa. Pri izračunu povprečja smo izločili tiste meritve celic, pri katerih je bila površina večja od 250 pikslov<sup>2</sup>, saj je šlo za skupek celic in ne za posamezno celico. Celice z večjo površino (nad 200 pikslov<sup>2</sup>) smo preverili tudi na sliki in tako ugotovili ali gre res za posamezno celico ali za skupek celic. Povprečen ID posamezne celice za posamezen klon smo izračunali po enačbi (2).

$$ID_{PC} = \frac{ID_1 + ID_2 + ID_3 + \dots + ID_{12}}{\text{št. vseh meritev}} \dots (2)$$

$ID_{PC}$  ID posamezne celice posameznega klona na dan 0

$ID_{1-12}$  seštevek meritev ID na posamezni sliki (12 slik – 12 vdolbinic)

Nato smo sešteli vrednosti vseh ID na posamezni sliki na določen dan. Ta seštevek smo delili z  $ID_{PC}$ , rezultat pa je bilo ocenjeno število celic na sliki na določen dan poskusa. Nazadnje smo izračunali še relativno povečanje števila celic na sliki po enačbi (3).

$$r_{\text{št}} = \frac{X_{1-3}}{X_1} \dots (3)$$

$r_{\text{št}}$  relativno povečanje števila celic

$X_{1-3}$  ocenjeno število celic prvi ali drugi ali tretji dan poskusa

$X_1$  ocenjeno število celic prvi dan poskusa (dan 1)

Tako smo dobili relativno spremembo števila celic v vsaki vdolbinici. S povprečenjem 12 vdolbinic smo izračunali relativno spremembo števila celic za posamezne celične klone.

### 3.2.6.2 Analiza slik proliferacije celic *in vivo* ter obdelava podatkov

Slike smo odprli s programom ImageJ, izbrali 8-bitno vrsto slike ter za vsak celični klon, ki je bil injiciran v možgane ali rumenjarkovo vrečko zarodkov, nastavili zgornjo in spodnjo mejo sivine. Nato smo z uporabo orodja »*Rectangular*« ali »*Polygon selection*« označili območje celic U87-MG DsRed in tako izločili okoliški šum. S funkcijo »*Measure*« smo dobili ID, dobljene podatke pa obdelali v programu Microsoft Office Excel 2013. Za vsak osebek smo izračunali relativno vrednost ID in sicer tako, da smo vrednost ID na določen dan poskusa delili z vrednostjo ID na drugi dan poskusa (dan 1). Iz relativnih deležev smo izračunali še povprečno relativno vrednost ID določenega celičnega klona, ki je bil injiciran v zarodek. Osebkov s premalo injiciranimi celicami U87-MG DsRed nismo analizirali.

### 3.2.7 Obdelava slik

Slike, prikazane v Rezultatih (poglavje 4), smo obdelali s programoma GIMP (različica 2.8.14) in Adobe Photoshop (različica 14.2.1 x64).

### 3.2.8 Statistična obdelava podatkov

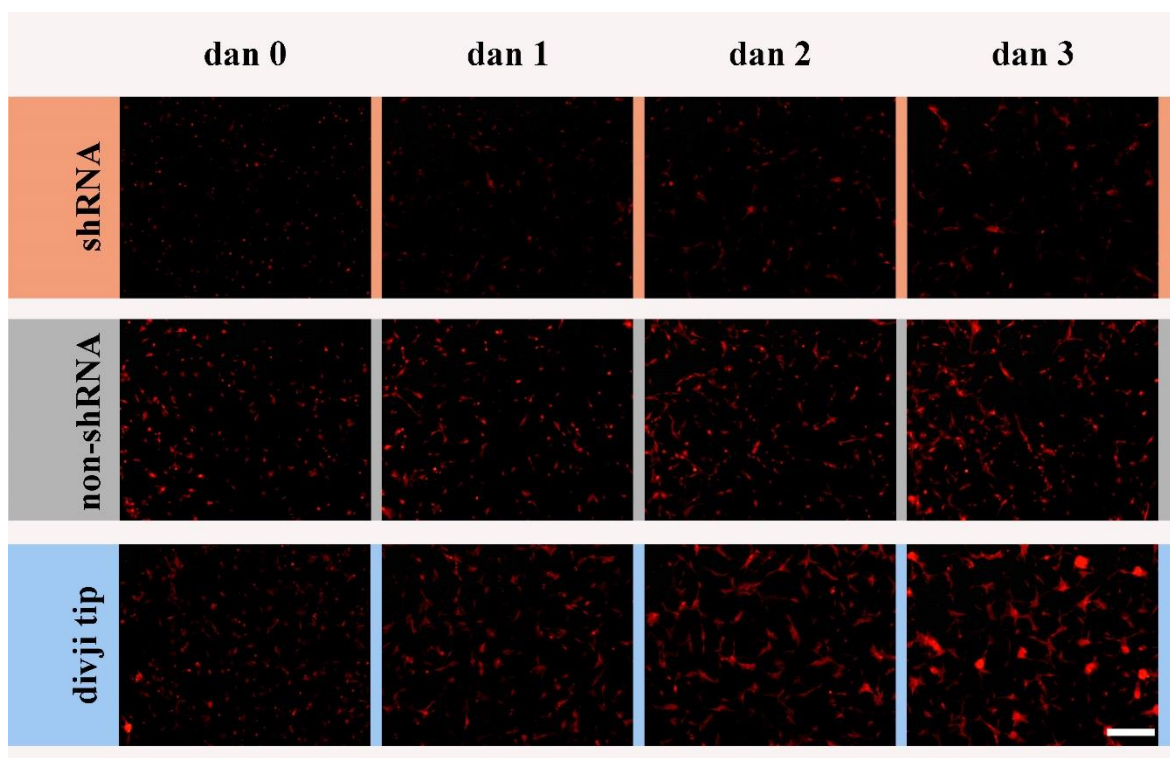
Za grafično predstavitev podatkov smo uporabili program Microsoft Office Excel 2013, rezultati na grafih pa so podani kot povprečje  $\pm$  standardna napaka (v nadaljevanju SE). Za vse urejene skupine podatkov smo izrisali histograme in ugotovili, da frekvenčna porazdelitev podatkov ni normalna. Tako smo se odločili, da bomo za primerjavo dveh neodvisnih vzorcev uporabili neparametrični Mann-Whitneyev U-test, za statistično obdelavo treh neodvisnih vzorcev pa Kruskal-Wallisov test. Gre za neparametrično različico analize variance, ki smo jo dopolnili z Dunnovim post-hoc testom. Oba statistična testa smo opravili s programom GraphPad Prism (različica 5.01) z enako stopnjo tveganja (0,05). Skupine, pri katerih je bila izračunana vrednost  $p < 0,05$ , smo smatrali za statistično značilno različne. Na grafih smo z \* označili statistične razlike med celičnima klonoma shRNA in non-shRNA, ki smo jih primerjali z Mann-Whitneyevim U-testom. Statistična primerjava, opisana v Razpravi (poglavje 5), se nanaša na statistično analizo z Mann-Whitney U-testom, razen v primerih, ko je primerjava s Kruskal-Wallisovim testom specifično navedena.

## 4 REZULTATI

V vseh poskusih smo uporabili tri celične klone – celice s trajno utišano helikazo RECQ1 (shRNA), celice s praznim vektorjem za RNA-interferenco (non-shRNA), s katerimi smo primerjali proliferacijo utišanih celic ter celice divjega tipa, ki smo jih uporabili za izključitev vpliva praznega vektorja na proliferacijo celic.

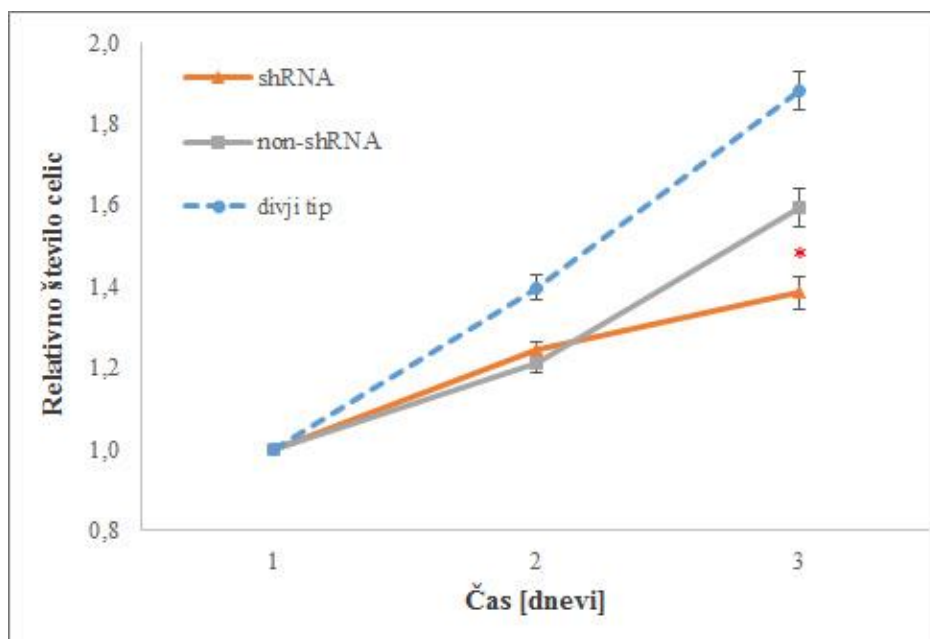
### 4.1 UGOTAVLJANJE ŠTEVILA PROLIFERIRAJOČIH CELIC U87-MG DSRED V POSKUSU *IN VITRO*

Za ugotavljanje vpliva utišanja helikaze RECQ1 smo na mikrotitrsko ploščo nasadili tri različne klone celic U87-MG DsRed (shRNA, non-shRNA, divji tip) in preko jakosti fluorescence celic spremljali proliferacijo celic *in vitro* s pomočjo fluorescenčne mikroskopije. Vsi trije celični kloni namreč izražajo gen za rdeč fluorescentni protein DsRed, ki ga detektiramo z zeleno ekscitacijsko svetlobo. Preko jakosti izsevane svetlobe smo izračunali število celic v posamezni vdolbinici mikrotitrsko plošče za posamezen dan in tako izračunali število celic posameznega celičnega klona vsak dan poskusa (Sl. 8, 9).



Slika 8. Časovni prikaz proliferacije glioblastomskih celic U87-MG DsRed (shRNA, non-shRNA, divji tip) v poskusu *in vitro*. Preko jakosti fluorescence celic smo spremljali proliferacijo celic pri 40× povečavi. Merilo: 400  $\mu$ m.



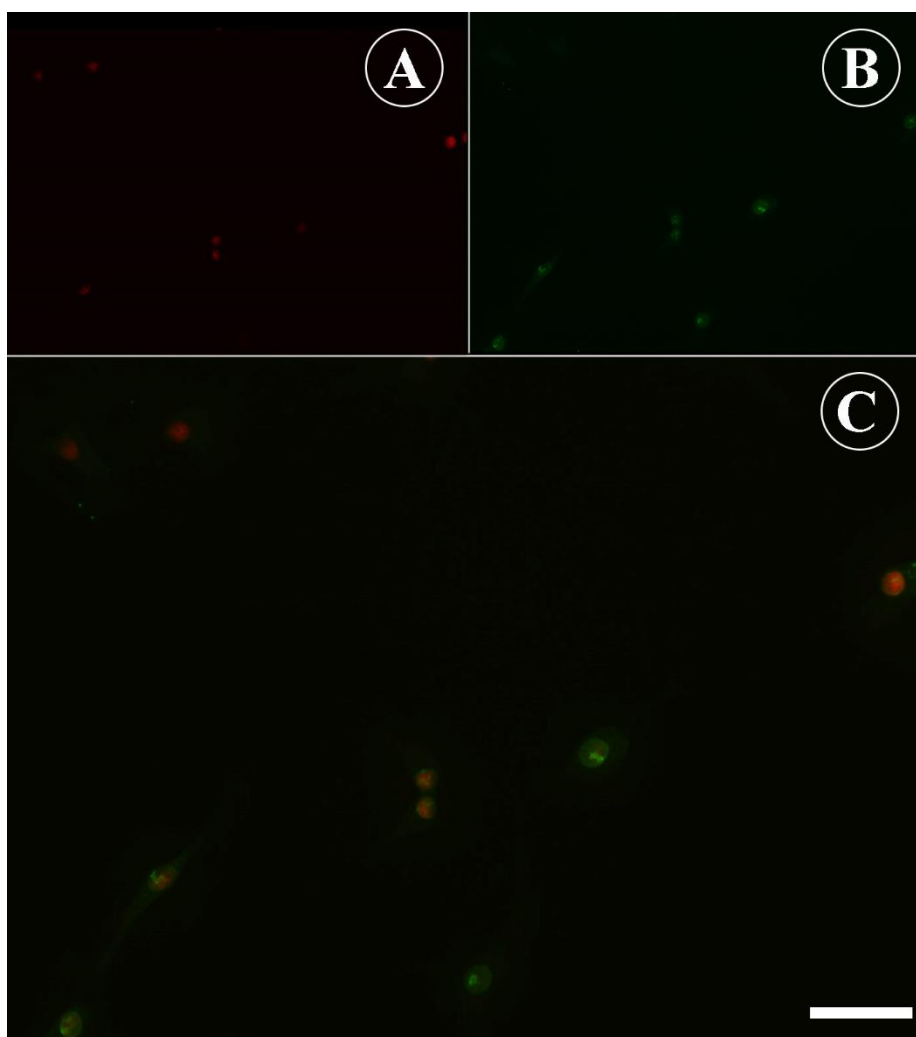


**Slika 9. Spreminjanje relativnega števila glioblastomskih celic U87-MG DsRed (shRNA, non-shRNA, divjji tip) v odvisnosti od časa.** Vrednosti na grafu predstavljajo povprečje  $\pm$  SE; \* predstavlja  $p < 0,05$  med shRNA in non-shRNA; n (za vsak celični klon) = 36.

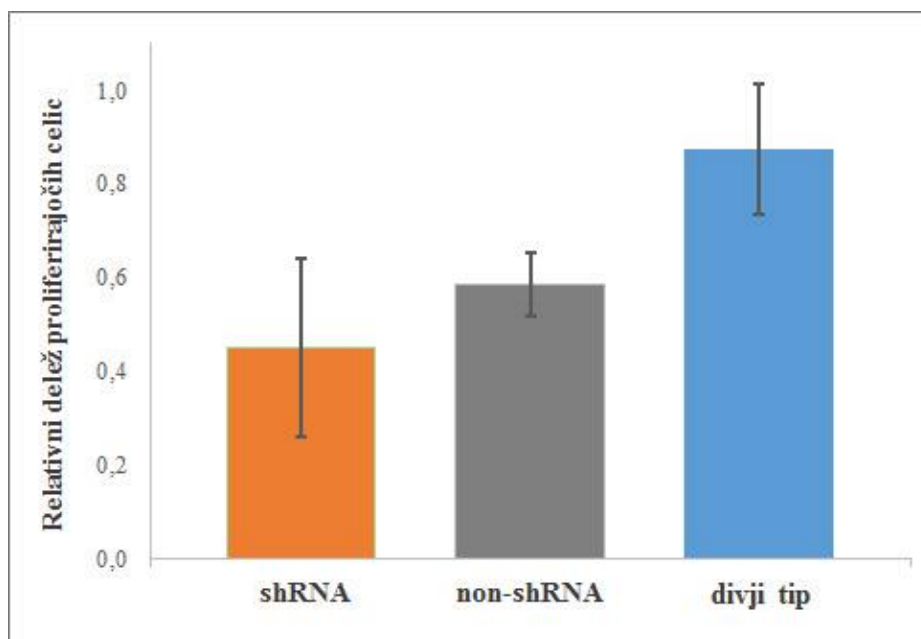
Porast v številu celic pri vseh celičnih klonih je razviden že na Sl. 8, dejanske razlike v številu celic pa so se pokazale že 2. dan poskusa med divjim tipom celic in celicami z vstavljenim plazmidom pSUPER.puro (Sl. 9). Porast v številu celic med prvim in drugim dnevom poskusa pri divjem tipu je bil  $40\% \pm 3,1\%$ , pri shRNA  $24,4\% \pm 2,2\%$  in pri non-shRNA  $21\% \pm 2,3\%$ . Razlike med divjim tipom celic in ostalima dvema celičnima klonoma so statistično značilne, med shRNA in non-shRNA pa ne ( $p = 0,2821$ ). Tretji dan poskusa so se razlike med posameznimi celičnimi kloni še povečale in so statistično značilne, kar smo dokazali tudi s Kruskal-Wallisovim testom ( $p < 0,0001$ ). Največjo razliko v porastu relativnega števila celic od prvega dneva poskusa so imele celice divjega tipa ( $88\% \pm 4,7\%$ ), najmanjšo pa celice z utišano helikazo RECQ1 ( $38\% \pm 4,1\%$ ). Iz naklona krivulje celic shRNA med 2. in 3. dnevom lahko vidimo, da je hitrost rasti tega celičnega klona v primerjavi z drugima dvema bistveno počasnejša. Razlike v proliferaciji utišanih (shRNA) in kontrolnih celic (non-shRNA) na tretji dan poskusa so statistično značilno različne ( $p = 0,0009$ ).

#### 4.2 UGOTAVLJANJE DELEŽA PROLIFERIRAJOČIH CELIC U87-MG DSRED Z IMUNOCITOKEMIJSKIM BARVANJEM PROTEINA KI-67

Preko deleža pozitivnih celic za jedrni protein Ki-67 smo s testom proliferacije z imunocitokemijskim barvanjem proteina Ki-67 zaznali število proliferirajočih celic in ugotovili vpliv utišanja helikaze RECQ1 na proliferacijo celic *in vitro* (Sl. 10).



**Slika 10. Prikaz testa proliferacije s fluorescentnim barvanjem označevalca Ki-67 v glioblastomskih celicah U87-MG DsRed pri 200× povečavi. (A) S propidijevim jodidom obarvana jedra celic, ki svetijo rdeče. (B) Zeleno obarvana jedra, pozitivna za jedrni protein Ki-67. (C) Prekrivanje rdeče in zelene fluorescence jedra nam pove, da celica proliferira. Merilo: 100 µm.**



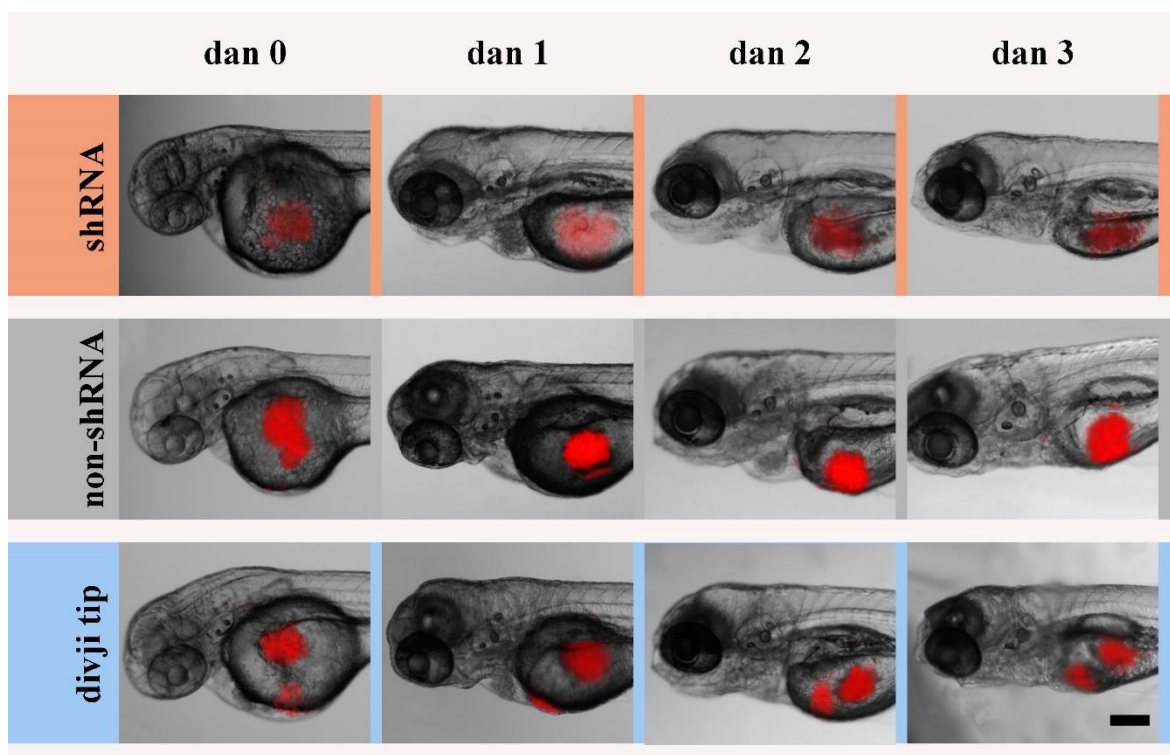
**Slika 11. Relativni delež proliferirajočih glioblastomskih celic v odvisnosti od celičnega klona (shRNA, non-shRNA, divji tip).** Vrednosti na grafu predstavljajo povprečje ± SE; n (prešteti stekelc; shRNA) = 3; n (prešteti stekelc; non-shRNA) = 7 ; n (prešteti stekelc; divji tip) = 4.

Povprečni relativni delež proliferirajočih celic pri divjemu tipu celic je v primerjavi s kontrolnimi celicami non-shRNA višji za 29%, v primerjavi z utišanimi celicami pa kar za 42% (Sl. 11). Poleg tega lahko opazimo, da je večina celic divjega tipa proliferira, medtem ko je povprečni relativni delež proliferirajočih celic pri utišanih celicah nižji od 50%. Razlike med relativnimi deleži proliferirajočih celic niso statistično značilne.

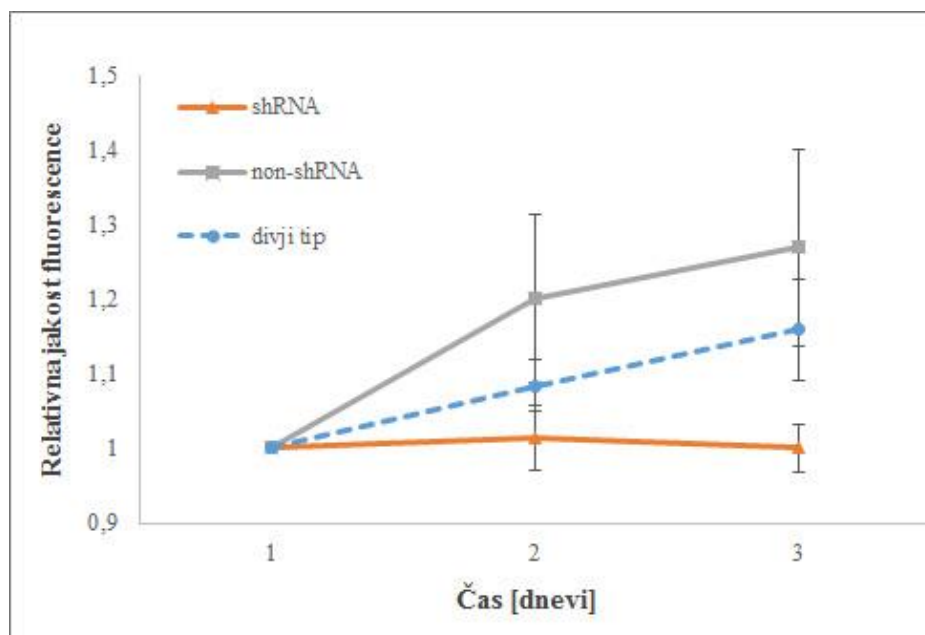
#### 4.3 UGOTAVLJANJE PROLIFERACIJE CELIC U87-MG DSRED V POSKUSU *IN VIVO* V ZARODKIH CEBRIC (*Danio rerio*)

Poskus *in vitro* je potekal v mikrotitrskih ploščah, torej v umetnem okolju. Prav zato smo rezultate skušali potrditi še s poskusom *in vivo*, kar pomeni, da smo proliferacijo celic spremljali v živih organizmih. Glioblastomske celice smo ksenotransplantirali tako v rumenjarkovo vrečko zarodkov cebrih kot tudi v možgane ter preverili, ali lokacija celic vpliva na proliferacijo celic. Proliferacijo celic smo spremljali z merjenjem jakosti fluorescence proteina DsRed, ki ga izražajo vsi celični kloni.

### 4.3.1 Proliferacija celic U87-MG DsRed v rumenjaskovi vrečki zarodkov cebric



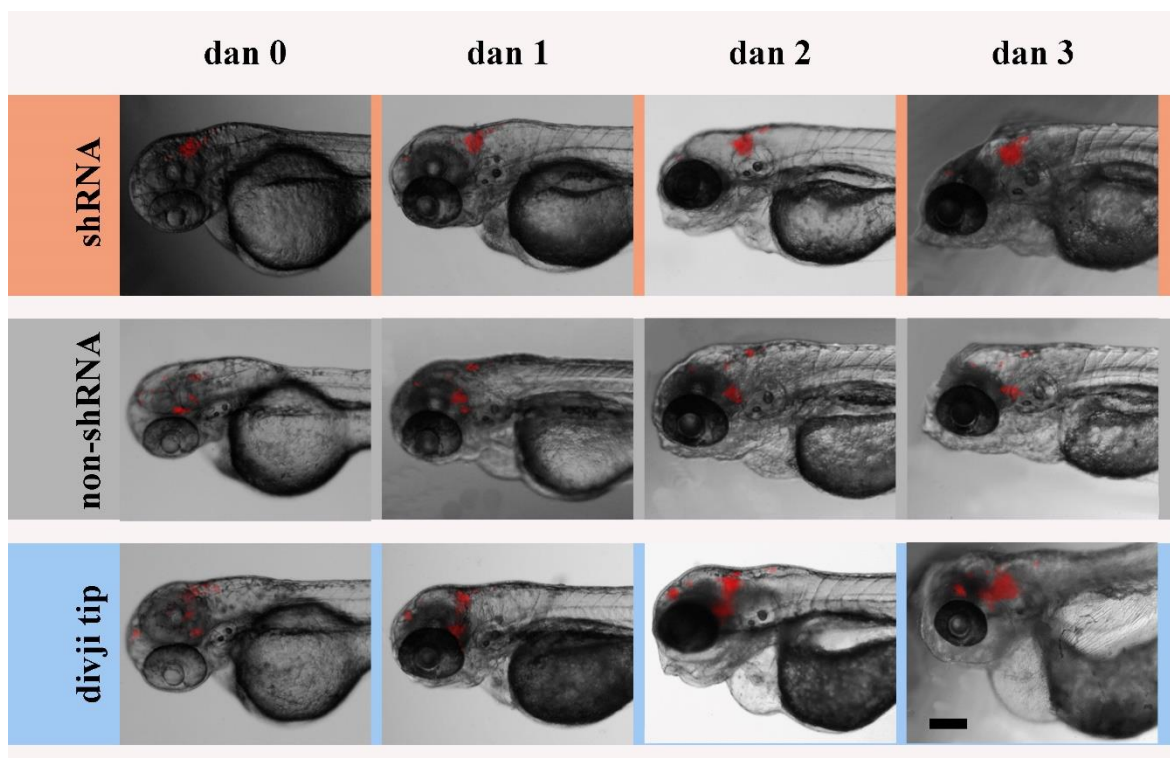
Slika 12. Časovni prikaz proliferacije glioblastomskih celic U87-MG DsRed (shRNA, non-shRNA, divji tip) v rumenjaskovi vrečki zarodkov cebric. Preko jakosti fluorescence celic smo spremljali proliferacijo celic pri 40× povečavi. Merilo: 200  $\mu\text{m}$ .



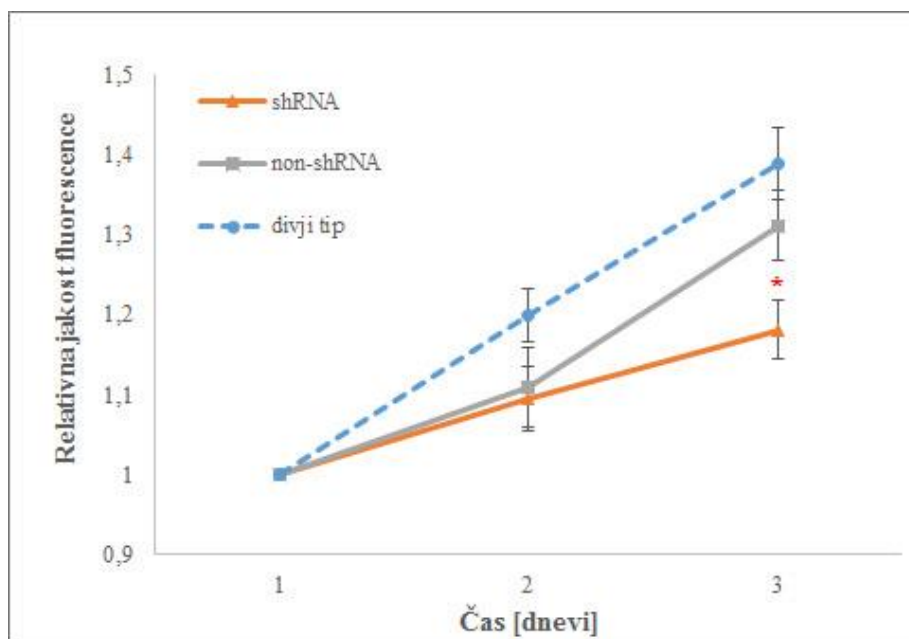
Slika 13. Spreminjanje relativne jakosti fluorescence v rumenjaskovi vrečki zarodkov cebric v odvisnosti od časa. Vrednosti na grafu predstavljajo povprečje  $\pm$  SE; n (shRNA) = 41; n (non-shRNA) = 59; n (divji tip) = 87. Statistično značilne razlike niso bile dokazane.

Jakost fluorescence se pri vseh treh celičnih klonih od začetka do konca poskusa ni bistveno spremenila (Sl. 12, 13). Celice shRNA niso proliferirale, saj se jakost fluorescence skoraj ni spremenila. Največjo spremembo med 1. in 3. dnevom poskusa smo zaznali pri celicah non-shRNA (26,9% ± 13,2%), nekoliko nižjo pa pri divjem tipu celic (15,9% ± 6,7%), vendar razlike med posameznimi celičnimi kloni niso bile statistično značilne.

#### 4.3.2 Proliferacija celic U87-MG DsRed v možganih zarodkov cebric

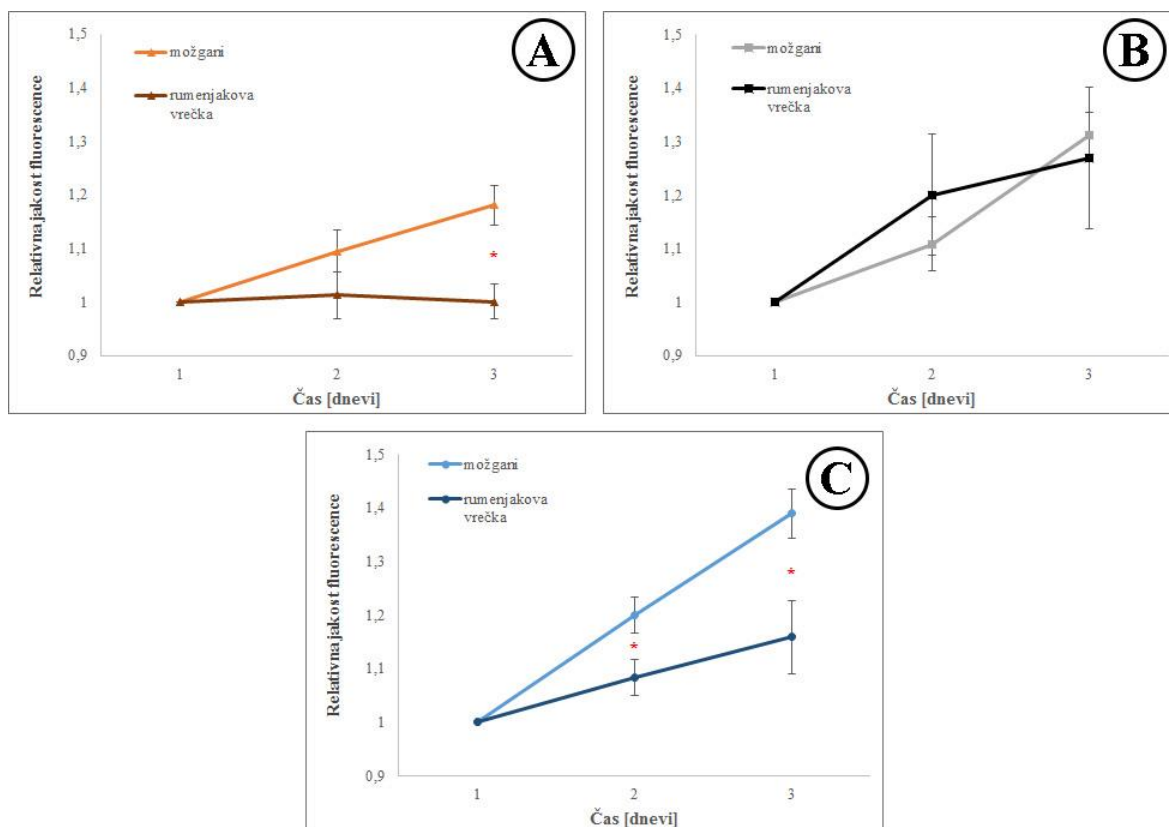


Slika 14. Časovni prikaz proliferacije glioblastomskih celic U87-MG DsRed (shRNA, non-shRNA, divji tip) v možganih zarodkov cebric. Preko jakosti fluorescence celic smo spremljali proliferacijo celic pri 40× povečavi. Merilo: 200 µm.



**Slika 15. Spreminjanje relativne jakosti fluorescence v možganih zarodkov cebric v odvisnosti od časa.**  
Vrednosti na grafu predstavljajo povprečje  $\pm$  SE; \* predstavlja  $p < 0,05$  med shRNA in non-shRNA; n (shRNA) = 64; n (non-shRNA) = 55 ; n (divji tip) = 52.

Jakost fluorescence divjega tipa celic GBM je v možganih naraščala skoraj linearno, vsak dan za približno 20% (Sl. 15). Poleg tega se je jakost fluorescence divjega tipa celic statistično razlikovala od drugih dveh tipov (shRNA in non-shRNA) že drugi dan poskusa, kar se je pokazalo tudi tretji dan poskusa. Med kontrolnimi celicami non-shRNA in shRNA so se statistično značilne razlike pokazale na tretji dan poskusa ( $p = 0,0295$ ). Sprememba jakosti fluorescence med 1. in 3. dnevom poskusa je bila pri celicah non-shRNA  $31,1\% \pm 4,3\%$ , pri shRNA pa le  $18,1\% \pm 3,7\%$ . Tudi pri celicah shRNA je bil porast fluorescence praktično linearen, vsak dan poskusa je jakost fluorescence narasla za približno 9%.

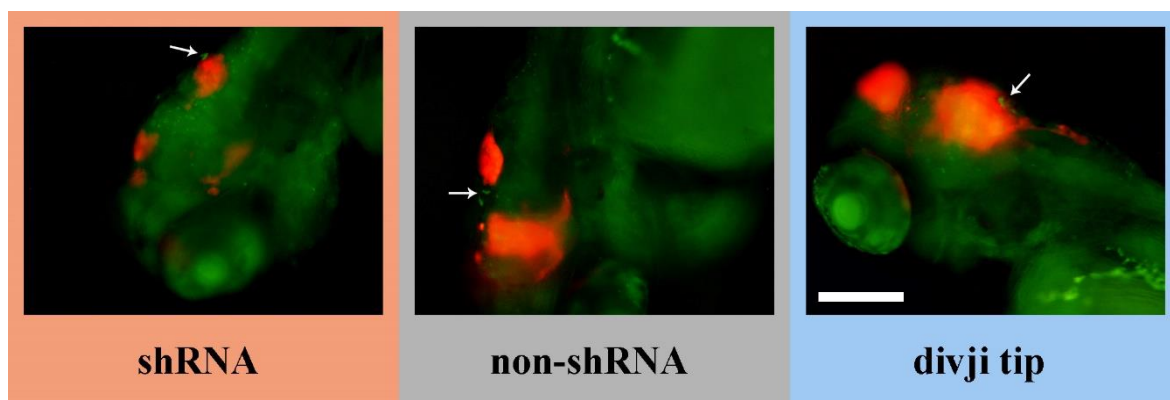


**Slika 16. Primerjava spreminjanja relativne jakosti fluorescence glede na mesto ksenotransplantacije celic *in vivo* v zarodkih cebric v odvisnosti od časa.** Primerjava jakosti fluorescence utišanih celic shRNA (A), kontrolnih celic non-shRNA (B) in celic divjega tipa (C). Vrednosti na grafu predstavljajo povprečje  $\pm$  SE; \* predstavlja  $p < 0,05$ .

Primerjava rezultatov poskusov *in vivo* (Sl. 16) je pokazala, da mesto implantacije celic GBM vpliva na njihovo proliferacijo. Jakost fluorescence vseh treh celičnih tipov, implantiranih v možgane, je bila na tretji dan poskusa višja od tiste pri celicah, implantiranih v rumenjakovo vrečko zarodkov cebric. Največje razlike na tretji dan poskusa so se pokazale med divjim tipom celic (23%; Sl. 16C) in pri utišanih celicah (18%; Sl. 16A), te razlike pa so bile tudi statistično značilne.

#### 4.4 UGOTAVLJANJE APOPTOTIČNIH CELIC V MOŽGANIH ZARODKOV CEBRIC (*Danio rerio*)

Z dodajanjem barvila akridin oranžno k zarodkom cebric smo želeli ugotoviti ali utišanje helikaze RECQ1 sproži apoptozo celic ali vpliva le na njihovo proliferacijo. Apoptozo celic smo spremljali v možganih živih zarodkov cebric. Posamezni fluorescenčni kanali slik, ki smo jih združili v Sliko 17, so v Prilogi A.

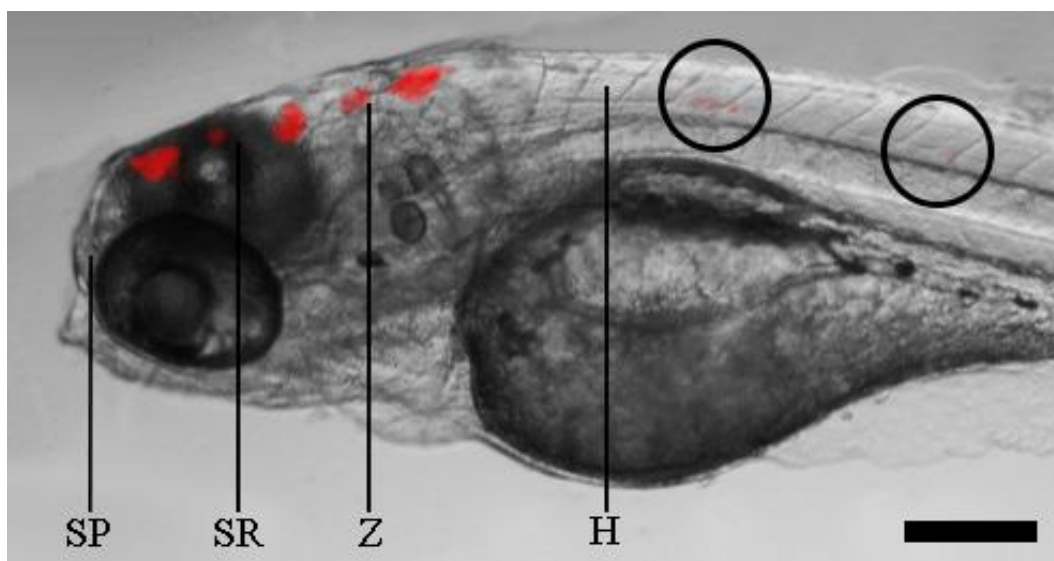


**Slika 17. Apoptotične glioblastomske celice U87-MG DsRed (shRNA, non-shRNA, divji tip) v možganih zarodkov cebric, označene s puščico, 100× povečava. Merilo: 200 µm.**

Apoptotične celice v možganih zarodkov cebric smo opazili pri vseh treh celičnih klonih (Sl. 17), vendar razlike v številu apoptotičnih celic med posameznimi celičnimi kloni niso statistično značilne.

#### 4.5 POTOVANJE GLIOBLASTOMSKIH CELIC V POSKUSU *IN VIVO*

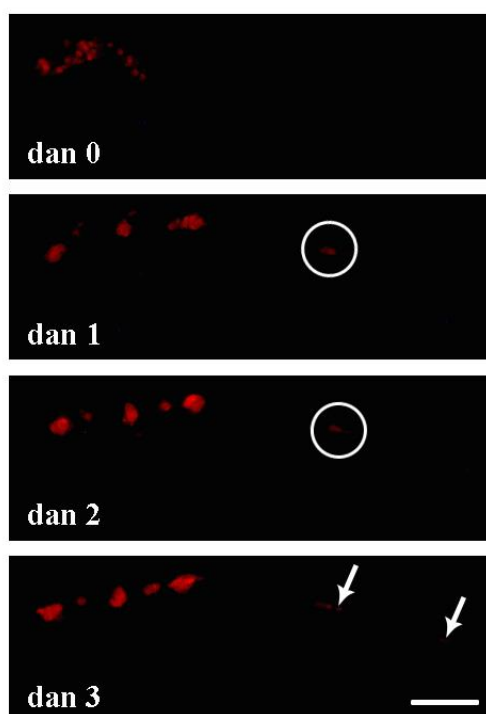
Centralni živčni sistem se pri cebricah začne razvijati že 9 ur po oploditvi jajčeca, medtem ko se možgani in hrbtenjača oblikujejo 48 ur po oploditvi (Kari in sod., 2007; Vittori in sod., 2015). Celice GBM smo ksenotransplantirali v dva dneva stare zarodke cebric, ki imajo dobro vidne možgane in hrbtenjačo. V času poskusa smo opazili potovanje glioblastomskih celic iz možganov v posteriorni del hrbtenjače tri dni starega zarodka cebrice (Sl. 18). Neobdelani sliki zarodka cebrice in fluorescence glioblastomskih celic sta v Prilogi B. Iz črno-rdeče fluorescenčne slike glioblastomskih celic U87-MG DsRed je namreč bolje razvidna fluorescenca v predelu hrbtenjače zarodka.



**Slika 18. Zarodek cebrice z injiciranimi glioblastomskimi celicami U87-MG DsRed v možganih zadnji dan poskusa, pri katerem smo opazili potovanje tumorskih celic v posteriorni del (obkroženo) vzdolž**



**hrbtenjače pri 40× povečavi.** Legenda: SP – sprednji možgani (prosencephalon); SR – srednji možgani (mesencephalon); Z – zadnji možgani (rhombencephalon); H – hrbtenjača. Merilo: 200 µm.



**Slika 19. Fluorescenčni kanal slik invazije celic U87-MG DsRed (obkroženo) iz možganov v posteriorni del zarodka vzdolž hrbtenjače pri 40× povečavi.** S puščicami so označene skupine celic, ki so se odcepile iz migrirajočih celic. Merilo: 200 µm.

Prvi dan po implantaciji so se posamezne celice združile v skupke oz. tumorje v možganih zarodkov (Sl. 19). Potovanje celic U87-MG DsRed (divji tip) smo opazili 24 ur po ksenotransplantaciji celic v možgane zarodka cebrice (Sl. 18, 19). To smo opazili le pri enem od 171 osebkov, ki smo jim injicirali celice GBM v možgane, medtem ko invazije celic vzdolž hrbtenjače nismo opazili pri zarodkih, ki smo jim injicirali celice v rumenjarkovo vrečko. Glavnina premika glioblastomskih celic se je zgodila 24 ur po ksenotransplantaciji celic v možgane in sicer za 442 µm (merjeno od sredine najbolj desnega skupka celic do sredine skupka obkroženih celic), medtem ko so se naslednji dan premaknile le za 23 µm. Če primerjamo sliko na dan 2 in dan 3 opazimo, da se sta se od celic, ki migrirajo v posteriorni del, odcepili še dve skupini celic, ki sta na Sl. 19 označeni s puščico. Bližja skupina celic je oddaljena za 33 µm, druga pa kar za 332 µm. Iz Sl. 19 je razvidno tudi, da so celice po invaziji v predel hrbtenjače preživele, ne pa tudi, ali so se delile, saj porasta v jakosti fluorescence teh celic nismo zaznali.

## 5 RAZPRAVA

Glioblastom je najbolj maligni možganski tumor s kratko dobo preživetja bolnikov. Nekontrolirana proliferacija celic, difuzna infiltracija v okoliško tkivo možganov, nekroza, angiogeneza ter izogibanje apoptozi so lastnosti GBM, ki vplivajo na slabo prognozo in otežujejo zdravljenje. Ker trenutna zdravljenja ne omogočajo popolne odstranitve tumorskih celic, pogosto pride do ponovitve in napredovanja bolezni (Kesari, 2011) in prav zato so novi terapevtski pristopi nujno potrebni.

Helikaze RecQ vzdržujejo stabilnost genoma in tako preprečujejo razvoj tumorjev, zato jih smatramo za skrbnike genoma. Mutacije v genih treh helikaz iz družine RecQ (BLM, WRN, RECQ4) so povezane z povečano možnostjo za razvoj tumorjev, medtem ko utišanje gena za RECQ1 poveča občutljivost rakavih celic na zdravljenje s hidroksiureo, temozolomidom, kamptotecinom in tudi na sevanje. Zaradi utišanja oz. napak v delovanju helikaz RecQ se poveča število napak v DNA, kar vpliva tudi na proliferacijo celic (Hickson, 2003; Sharma in Brosh, 2007; Mendoza-Maldonado in sod., 2011). Prav helikaze RecQ bi zaradi naštetih lastnosti lahko postale potencialne tarče zdravljenja rakavih bolnikov in zato smo v okviru magistrske naloge želeli preučiti vpliv utišanja helikaze RECQ1 na proliferacijo glioblastomskih celic.

### 5.1 PROLIFERACIJA CELIC U87-MG DSRED V POSKUSU *IN VITRO*

Vpliv utišanja helikaze RECQ1 smo najprej preverili s primerjavo treh celičnih klonov v poskusu *in vitro*. Glioblastomske celice smo gojili v mikrotitrski plošči in preko jakosti fluorescence tumorskih celic preverili stopnjo proliferacije. Celice shRNA so imele vstavljen plazmid z zapisom za shRNA, katere tarča je mRNA za RECQ1. Statistično značilne razlike med divjim tipom celic in ostalima celičnima klonoma kažejo na to, da na proliferacijo glioblastomskih celic očitno vpliva vstavljen plazmid p.SUPER.puro.

S poskusom *in vitro* smo potrdili, da je helikaza RECQ1 vpletena v proliferacijo celic, kar je v skladu z našimi pričakovanji. Utišanje helikaze namreč močno upočasni rast in proliferacijo glioblastomskih celic U87-MG DsRed, kar je pokazala statistična razlika na tretji dan poskusa med kontrolnimi celicami non-shRNA in celicami s trajno utišano helikazo. Rezultati našega poskusa *in vitro* se skladajo z rezultati predhodne raziskave Mendoza-Maldonado in sod. (2011), kjer so vpliv utišanja RECQ1 na proliferacijo celic preverili preko števila in velikosti kolonij celic. Ugotovili so, da je izražanje RECQ1 v glioblastomskih celicah močno povišano v primerjavi z normalnimi okoliškimi tkivi, kar je lahko povezano tudi z nizko proliferacijsko stopnjo možganskih celic. Utišanje helikaze RECQ1 pa ni vplivalo na proliferacijo fibroblastov (normalne nerakave celice), kar so s svojo raziskavo potrdili tudi Futami in sod. (2008a). Tudi pri normalnih celicah lahko pride do poškodb DNA ali napak pri podvojevanju DNA, vendar imajo te za razliko od rakavih celic delujoče nadzorne točke na koncu faze G<sub>1</sub> in tudi G<sub>2</sub>, ki zaustavijo celični cikel. Šele ko so vse napake popravljene, se celični cikel lahko nadaljuje. Rakave celice imajo pogosto okvarjene nadzorne točke celičnega cikla, zato v mitozo lahko vstopijo z napakami v DNA,

kar vodi v mitotično smrt. Učinek povišanega izražanja helikaze RECQ1 je učinkovitejše popravljanje napak v DNA in s tem preprečitev mitotične smrti. Verjetno so celice s povišanim izražanjem RECQ1 posledično tudi bolj odporne na običajne terapije glioblastoma, ki temeljijo na poškodovanju DNA (obsevanje v kombinaciji s temozolomidom), ker bolj učinkovito popravljajo napake v DNA (Futami in sod., 2008a; Mendoza-Maldonado in sod., 2011). Mendoza-Maldonado in sod. (2011) so dokazali, da so celice U87-MG DsRed z utišano helikazo RECQ1 bolj občutljive na temozolomid.

Utišanje RECQ1, ki sodeluje pri popravljanju DNA, povzroči mitotično celično smrt rakavih celic zaradi nepopravljenih napak v DNA. Hitrost proliferacije rakavih celic, stopnja povišanega izražanja RECQ1 in prisotnost okvar nadzornih točk so tisti dejavniki, ki določajo, koliko rakavih celic bo utišanje helikaze RECQ1 vodilo v mitotično celično smrt.

## 5.2 TEST PROLIFERACIJE Z IMUNOCITOKEMIJSKIM BARVANJEM PROTI OZNAČEVALCU KI-67

Izražanje gena za jedrni protein Ki-67 je povezano s proliferacijo celic. Protein se v času interfaze nahaja v jedru celic, med mitozo pa večinoma na površini kromosomov. Ker se Ki-67 izraža v vseh aktivnih fazah celičnega cikla ( $G_1$ , S,  $G_2$ , mitoza), ne pa tudi v fazi mirovanja ( $G_0$ ), ga uporabljamo kot označevalec za proliferirajoče celice (Scholzen in Gerdes, 2000). Delež proliferirajočih tumorskih celic služi kot napovedni dejavnik za potek bolezni (angl. *prognostic factor*) in izid zdravljenja (angl. *predictive factor*) ter kot diagnostično orodje za določitev vrste tumorja (Li in sod., 2015).

V magistrski nalogi smo pristnost antigena Ki-67 zaznali z indirektno imunofluorescenco. Na antigen smo vezali neoznačeno primarno protitelo, na katerega smo nato specifično vezali sekundarno protitelo s fluorescentnim barvilom, ki nam je omogočilo detekcijo Ki-67. Zanimalo nas je, ali utišanje helikaze RECQ1 vpliva na proliferacijo celic GBM.

Rezultati niso pokazali statistično značilnih razlik med kloni, zato ne moremo trditi, da utišanje RECQ1 z RNAi vpliva na proliferacijo celic GBM. V poskusu je bil relativni delež proliferirajočih celic shRNA v povprečju nižji tako od deleža celic non-shRNA kot tudi od divjega tipa celic U87-MG DsRed, prav tako pa je bil delež proliferirajočih celic z vstavljenim ekspresijskim vektorjem pSUPER.puro nižji kot pri celicah divjega tipa, kar se sklada z rezultati poskusa proliferacije *in vitro*. Kljub temu bi morali poskus ponoviti večkrat, da bi lahko potrdili ali z gotovostjo ovrgli te rezultate. Če odsotnost značilnih razlik med kloni odraža dejansko stanje, potem bi lahko manjši prirast števila celic shRNA pripisali predvsem mitotični smrti in ne zmanjšanemu deležu proliferirajočih celic v kulturi.

Test proliferacije bi bilo smiselno ponoviti na večjemu številu vzorcev celic in tudi na histoloških rezinah fiksiranih zarodkov cebrih.

### 5.3 PROLIFERACIJA CELIC U87-MG DSRED *IN VIVO* V ZARODKIH CEBRIC (*Danio rerio*)

Za učinkovitost oz. toksičnost novih zdravil ter za predklinične raziskave se kot modelni organizmi uporabljajo predvsem miši. Miši so pomemben model tudi v raziskavah biologije tumorjev in pri odkrivanju novih zdravil, vendar so stroški vzreje in izvedbe poskusov visoki, zaradi česar miši niso primerne v primerih testiranja večjega števila zdravil (Welker in sod., 2016). Cebrice so zaradi številnih prednosti, kot so visoka genetska homologija z ljudmi in prosojnost zarodkov, odličen vretenčarski modelni organizem. V zadnjem času se uporabljajo tudi za preučevanje razvoja raka *in vivo*, predvsem na področju raziskav angiogeneze, metastaziranja, testiranja protirakavih učinkovin in določanja toksičnosti zdravil (Zhao in sod., 2015). Ksenotransplantacija fluorescentno označenih tumorskih celic v zarodke cebric omogoča opazovanje tumorskih celic pri visoki ločljivosti v realnem času (Vittori in sod., 2015).

V magistrski nalogi smo celice U87-MG DsRed implantirali tako v rumenjarkovo vrečko kot tudi v možgane dva dneva starih zarodkov cebric. Z ektopično implantacijo celic smo preverili, ali mesto implantacije vpliva na proliferacijo celic. Ortotopična implantacija v možgane zarodkov pa predstavlja vnos celic v okolje, podobno tistemu v človeških možganih. Možgani so kompleksen organ, v katerem so prisotni drugi tipi celic, signalne molekule in ekstracelularni matriks in prav to je glavna razlika med poskusoma *in vivo* ter *in vitro*. Cebrice so odličen modelni organizem, saj predstavljajo kompleksnejše okolje za raziskave rakavih celic v primerjavi z raziskavami *in vitro*, hkrati pa poskusi potekajo hitreje in bolj etično v primerjavi z drugimi živalskimi modeli (Cuddapah in sod., 2014; Vittori in sod., 2015).

#### 5.3.1 Proliferacija celic U87-MG DsRed v rumenjarkovi vrečki zarodkov cebric

Izbira mesta, kamor bomo injicirali celice, je ključnega pomena pri ksenotransplantaciji celic v zarodke cebric. Ortotopična ksenotransplantacija celic ni vedno možna, saj se anatomska zgradba cebric in ljudi razlikuje, npr. ksenotransplantacija rakavih celic pljuč, dojk in prostate. Mesto injiciranja celic je odvisno tudi od razvojnega stadija zarodka, saj razvoj cebric poteka zelo hitro, zato lahko pride do spremembe v strukturi telesa in organov. Prav rumenjarkova vrečka, kamor so drugi raziskovalci pogosto vnesli humane rakave celice, je posebna struktura, ki se pri cebricah popolnoma reabsorbira le 6–7 dni po oploditvi, kar pomeni, da je ksenotransplantacija celic v rumenjarkovo vrečko mogoča le v zgodnejših razvojnih stopnjah. Rumenjarkova vrečka je v primerjavi z zadnjimi možgani precej velika struktura, kar olajša injiciranje večjega števila celic. Rumenjarkova vrečka predstavlja okolje, bogato s hranili, kar lahko spodbudi proliferacijo celic, hkrati pa gre za brezcelično oz. acelularno okolje, kar onemogoči pasiven transport injiciranih celic v druge predele telesa (Haldi in sod., 2006; Konantz in sod., 2012; Wertman in sod., 2016).

Pri ksenotransplantaciji celic v rumenjarkovo vrečko moramo upoštevati, da se bo mikrookolje v vrečki zaradi resorpcije rumenjaka spreminjalo (Vittori in sod., 2015). Prav sprememba mikrookolja pa lahko vpliva tudi na proliferacijo glioblastomskih celic. Kot kaže

je rumenjaka vrečka okolje, v katerem humane celice glioblastoma ne proliferirajo ali pa proliferirajo zelo počasi (Vittori in sod., 2015), kar smo v poskusu potrdili. Pri zelo počasni proliferaciji razlike med celicami shRNA in kontrolnimi kloni niso bile razvidne, zato lahko drugo hipotezo delno ovržemo. V odsotnosti proliferacije torej preživetje celic z zmanjšanim izražanjem RECQ1 v rumenjaki vrečki ni tako izrazito zmanjšano.

### 5.3.2 Proliferacija celic U87-MG DsRed v možganih zarodkov cebric

V zadnjem času se za raziskave razvoja tumorjev, angiogeneze, invazije, signalnih poti in testiranja zdravil uporabljajo cebrice, ki kažejo potencial za modelni organizem za raziskave gliomov (Lally in sod., 2007; Peal in sod., 2010; Lal in sod., 2012; Rampazzo in sod., 2013; Kitambi in sod., 2014; Eden in sod., 2015). Ksenotransplantacija glioblastomskih celic v možgane zarodkov cebric omogoča razvoj in preučevanje tumorja v okolju, ki je podobno tistemu v človeških možganih (Vittori in sod., 2015).

Poskus ortotopične ksenotransplantacije je pokazal statistično razliko v proliferaciji utišanih celic shRNA in kontrolnih celic non-shRNA, kar pomeni, da utišanje helikaze RECQ1 vpliva na proliferacijo celic U87-MG DsRed. Drugo hipotezo o upočasnjeni proliferaciji utišanih celic *in vivo* v možganih cebric lahko delno potrdimo. Statistične razlike drugi dan poskusa med divjim tipom celic in ostalima celičnima klonoma kažejo na to, da divji tip celic hitreje proliferira. Hkrati se rezultati poskusa ortotopične ksenotransplantacije celic U87-MG DsRed skladajo z rezultati poskusa *in vitro*, le da so bile relativne spremembe pri slednjem nekoliko večje. Tako pri *in vitro* kot pri *in vivo* poskusu v možganih so se statistično značilne razlike pokazale šele tretji dan poskusa. Proliferacija celic v možganih rib cebric zelo dobro sovпада z njihovo proliferacijo *in vitro*, kar pomeni, da so možgani cebric zelo primerni za potrjevanje poskusov proliferacije glioblastomskih celic *in vitro*, ter da so poskusi *in vitro* relevantni za raziskave proliferacije celic GBM. Ker utišanje helikaze RECQ1 upočasnjuje proliferacijo humanih glioblastomskih celic le *in vitro* ter v možganih, ne pa tudi v rumenjaki vrečki zarodkov cebric, lahko prvo hipotezo le delno potrdimo.

Arai in sod. (2011) so v svoji raziskavi *in vivo* ugotovili, da injiciranje siRNA, katere tarča je mRNA za RECQ1, zmanjša rast tumorja na spodnjem delu žrela pri miših. Ko so poleg siRNA v miši injicirali še cisplatin (CDDP), se je rast tumorja na račun zvišanja poškodb DNA in apoptoze oz. mitotične celične smrti še dodatno zmanjšala (Arai in sod., 2011). Kljub temu, da je zdravljenje z RNAi izredno obetavno, pa je pri tem ključnega pomena tudi varna in specifična dostava tarčnega zdravila do tkiv in organov. Leta 2008b so Futami in sod. dokazali, da je lokalna ali sistemska dostava RECQ1-siRNA z dodatkom polietilenamina (PEI) ali kationskih liposomov uspešno preprečila proliferacijo rakavih celic v miših (Futami in sod., 2008b). Učinkovitost utišanja RECQ1 oz. število mrtvih rakavih celic je pogojeno s proliferacijskim potencialom, s številom mutacij v rakavih celicah, ki vplivajo na delovanje nadzornih točk celičnega cikla in z nivojem izražanja helikaze RECQ1. Glioblastomske celice izpolnjujejo vse tri pogoje, saj je stopnja proliferacije celic visoka, večina celic GBM ima mutiran gen P53, ki sodeluje pri nadzoru celičnega cikla,

hkrati pa povečano izražajo RECQ1 (Futami in sod., 2008b; Mendoza-Maldonado in sod., 2011).

Helikaza RECQ1 je tako potencialna tarča za zdravljenje malignih tumorjev z RNAi v kombinaciji s kemoterapevtiki (Futami in Furuichi, 2015), saj odsotnost RECQ1 pripomore k večji občutljivosti celic GBM za zdravljenje s hidroksiureo ali temozolomidom (Mendoza-Maldonado in sod., 2011). V prid zdravljenja z RNAi govori tudi dejstvo, da utišanje RECQ1 nekoliko upočasni rast normalnih celic *in vitro*, a ne povzroči mitotične smrti (Futami in sod., 2008a). Tudi Tao in sod. (2014) so dokazali, da je izražanje RECQ1 v rakavih celicah jezika povišano in da utišanje gena za to helikazo vpliva na proliferacijo rakavih celic v miših. Pokazali so tudi, da utišanje helikaze RECQ1 zmanjša izražanje imunosupresivnih dejavnikov, interlevkina 10 (IL-10) in žilnega endotelnega rastnega dejavnika (VEGF), ki nadzorujejo migracijo tumorskih celic. Imunosupresivni dejavniki namreč zavirajo delovanje imunskega sistema, kar je ena izmed glavnih lastnosti tumorskih celic. Helikaza RECQ1 torej vpliva na izražanje genov, ki so vpleteni v migracijo, invazijo in metastaziranje, kar so dokazali tudi Li in sod. (2014) (Hanahan in Weinberg, 2011; Thomas in sod., 2012; Li in sod., 2014; Tao in sod., 2014). Glede na rezultate raziskav v magistrski nalogi lahko zaključimo, da helikaza RECQ1 predstavlja odlično molekularno tarčo za zdravljenje rakavih bolnikov. Utišanje RECQ1 je vplivalo na proliferacijski potencial celic in zmanjšalo proliferacijo glioblastomskih celic tako *in vitro* kot *in vivo* v možganih zarodkov cebric.

Primerjava ekotopične in ortotopične ksenotransplantacije celic je pokazala, da glioblastomske celice najhitreje proliferirajo v možganih, kar je povezano tudi s hitrostjo napredovanja bolezni in visoko stopnjo smrtnosti bolnikov z GBM (Urbańska in sod., 2014). Na napredovanje glioblastoma močno vpliva mikrookolje v možganih. Celice mikroglie, možganski makrofagi in makrofagi, ki vdirajo v tumor, sestavljajo kar 30% mase tumorja. Interakcija astrocitov in endotelijskih celic z GBM sproži proces reaktivne glioze in angiogeneze. Mikrookolje GBM namreč lahko sproži pretvorbo normalnih astrocitov v reaktivne, le ti pa z izločanjem določenih snovi lahko vplivajo na biologijo tumorja. Rezultati raziskav kažejo na to, da možgansko mikrookolje prispeva k boljši rasti in širjenju GBM (Graeber in sod., 2002; Wu in sod., 2010; Alves in sod., 2011; Charles in sod., 2012). Tudi z rezultati naših raziskav smo dokazali, da celice GBM bolje proliferirajo v možganih kot v rumenjakovi vrečki zarodkov cebric. S tem smo pokazali, da je ortotopična implantacija glioblastomskih celic bolj primerna za raziskave proliferacije celic kot ekotopična implantacija. Enake rezultate so dobili tudi Vittori in sod. (2015), ki so dokazali, da sta preživetje in proliferacija glioblastomskih celic boljša, če celice implantiramo v možgane. Možgani cebric za razliko od rumenjakove vrečke predstavljajo okolje, ki je bolj podobno tistemu v človeških možganih in prav zato so rezultati takšnih raziskav bolj relevantni. Poleg tega po nekaj dneh zaradi razvoja zarodka cebrice pride do skrčitve rumenjakove vrečke, kar se ne zgodi z možgani (Vittori in sod., 2015). Celice glioblastoma zelo redko metastazirajo izven možganov (Urbańska in sod., 2014), zato so raziskave v možganih in ne v rumenjakovi vrečki zarodkov cebric ključnega pomena.

Poskus proliferacije *in vitro* ter *in vivo* v možganih zarodkov cebric bi bilo smiselno podaljšati še za nekaj dni, saj so se statistično značilne razlike v proliferaciji celic pokazale prav na zadnji dan poskusa. Tako bi lahko še bolje ocenili, kakšen vpliv ima utišanje helikaze RECQ1 na proliferacijo celic U87-MG DsRed v daljšem časovnem obdobju.

#### 5.4 APOPTOZA CELIC U87-MG DSRED V MOŽGANIH ZARODKOV CEBRIC (*Danio rerio*)

Apoptoza je proces celične smrti, ki je pomemben za normalen razvoj organizma ali kot obrambni mehanizem. Prva morfološka sprememba celic v procesu apoptoze je skrčitev celic in zgostitev citoplazme, medtem ko celični organeli ostanejo nedotaknjeni. Nato pride do kondenzacije in fragmentacije jedrne DNA, ki jima sledita še razpad jedra in nastanek apoptotskih telesc, ki jih fagocitirajo sosednje celice (Saraste in Pulkki, 2000; Elmore, 2007).

V magistrski nalogi smo skušali ugotoviti, ali tudi tumorske celice v zarodkih cebric odmirajo v procesu apoptoze. Za ta poskus smo uporabili fluorescentno barvilo akridin oranžno, ki lahko preči celično membrano ter omogoča preprosto in hitro detekcijo apoptotičnih celic pri večjem številu zarodkov. Akridin oranžno obarva tako žive kot apoptotične celice. V živih celicah deluje kot indikator pH, saj se zadržuje v kislem okolju (v lizosomih in fagosomih), hkrati pa obarva tudi DNA in RNA. DNA se ob vezavi z akridin oranžnim obarva svetlo zeleno, RNA pa rdeče. Apoptotične celice se za razliko od živih celic obarvajo močnejše in ob osvetlitvi z modro svetlobo svetijo svetlo zeleno (Mpoke in Wolfe, 1997; Han in Burgess, 2010; Sarkissian in sod., 2014).

Pri vseh treh celičnih klonih smo zaznali apoptotične celice in sicer preko prekrivanja zelene (obarvanje celic z akridin oranžnim) in rdeče fluorescence (fluorescentni protein DsRed). Poleg tega so astrociti zarodkov bistveno manjši od celic U87-MG DsRed. Telo normalnih astrocitov meri približno 10  $\mu\text{m}$  v premeru, telo glioblastomske celice pa vse do 60  $\mu\text{m}$  (Kucheryavykh in sod., 2012). Apoptotične celice smo zaznali le pri nekaj zarodkih, zato rezultati tega poskusa niso statistično značilni. Zaradi odsotnosti statističnih razlik ne moremo trditi, da utišanje helikaze RECQ1 poveča nagnjenost glioblastomskih celic k apoptozi, torej lahko ovržemo tretjo hipotezo. Kljub temu bi bilo poskus smiselno ponoviti na večjem številu osebkov, saj bi tako lahko dobili drugačne rezultate. Pokazali smo, da je apoptoza razmeroma redek dogodek, vendar vseeno dovolj pogost, da smo ga zaznali.

Futami in sod. (2008a) so ugotovili, da je utišanje RECQ1 z RNAi v različnih vrstah rakavih celic sprožilo proces mitotične katastrofe. Ker imajo številne rakave celice okvarjene nadzorne točke v celičnem ciklu, pomeni, da lahko s poškodovano DNA vstopijo v mitozo. Nato pride do zaustavitve celičnega cikla v času mitoze, saj ne pride do razvrščanja kromosomov na dva dela, kar povzroči mitotično celično smrt. Proces mitotične katastrofe pa je ključen dogodek pri zdravljenju s protirakavimi učinkovinami, ki poškodujejo DNA (Futami in sod., 2008a). Citotoksični učinki in razvoj rezistence so glavni problem zdravljenja z radioterapijo in kemoterapijo. Izražanje helikaze RECQ1 je povišano v številnih rakavih celicah, kar kaže na pomembno vlogo te helikaze DNA pri vzdrževanju genomske stabilnosti hitro proliferirajočih celic. Utišanje RECQ1 bi v kombinaciji s

standardnimi zdravljenji pripomoglo k povišanju poškodb DNA v rakavih celicah in posledično tudi k boljšemu učinku zdravljenja (Futami in sod., 2010; Brosh, 2013). Zdravljenje z malo interferenčno RNA (siRNA) preko RNA-interference ima številne prednosti, saj se siRNA specifično veže na tarčno informacijsko RNA (mRNA), sodeluje pri razgradnji tarčne mRNA in je stabilna v citoplazmi, kar pomeni, da so za zdravljenje potrebne nizke koncentracije siRNA (Futami in Furuichi, 2015). Poleg tega utišanje helikaze RECQ1 ne vpliva na normalne celice, kar so v raziskavah dokazali Futami in sod. (2008a).

Rezultati imunocitokemijskega barvanja proti označevalcu Ki-67 in barvanja z barvilom akridin oranžno niso bili statistično značilni, zato ne moremo zaključiti ali je mehanizem, ki vpliva na zmanjšano proliferacijo utišanih celic shRNA, zmanjšan proliferacijski potencial ali mitotična celična smrt. Barvanje proti označevalcu Ki-67 nakazuje na zmanjšan proliferacijski potencial celic s trajno utišano helikazo RECQ1, vendar ni statistično značilno. Tudi barvanje z akridin oranžnim potrjuje odmiranje glioblastomskih celic z apoptozo, vendar smo zaznali premalo apoptotičnih celic pri kateremkoli celičnem klonu, da bi lahko trdili, da je zmanjšana proliferacija posledica mitotične celične smrti.

## 5.5 POTOVANJE GLIOBLASTOMSKIH CELIC V POSKUSU *IN VIVO*

Večina glioblastomov se pojavi v hemisferah velikih možganov, redki v možganskem deblu, izjemoma pa tudi v malih možganih in v hrbtenjači (Bruce in Kennedy, 2009; Ocvirk, 2009). Metastaze GBM izven možganov so izjemno redke in se pojavljajo s frekvenco 0,44%. Preko cerebrospinalne tekočine ali krvi metastaze GBM potujejo do vranice, popljučnice, pljuč, limfnih vozlov, jeter, kosti, trebušne slinavke in tankega črevesa. Glavni razlogi za nizko pojavnost glioblastomskih metastaz so verjetno prisotnost krvno-možganske bariere, odsotnost limfnih žil v možganih, hitra rast tumorja in kratek potek bolezni (Robert in Wastie, 2008; Urbańska in sod., 2014).

V poskusu *in vivo* smo opazili potovanje glioblastomskih celic U87-MG DsRed (divji tip) v posteriorni del dva dneva starega zarodka cebrice, pri katerem se je krvno-možganska bariera še razvijala (Fleming in sod., 2013). V našem poskusu smo potovanje celic v posteriorni smeri opazili že tretji dan po oploditvi, vendar ni šlo za metastaziranje, temveč za invazijo. Invazija celic običajno poteka po živčnih traktih v belini ali po površini krvnih žil, prav infiltrirajoča rast v okoliško tkivo v možganih pa je ena izmed lastnosti glioblastoma, ki onemogoči popolno kirurško odstranitev tumorja in vpliva na slabo prognozo bolnikov (Gole in sod., 2012; Gritsenko in sod., 2012). Invazijo celic iz možganov po hrbtenjači v posteriorni smeri zarodkov cebric so opazili tudi v drugih raziskavah, celice pa naj bi potovale s hitrostjo nekaj sto mikrometrov na dan (Vittori in sod., 2015; Vittori in sod., 2016), kar smo dokazali tudi v našem primeru. Celic U87-MG DsRed nismo opazili izven centralnega živčnega sistema, kar kaže na to, da celice ne potujejo znotraj ožilja in sovpada z opažanji pri ljudeh (Bernstein in Woodard, 1995; Gritsenko in sod., 2012; Vittori in sod., 2016). Vittori in sod. (2016) so uspeli pokazati, da invazija glioblastomskih celic poteka po centralnem kanalu v hrbtenjači. Potovanje celic GBM poteka podobno kot potovanje mezenhimskih celic in sicer s pomočjo psevdopodijev. Potuje lahko posamezna celica ali pa



veriga celic, kar se je zgodilo v našem primeru (Friedl in Wolf, 2003; Gole in sod., 2012). Dejstvo, da smo invazijo celic opazili le pri enem od 171 osebkov z implantiranimi celicami U87-MG DsRed v možganih, je lahko povezano z mielinizacijo aksonov, saj se mielinska ovojnica v centralnem živčnem sistemu cebric razvije med 4. in 7. dnevom po oploditvi, prav aksoni pa so ena izmed poti invazije (Brösamle in Halpern, 2002; Gritsenko in sod., 2012). Raziskava Vittori in sod. (2016) je pokazala, da je invazija glioblastomskih celic U87-MG DsRed dokaj pogost dogodek, saj so potovanje teh celic v posteriorni smeri opazili pri tretjini ( $35\% \pm 5\%$ ) vseh osebkov z injiciranimi celicami GBM.

Iz rezultatov, pridobljenih v sklopu magistrske naloge, lahko zaključimo, da so cebrice primeren modelni organizem za ksenotransplantacijo glioblastomskih celic in da je za opazovanje proliferacije celic U87-MG DsRed potrebna implantacija teh celic v možgane zarodkov cebric. Z *in vitro* ter *in vivo* poskusi smo pokazali, da utišanje helikaze RECQ1 z RNA-interferenco vpliva na proliferacijo glioblastomskih celic, zato RECQ1 lahko smatramo kot potencialno tarčo za zdravljenje bolnikov z glioblastomom. Rezultati, pridobljeni v sklopu magistrske naloge, so lahko osnova za nadaljnje raziskave na področju proliferacije glioblastomskih celic v zarodkih cebric. Razumevanje mehanizma, preko katerega utišanje helikaze RECQ1 vpliva na proliferacijo celic in načina dostave siRNA do glioblastomskih celic v možganih zarodkov cebric, bi pripomoglo k razvoju novih tarčnih zdravil, ki bi v kombinaciji s standardnim zdravljenjem privedli do višje stopnje preživetja bolnikov z glioblastomom.

## 6 SKLEPI

V tej nalogi smo ovrednotili vpliv utišanja helikaze RECQ1 na proliferacijo glioblastomskih celic in na podlagi pridobljenih rezultatov lahko zaključimo:

- Utišanje helikaze RECQ1 zmanjša proliferacijo celic GBM *in vitro*.
- Utišanje helikaze RECQ1 zmanjša proliferacijo celic *in vivo* v možganih zarodkov cebric.
- Razlike v proliferaciji celic U87-MG DsRed v možganih zarodkov cebric sovpadajo z rezultati poskusov *in vitro*, kar pomeni, da so poskusi *in vivo* v možganih primerni za potrjevanje poskusov *in vitro*, ter da so rezultati poskusov *in vitro* relevantni.
- Mesto ksenotransplantacije (rumenjakova vrečka ali možgani) vpliva na proliferacijo glioblastomskih celic v zarodkih cebric. Proliferacija celic U87-MG DsRed je boljša v možganih, zato je ortotopična ksenotransplantacija zarodkov cebric bolj primerna za opazovanje proliferacije glioblastomskih celic od ektopične ksenotransplantacije.
- Utišanje helikaze RECQ1 vpliva na proliferacijo celic U87-MG DsRed, vendar zaradi odsotnosti statističnih razlik ne moremo potrditi ali je zmanjšana proliferacija posledica povišane stopnje apoptoze ali zmanjšanega proliferacijskega potenciala celic.
- Glioblastomske celice lahko iz možganov po hrbtnjači potujejo v posteriorni del zarodka cebrice.

## 7 POVZETEK

Cebrice (*Danio rerio*) so izredno pomemben modelni organizem za raziskovanje človeških bolezni, še posebej za raziskovanje tumorjev. Cebrice imajo podoben vzorec izražanja genov v rakavih celicah kot ljudje, kar je poleg prosojnosti zarodkov njihova glavna prednost. Ksenotransplantacija fluorescentno označenih tumorskih celic omogoča opazovanje le teh v živih zarodkih. V našem poskusu smo se osredotočili na proliferacijo glioblastomskih celic U87-MG DsRed. Glioblastom je najpogostejši možganski tumor in zaradi številnih malignih lastnosti, med katere sodi tudi nekontrolirana proliferacija celic, tudi tumor z najvišjo stopnjo smrtnosti. Povprečna doba preživetja bolnikov z GBM je kljub zdravljenju izredno kratka, zato so novi terapevtski pristopi nujno potrebni. V poskusih za magistrsko nalogo smo se osredotočili na helikazo RECQ1, ki sodeluje pri replikaciji in popraviljanju DNA ter na ta način ohranja stabilnost genoma in posredno vpliva tudi na proliferacijo celic. Izražanje te helikaze je v številnih rakavih celicah, tudi v glioblastomskih, povišano. Celice GBM imajo namreč številne mutacije v genih in okvarjene nadzorne točke v celičnem ciklu, zato morajo poškodbe DNA popraviti pred prehodom v mitozo. Povišano izražanje gena za RECQ1 omogoči popravilo poškodb na DNA pred mitozo, saj pri rakavih celicah ne pride do zaustavitve celičnega cikla, ki normalnim celicam omogoča popravilo napak na DNA.

Zanimalo nas je, ali bo utišanje helikaze RECQ1 z RNA-interferenco vplivalo na proliferacijo celic GBM. V poskusih smo uporabili tri celične klone – celice divjega tipa, celice s trajno utišano helikazo RECQ1 (shRNA) in celice, ki imajo vstavljen prazen vektor in služijo kot kontrola za utišane celice. Najprej smo izvedli poskus *in vitro* v mikrotitrskih ploščah in ugotovili, da utišanje RECQ1 zniža proliferacijo celic GBM. Nato smo za ugotavljanje deleža proliferirajočih celic imunocitokemijsko obarvali protein Ki-67, ki se izraža samo v aktivnih fazah celičnega cikla. Med celičnimi kloni nismo zaznali statistično značilnih razlik v deležu proliferirajočih celic. Ker poskus *in vitro* poteka v umetnem okolju in tako ne odraža razmer znotraj živega organizma, smo tumorske celice injicirali še v zarodke cebric in sicer v rumenjarkovo vrečko ter možgane. Tudi tu smo proliferacijo celic spremljali preko jakosti fluorescence celic GBM in ugotovili, da pri ortotopični implantaciji najslabše proliferirajo celice z utišano helikazo RECQ1, medtem ko pri ektopični implantaciji vsi kloni kažejo nizko proliferacijo. Rezultati tega poskusa kažejo na to, da na proliferacijo glioblastomskih celic vpliva mikrookolje v možganih zarodkov, rezultati merjenja proliferacije v možganih pa sovpadajo s tistimi, pridobljenimi v poskusu *in vitro*. Nazadnje smo preverili, ali utišanje helikaze RECQ1 poviša podvrženost celic k apoptozi *in vivo* v možganih zarodkov cebric. Razlik v številu apoptotičnih celic pri posameznem celičnem klonu nismo zaznali, delež apoptotičnih celic pa je bil nizek, kar ne potrjuje mitotične celične smrti kot mehanizma vpliva utišanja RECQ1 na proliferacijo, čeprav je možno tudi, da gre zgolj za preveč kratkotrajen in prerediteljski dogodek, da bi ga lahko merili z izbrano metodo.

Rezultati naših poskusov kažejo na RECQ1 kot potencialno molekularno tarčo in poudarjajo pomembnost nadaljnjih raziskav za uporabo RNA-interference v zdravljenju rakavih bolnikov.

## 8 VIRI

- Abràmoff M.D., Magalhães P.J., Ram S.J. 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics international*, 11, 7: 36–42
- Agrawal N., Dasaradhi P.V., Mohmmmed A., Malhotra P., Bhatnagar R.K., Mukherjee S.K. 2003. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67, 4: 657–685
- Alves T.R., Lima F.R., Kahn S.A., Lobo D., Dubois L.G., Soletti R., Borges H., Neto V.M. 2011. Glioblastoma cells: a heterogeneous and fatal tumor interacting with the parenchyma. *Life sciences*, 89, 15–16: 532–539
- Arai A., Chano T., Futami K., Furuichi Y., Ikebuchi K., Inui T., Tameno H., Ochi Y., Shimada T., Hisa Y., Okabe H. 2011. RECQL1 and WRN proteins are potential therapeutic targets in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer research*, 71, 13: 4598–4607
- ATCC. 2014. U-87 MG (ATCC® HTB-14™).  
[http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-14.aspx?geo\\_country=si#generalinformation](http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-14.aspx?geo_country=si#generalinformation) (7. dec. 2015)
- Avendaño C., Menendez J.C. 2008. DNA Intercalators and Topoisomerase Inhibitors, *DNA Topoisomerases V: Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*. 1. izd. Amsterdam, Elsevier: 209–211
- Bachrati C.Z., Hickson I.D. 2008. RecQ helicases: guardian angels of the DNA replication fork. *Chromosoma*, 117, 3: 219–233
- Batista Napotnik T., Mlinarič-Raščan I. 2005. Uporaba celičnih kultur parenhimskih jetrnih celic (hepatocitov) pri razvoju novih zdravil. *Farmacevtski vestnik*, 56, 2: 103–107
- Bennett R.J., Keck J.L. 2004. Structure and function of RecQ DNA helicases. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 39, 2: 79–97
- Bernstein J.J., Woodard C.A. 1995. Glioblastoma cells do not intravasate into blood vessels. *Neurosurgery*, 36, 1: 124–132
- Berti M., Ray Chaudhuri A., Thangavel S. in ostali. 2013. Human RECQ1 promotes restart of replication forks reversed by DNA topoisomerase I inhibition. *Nature structural & molecular biology*, 20, 3: 347–354
- Bohr V.A. 2008. Rising from the RecQ-age: the role of human RecQ helicases in genome maintenance. *Trends in biochemical sciences*, 33, 12: 609–620

- Brosh R.M. Jr. 2013. DNA helicases involved in DNA repair and their roles in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 13, 8: 542–558
- Brösamle C., Halpern M.E. 2002. Characterization of myelination in the developing zebrafish. *Glia*, 39, 1: 47–57
- Bruce J.N., Kennedy B. 2009. Glioblastoma Multiforme. Medscape, WebMD: 41 str. <http://emedicine.medscape.com/article/283252-overview> (12. jan. 2016)
- Bunz F. 2008. *Maintaining the Genome: Caretakers, Tumor Suppressor Genes V: Principles of Cancer Genetics*. 1. izd. Dordrecht, Springer Netherlands: 123
- Camp E., Lardelli M. 2001. Tyrosinase gene expression in zebrafish embryos. *Development genes and evolution*, 201, 3: 150–153
- Campisi J. 2003. Cancer and ageing: rival demons? *Nature reviews. Cancer*, 3, 5: 339–349
- Carlsson S.K., Brothers S.P., Wahlestedt C. 2014. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. *EMBO molecular medicine*, 6, 11: 1359–1370
- Chang J.E., Khuntia D., Robins H.I., Mehta M.P. 2007. Radiotherapy and radiosensitizers in the treatment of glioblastoma multiforme. *Clinical advances in hematology & oncology: H&O*, 5, 11: 894–902
- Charles N.A., Holland E.C., Gilbertson R., Glass R., Kettenmann H. 2012. The brain tumor microenvironment. *Glia*, 60, 3: 502–514
- Chu W.K., Hickson I.D. 2009. RecQ helicases: multifunctional genome caretakers. *Nature reviews. Cancer*, 9, 9: 644–654
- Chiu Y.L., Rana T.M. 2003. siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. *RNA*, 9, 9: 1034–1048
- Clontech. 2015. DsRed-Express Fluorescent Protein. [http://www.clontech.com/SI/Products/Fluorescent\\_Proteins\\_and\\_Reporters/Fluorescent\\_Proteins\\_by\\_Name/DsRed-Express\\_Fluorescent\\_Protein?sitex=10023:22372:US](http://www.clontech.com/SI/Products/Fluorescent_Proteins_and_Reporters/Fluorescent_Proteins_by_Name/DsRed-Express_Fluorescent_Protein?sitex=10023:22372:US) (7. dec. 2015)
- Croteau D.L., Popuri V., Opresko P.L., Bohr V.A. 2014. Human RecQ helicases in DNA repair, recombination, and replication. *Annual review of biochemistry*, 83: 519–552
- Cuddapah V.A., Robel S., Watkins S., Sontheimer H. 2014. A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nature reviews. Neuroscience*, 15, 7: 455–465

- Deng Y., Wang C.C., Choy K.W., Du Q., Chen J., Wang Q., Li L., Chung T.K., Tang T. 2014. Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: principles, challenges, and new strategies. *Gene*, 538, 2: 217–227
- Doherty K.M., Sharma S., Uzdilla L.A., Wilson T.M., Cui S., Vindigni A., Brosh R.M. Jr. 2005. RECQ1 helicase interacts with human mismatch repair factors that regulate genetic recombination. *The Journal of biological chemistry*, 280, 30: 28085–28094
- Eden C.J., Ju B., Murugesan M. in ostali. 2015. Orthotopic models of pediatric brain tumors in zebrafish. *Oncogene*, 34, 13: 1736–1742
- Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35, 4: 495–516
- Ferreira T., Rasband W. 2012. ImageJ User Guide, IJ 1.46r: 162 str.  
<http://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/146.html> (2. dec. 2015)
- Fleming A., Diekmann H., Goldsmith P. 2013. Functional characterisation of the maturation of the blood-brain barrier in larval zebrafish. *PLoS ONE*, 8, 10: e77548. doi: 10.1371/journal.pone.0077548: 12. str.
- Friedl P., Wolf K. 2003. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature reviews. Cancer*, 3, 5: 362–374
- Furnari F.B., Fenton T., Bachoo R.M. in ostali. 2007. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes & development*, 21, 21: 2683–2710
- Furuichi Y. 2001. Premature aging and predisposition to cancers caused by mutations in RecQ family helicases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 928: 121–131
- Futami K., Furuichi Y. 2015. RECQL1 and WRN DNA repair helicases: potential therapeutic targets and proliferative markers against cancers. *Frontiers in genetics*, 5: 441, doi: 10.3389/fgene.2014.00441: 11 str.
- Futami K., Kumagai E., Makino H., Goto H., Takagi M., Shimamoto A., Furuichi Y. 2008a. Induction of mitotic cell death in cancer cells by small interference RNA suppressing the expression of RecQL1 helicase. *Cancer science*, 99, 1: 71–80
- Futami K., Kumagai E., Makino H., Sato A., Takagi M., Shimamoto A., Furuichi Y. 2008b. Anticancer activity of RecQL1 helicase siRNA in mouse xenograft models. *Cancer science*, 99, 6: 1227–1236
- Futami K., Ogasawara S., Goto H., Yano H., Furuichi Y. 2010. RecQL1 DNA repair helicase: A potential tumor marker and therapeutic target against hepatocellular carcinoma. *International journal of molecular medicine*, 25, 4: 537–545

- Gallego O. 2015. Nonsurgical treatment of recurrent glioblastoma. *Current oncology*, 22, 4: e273–281, doi: 10.3747/co.22.2436: 9 str.
- Gilbert T.W., Sellaro T.L., Badylak S.F. 2006. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, 27, 19: 3675–3683
- Gladson C.L., Prayson R.A., Liu W.M. 2010. The pathobiology of glioma tumors. *Annual review of pathology*, 5: 33–50
- Goldlust S.A., Turner G.M., Goren J.F., Gruber M.L. 2008. Glioblastoma multiforme: multidisciplinary care and advances in therapy. *Hospital Physician*, 44, 6: 9–22
- Gole B., Huszthy P.C., Popović M., Jeruc J., Ardebili Y.S., Bjerkgvig R., Lah T.T. 2012. The regulation of cysteine cathepsins and cystatins in human gliomas. *International journal of cancer*, 131, 8: 1779–1789
- Graeber M.B., Scheithauer B.W., Kreutzberg G.W. 2002. Microglia in brain tumors. *Glia*, 40, 2: 252–259
- Gritsenko P.G., Ilina O., Friedl P. 2012. Interstitial guidance of cancer invasion. *The Journal of pathology*, 226, 2: 185–199
- Haar C.P., Hebbar P., Wallace G.C., Das A., Vandergrift W.A., Smith J.A., Giglio P., Patel S.J., Ray S.K., Banik N.L. 2012. Drug resistance in glioblastoma: a mini review. *Neurochemical research*, 37, 6: 1192–1200
- Hahn W.C., Weinberg R.A. 2002. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nature reviews. Cancer*, 2, 5: 331–341
- Haldi M., Ton C., Seng W.L., McGrath P. 2006. Human melanoma cells transplanted into zebrafish proliferate, migrate, produce melanin, form masses and stimulate angiogenesis in zebrafish. *Angiogenesis*, 9, 3: 139–151
- Han J., Burgess K. 2010. Fluorescent indicators for intracellular pH. *Chemical reviews*, 110, 5: 2709–2728
- Hanahan D., Weinberg R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 5: 646–674
- Hannon G.J., Rossi J.J. 2004. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature*, 431, 7006: 371–378
- Hickson I.D. 2003. RecQ helicases: caretakers of the genome. *Nature reviews. Cancer*, 3, 3: 169–178

- Hill A.J., Teraoka H., Heideman W., Peterson R.E. 2005. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 86, 1: 6–19
- Howe K., Clark M.D., Torroja C.F. in sod. 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496, 7446: 498–503
- Huang P., Allam A., Taghian A., Freeman J., Duffy M., Suit H.D. 1995. Growth and metastatic behavior of five human glioblastomas compared with nine other histological types of human tumor xenografts in SCID mice. *Journal of neurosurgery*, 83, 2: 308–315
- ISO 7346-3. Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] – Part 3: Flow-through method. 1996: 11 str.
- Jackson A.L., Linsley P.S. 2010. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nature reviews. Drug discovery*, 9, 1: 57–67
- Kari G., Rodeck U., Dicker A.P. 2007. Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 82, 1: 70–80
- Kesari S. 2011. Understanding glioblastoma tumor biology: the potential to improve current diagnosis and treatments. *Seminars in oncology*, 38, 6: S2–S10
- Kim W., Yoo H., Shin S.H., Gwak H.S., Lee S.H. 2014. Extraneural Metastases of Glioblastoma without Simultaneous Central Nervous System Recurrence. *Brain tumor research and treatment*, 2, 2: 124–127
- Kinzler K.W., Vogelstein B. 1997. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature*, 386, 6627: 761–763
- Kitambi S.S., Toledo E.M., Usoskin D. in ostali. 2014. Vulnerability of glioblastoma cells to catastrophic vacuolization and death induced by a small molecule. *Cell*, 157, 2: 313–328
- Konantz M., Balci T.B., Hartwig U.F., Dellaire G., André M.C., Berman J.N., Lengerke C. 2012. Zebrafish xenografts as a tool for *in vivo* studies on human cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1226: 124–137
- Kucheryavykh L.Y., Kucheryavykh Y.V., Rolón-Reyes K., Skatchkov S.N., Eaton M.J., Cubano L.A., Inyushin M. 2012. Visualization of implanted GL261 glioma cells in living mouse brain slices using fluorescent 4-(4-(dimethylamino)-styryl)-N-methylpyridinium iodide (ASP+). *BioTechniques*, 53, 5: 305–309



- Lal S., La Du J., Tanguay R.L., Greenwood J.A. 2012. Calpain 2 is required for the invasion of glioblastoma cells in the zebrafish brain microenvironment. *Journal of neuroscience research*, 90, 4: 769–781
- Lally B.E., Geiger G.A., Kridel S. in ostali. 2007. Identification and biological evaluation of a novel and potent small molecule radiation sensitizer via an unbiased screen of a chemical library. *Cancer research*, 67, 18: 8791–8799
- Langheinrich U. 2003. Zebrafish: a new model on the pharmaceutical catwalk. *BioEssays*, 25, 9: 904–912
- Li D., Frazier M., Evans D.B., Hess K.R., Crane C.H., Jiao L., Abbruzzese J.L. 2006a. Single nucleotide polymorphisms of RecQ1, RAD54L, and ATM genes are associated with reduced survival of pancreatic cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24, 11: 1720–1728
- Li D., Liu H., Jiao L., Chang D.Z., Beinart G., Wolff R.A., Evans D.B., Hassan M.M., Abbruzzese J.L. 2006b. Significant effect of homologous recombination DNA repair gene polymorphisms on pancreatic cancer survival. *Cancer research*, 66, 6: 3323–3330
- Li Z., Ptak D., Zhang L., Walls E.K., Zhong W., Leung Y.F. 2012. Phenylthiourea specifically reduces zebrafish eye size. *PLoS ONE*, 7, 6: e40132, doi: 10.1371/journal.pone.0040132: 14 str.
- Li X.L., Lu X., Parvathaneni S. in ostali. 2014. Identification of RECQ1-regulated transcriptome uncovers a role of RECQ1 in regulation of cancer cell migration and invasion. *Cell cycle*, 13, 15: 2431–2445
- Li L.T., Jiang G., Chen Q., Zheng J.N. 2015. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Molecular medicine reports*, 11, 3: 1566–1572, doi: 10.3892/mmr.2014.2914: 7. str.
- Marumoto T., Saya H. 2012. Molecular biology of glioma V: Glioma: Immunotherapeutic Approaches, Volume 746 of the series *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Yamanaka R. (ur.). New York, Landes Bioscience and Springer Science+Business Media: 2–11
- Mazia D., Schatten G., Sale W. 1975. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. *The Journal of cell biology*, 66, 1: 198–200
- Mendoza-Maldonado R., Faoro V., Bajpai S., Berti M., Odreman F., Vindigni M., Ius T., Ghasemian A., Bonin S., Skrap M., Stanta G., Vindigni A. 2011. The human RECQ1 helicase is highly expressed in glioblastoma and plays an important role in tumor cell proliferation. *Molecular cancer*, 10, 83, doi: 10.1186/1476-4598-10-83: 17 str.

- Motaln H., Koren A., Gruden K., Ramšak Ž., Schichor C., Lah T.T. 2015. Heterogeneous glioblastoma cell cross-talk promotes phenotype alterations and enhanced drug resistance. *Oncotarget*, 6, 38: 40998–41017
- Mpoke S.S., Wolfe J. 1997. Differential staining of apoptotic nuclei in living cells: application to macronuclear elimination in *Tetrahymena*. *The journal of histochemistry and cytochemistry*, 45, 5: 675–683
- Mrugala M.M. 2013. Advances and challenges in the treatment of glioblastoma: a clinician's perspective. *Discovery medicine*, 15, 83: 221–230
- Ocvirk J. 2009. Zaviralci angiogeneze v zdravljenju možganskih tumorjev. *Onkologija*, 13, 2: 127–129
- Ohgaki H., Dessen P., Jourde B. in ostali. 2004. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer research*, 64, 19: 6892–6899
- Ohgaki H., Kleihues P. 2013. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 19, 4: 764–772
- Oligoengine. 2011. pSUPER vectors, Protocols, Maps.  
<http://www.oligoengine.com/products/pSUPER.html> (8. dec. 2015)
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Draft proposal for a new guideline, fish embryo toxicity (FET) test. OECD guideline for the testing of chemicals. May 30, 2006 (1<sup>st</sup> version), Draft guideline, OECD, Italy.
- Peal D.S., Peterson R.T., Milan D. 2010. Small molecule screening in zebrafish. *Journal of cardiovascular translational research*, 3, 5: 454–460
- Pommier Y. 2009. DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition. *Chemical reviews*, 109, 7: 2894–2902
- Rampazzo E., Persano L., Pistollato F. in ostali. 2013. Wnt activation promotes neuronal differentiation of glioblastoma. *Cell death & disease*, 4, 2: e500, doi:10.1038/cddis.2013.32: 14. str.
- Robert M., Wastie M. 2008. Glioblastoma multiforme: a rare manifestation of extensive liver and bone metastases. *Biomedical imaging and intervention journal*, 4, 1: e3, doi: 10.2349/bij.4.1.e3: 4. str.
- Sanada S., Futami K., Terada A. in ostali. 2013. RECQL1 DNA repair helicase: a potential therapeutic target and a proliferative marker against ovarian cancer. *PLoS ONE*, 8, 8: e72820, doi: 10.1371/journal.pone.0072820: 8 str.

- Saraste A., Pulkki K. 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular research*, 45, 3: 528–537
- Sarkissian T., Timmons A., Arya R., Abdelwahid E., White K. 2014. Detecting apoptosis in *Drosophila* tissues and cells. *Methods*, 68, 1: 89–96
- Scholzen T., Gerdes J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology*, 182, 3: 311–322
- Serša G. 2009. Biološke in molekularne značilnosti malignih celic ter njihove nove tarče pri zdravljenju raka. *Farmaceutski vestnik*, 60, 2: 43–47
- Sharma S., Brosh R.M. Jr. 2007. Human RECQ1 is a DNA damage responsive protein required for genotoxic stress resistance and suppression of sister chromatid exchanges. *PLoS ONE*, 2, 12: e1297, doi: 10.1371/journal.pone.0001297: 25 str.
- Sharma S., Brosh R.M. Jr. 2008. Unique and important consequences of RECQ1 deficiency in mammalian cells. *Cell cycle*, 7, 8: 989–1000
- Sharma S., Sommers J.A., Choudhary S. in ostali. 2005. Biochemical analysis of the DNA unwinding and strand annealing activities catalyzed by human RECQ1. *The Journal of biological chemistry*, 280, 30: 28072–28084
- Sharma S., Doherty K.M., Brosh R.M. Jr. 2006. Mechanisms of RecQ helicases in pathways of DNA metabolism and maintenance of genomic stability. *The Biochemical journal*, 398, 3: 319–337
- Sherr C.J., McCormick F. 2002. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer cell*, 2, 2: 103–112
- Sidorova J.M., Monnat R.J. Jr. 2015. Human RECQ helicases: roles in cancer, aging, and inherited disease. *Advances in Genomics and Genetics*, 5: 19–33
- Tao J., Tao S., Han J., Zhou Z., Zhang X., Wang H., Chen R., Ji F., Zhu Y. 2014. RECQL1 plays an important role in the development of tongue squamous cell carcinoma. *Cellular physiology and biochemistry*, 33, 5: 1579–1590
- Thakkar J.P., Dolecek T.A., Horbinski C. in ostali. 2014. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 23, 10: 1985–1996
- Thomas A.A., Ernstoff M.S., Fadul C.E. 2012. Immunotherapy for the treatment of glioblastoma. *Cancer journal*, 18, 1: 59–68

- Tijsterman M., Ketting R.F., Plasterk R.H. 2002. The genetics of RNA silencing. *Annual review of genetics*, 36: 489–519
- Trdan Lušin T., Trontelj J. 2011. *In vitro* modeli za preučevanje metabolizma učinkovin v jetrih. *Farmacevtski vestnik*, 62, 4: 171–174
- Tuschl T. 2002. Expanding small RNA interference. *Nature biotechnology*, 20, 5: 446–448
- Urbańska K., Sokołowska J., Szmidt M., Sysa P. 2014. Glioblastoma multiforme – an overview. *Contemporary oncology*, 18, 5: 307–312
- Vittori M., Breznik B., Gredar T., Hrovat K., Bizjak Mali L., Turnšek T.L. 2016. Imaging of human glioblastoma cells and their interactions with mesenchymal stem cells in the zebrafish (*Danio rerio*) embryonic brain. *Radiology and Oncology*, 50, 2: 159–167, doi: 10.1515/raon-2016-0017: 9 str.
- Vittori M., Motaln H., Turnšek T.L. 2015. The study of glioma by xenotransplantation in zebrafish early life stages. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 63, 10: 749–761
- Welker A.M., Jaros B.D., Puduvali V.K., Imitola J., Kaur B., Beattie C.E. 2016. Standardized orthotopic xenografts in zebrafish reveal glioma cell-line-specific characteristics and tumor cell heterogeneity. *Disease models & mechanisms*, 9, 2: 199–210
- Wertman J., Veinotte C.J., Dellaire G., Berman J.N. 2016. Injection Location, The Zebrafish Xenograft Platform: Evolution of a Novel Cancer Model and Preclinical Screening Tool V: Cancer and Zebrafish: Mechanisms, Techniques, and Models. Langenau D.M. (ur.). Springer International Publishing: 304–305
- Wu A., Wei J., Kong L.Y. in ostali. 2010. Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. *Neuro-oncology*, 12, 11: 1113–1125
- Yang X.J., Cui W., Gu A. in ostali. 2013. A novel zebrafish xenotransplantation model for study of glioma stem cell invasion. *PLoS ONE*, 8, 4: e61801, doi: 10.1371/journal.pone.0061801: 9. str.
- Zhao S., Huang J., Ye J. 2015. A fresh look at zebrafish from the perspective of cancer research. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 34, 80, doi: 10.1186/s13046-015-0196-8: 9. str.

## ZAHVALA

**»Kdor išče cilj, bo ostal prazen, ko ga bo dosegel,  
kdor pa najde pot, bo cilj vedno nosil v sebi.«  
(Nejc Zaplotnik, Pot)**

Ob tej priložnosti bi se rada zahvalila vsem, ki ste mi pomagali na moji poti do cilja.

Iskrena hvala somentorju Milošu Vittoriju za dobro voljo, potrpežljivost, uvajanje v celični laboratorij in številne nasvete.

Hvala mentorici Lilijani Bizjak Mali, recenzentu Roku Kostanjšku in predsednici komisije Nadi Žnidaršič za natančen pregled in strokovne nasvete.

Hvala Tini Eleršek za pomoč in prostor v pisarni v namene statistike.

Hvala Barbari, Mateji in Jani ter vsem ostalim na Oddelku za genetsko toksikologijo in biologijo raka za pomoč v laboratoriju.

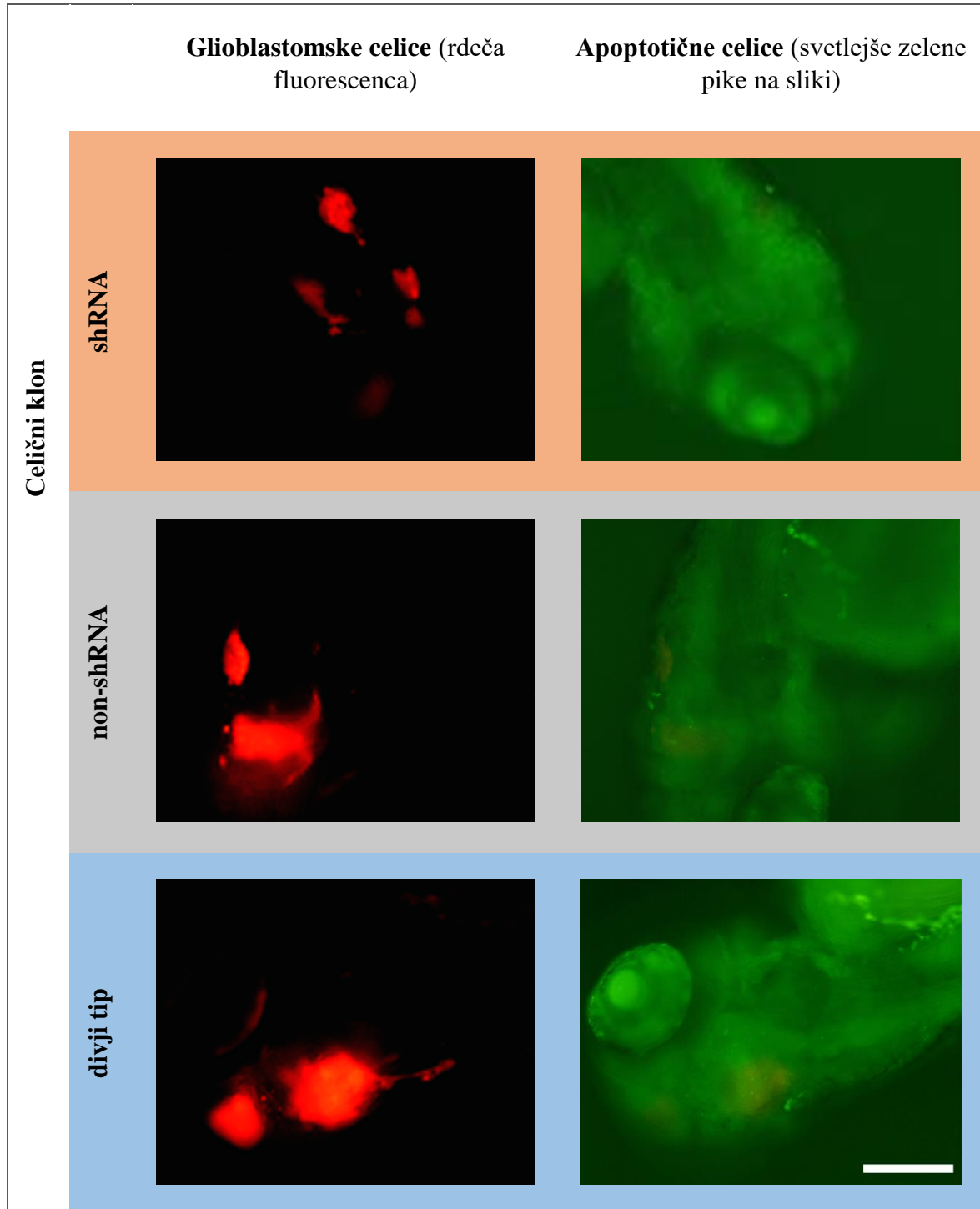
Za vse lepe trenutke, številne nasvete in smejalne gubice se zahvaljujem Tajdi.

Svoji družini in Zvonetu se zahvaljujem za podporo in spodbudo skozi celoten študij.

Posebna zahvala gre Saši Kenig s sinhrotona Elettra v Bazovici pri Trstu in Tamari Lah Turnšek ter Oddelku za genetsko toksikologijo in biologijo raka Nacionalnega inštituta za Biologijo v Ljubljani, ki so omogočili izvedbo eksperimentalnega dela magistrske naloge. Magistrska naloga je potekala v sklopu projekta »Glioma« v okviru Programa čezmejnega sodelovanja Slovenija-Italija 2007-2013 iz sredstev Evropskega sklada za regionalni razvoj in nacionalnih sredstev.

## PRILOGE

**Priloga A.** Preglednica s prvotnimi fluorescenčnimi kanali slik barvanja zarodkov cebric z akridin oranžnim, ki smo jih za prikaz v Rezultatih (poglavje 4.4) obdelali s programoma GIMP in Adobe Photoshop. Merilo: 200  $\mu\text{m}$ .



**Priloga B.** Preglednica s prvotnima slikama zarodka cebrice, pri katerem smo opazili potovanje tumorskih celic v posteriorni smeri. Levo je presečna slika zarodka cebrice, desno pa fluorescenčna slika glioblastomskih celic. Združeno sliko, prikazano v Rezultatih (poglavje 4.5) smo obdelali s programoma GIMP in Adobe Photoshop. Merilo: 200  $\mu\text{m}$ .

