

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Urška RAZBORŠEK

**UPORABA SFEROIDOV ZA DOLOČANJE
BIOLOŠKIH LASTNOSTI TUMORSKIH CELIC PO
UTIŠANJU ENDOGLINA**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Urška RAZBORŠEK

**UPORABA SFEROIDOV ZA DOLOČANJE BIOLOŠKIH LASTNOSTI
TUMORSKIH CELIC PO UTIŠANJU ENDOGLINA**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**THE USE OF SPHEROIDS FOR DETERMINATION OF
BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF TUMOR CELLS AFTER
SILENCING OF ENDOGLIN**

M. Sc. Thesis
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija – 2. stopnje, strukturne in funkcionalne biologije. Opravljeno je bilo na Oddelku za eksperimentalno onkologijo Onkološkega inštituta Ljubljana.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje oziroma Senat oddelka je dne 21. 2. 2014 odobrila naslov magistrske naloge. Za mentorja magistrskega dela je bila imenovana prof. dr. Maja Čemažar (OI), za recenzenta pa prof. dr. Gregor Serša (OI).

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednik: prof.dr. Uroš PETROVIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Mentorica: prof. dr. Maja ČEMAŽAR
Onkološki inštitut Ljubljana, Oddelek za eksperimentalno onkologijo
- Recenzent: prof. dr. Gregor SERŠA
Onkološki inštitut Ljubljana, Oddelek za eksperimentalno onkologijo

Datum zagovora: 24. 5. 2016

Podpisana izjavljam, da je naloga 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.

Urška Razboršek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
DK UDK 6:616(043.2)=163.6
KG tumorski sferoidi/elektroporacija/shRNA/antiCD105/proliferacija/migracija/invazija
AV RAZBORŠEK, Urška, diplomirana biologinja (UN)
SA ČEMAŽAR, Maja (mentor)/SERŠA, Gregor (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, II. stopnja – magistrski študijski program Strukturna in funkcionalna biologija
LI 2016
IN UPORABA SFEROIDOV ZA DOLOČANJE BIOLOŠKIH LASTNOSTI TUMORSKIH CELIC PO UTIŠANJU ENDOGLINA
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP XIV, 64 str., 1 pregl., 34 sl., 2 pril., 69 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Med novejših pristopov zdravljenja raka štejemo antiangiogeno terapijo, s katero zaviramo rast novih žil v tumorju. Med nove tarče za tovrstno terapijo spada protein endoglin (CD105). Uvrščamo ga v družino receptorjev za transformirajoči rastni dejavnik β (TGF- β) in sodeluje v aktivaciji kompleksne signalne poti, ki sproža proliferacijo in migracijo endotelijskih celic. Zaradi povišanega izražanja v tumorskem endoteliju so endoglin že uspešno uporabili za antiangiogeno terapijo raka in pokazali, da utišanje endoglina zmanjša proliferacijo, nastanek kapilaram podobnih struktur, migracijo in invazijo endotelijskih celic. Čeprav se endoglin močno in specifično izraža v endotelijskih celicah, pa ga lahko najdemo tudi na nekaterih drugih celičnih tipih, na primer na melanomskih celicah. Zaenkrat še ni povsem znano kako endoglin vpliva na značilnosti samih tumorskih celic, saj je bilo narejeno zelo malo študij, v katerih bi preučevali vpliv endoglina na tumorske celice. S tem namenom smo v magistrski nalogi ugotavljali, kako utišanje endoglina s plazmidom, ki kodira kratko lasnično RNA (shRNA) proti endoglinu, vpliva na rast, migracijo in invazijo sferoidov različnih tumorskih celic z visokim ali nizkim izražanjem endoglina. Za izvedbo genskega elektroprenosa, smo pripravili suspenzijo celic v hladnem elektroporacijskem pufu, dodali plazmidno DNA raztopljeno v vodi in mešanico odpipetirali med vzporedni ploščati elektrodi iz nerjavečega jekla ter sprožili električne pulze. Po končanem genskem elektroprenosu in inkubaciji smo iz tretiranih celic pripravili sferoide. Sledilo je spremljanje rasti, migracije in invazije sferoidov s pomočjo digitalne kamere, povezane z invertnim mikroskopom. Terapija je statistično značilno zmanjšala rast sferoidov, predvsem pri celični liniji B16F1 in TS/A. Površina migracije se je statistično značilno zmanjšala le pri celicah B16F1, medtem ko večjega vpliva na invazijo nismo opazili pri nobeni od preučevanih linij. Predvsem zaradi učinka na rast lahko sklepamo, da ima anti CD105 terapija vpliv, ne samo na endotelijske, ampak tudi na same tumorske celice.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Du2
- DC UDC 6:616(043.2)=163.6
- CX tumor spheroids/electroporation/shRNA/antiCD105/proliferation/migration/invasion
- AU RAZBORŠEK, Urška
- AA ČEMAŽAR, Maja (supervisor)/SERŠA, Gregor (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Structural and Functional Biology
- PY 2016
- TI THE USE OF SPHEROIDS FOR DETERMINATION OF BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF TUMOR CELLS AFTER SILENCING OF ENDOGLIN
- DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
- NO XIV, 64 p., 1 tab., 34 fig., 2 ann., 69 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Antiangiogenic therapy is one of the newer approaches to cancer treatment, which inhibits growth of new blood vessels. Among new targets for such therapy is a protein called endoglin (CD105). It is a member of the transforming growth factor β (TGF- β) receptor family and participates in the activation of a complex signaling pathway that triggers proliferation and migration of endothelial cells. Due to the increased expression in tumor endothelium, endoglin was successfully used for antiangiogenic cancer therapy. It was shown that its silencing results in decreased proliferation, tube formation, migration and invasion of endothelial cells. Although endoglin is strongly and specifically expressed in endothelial cells, it is also found on certain tumor cell types, such as melanoma cells. It is still not exactly known how endoglin affects the characteristics of the tumor cells, as there were very few studies done, which examined the impact of endoglin on tumor cells. To this end, we studied the impact of endoglin silencing, using plasmid DNA encoding short hairpin RNA (shRNA) against endoglin, on growth, migration and invasion of spheroids of variety of tumor cells with high or low expression of endoglin. To carry out the gene electrotransfer, we prepared a cell suspension in an ice-cold buffer, added the plasmid DNA dissolved in water and pipetted the mixture between two parallel stainless-steel plate electrodes and applied the electric pulses. After the gene electrotransfer and incubation of the treated cells, we formed the spheroids. This was followed by monitoring spheroid growth, migration and invasion by capturing the images with a digital camera connected to an inverted microscope. The therapy resulted in a significantly decreased growth, particularly of B16F1 and TS/A spheroids. The area of cell migration significantly decreased only in B16F1 spheroids, whereas a significant impact on cell invasion was not observed in any of the studied cell lines. Mainly due to the impact on spheroid growth we can assume that anti endoglin therapy affects, not only endothelial cells, but also tumor cells themselves.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	X
SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV	XI
SLOVARČEK.....	XIII
1 UVOD	1
1.1 PREDSTAVITEV PROBLEMA	1
1.2 HIPOTEZE IN NAMEN DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 RAK	3
2.1.1 Vrste raka.....	4
2.1.2 Značilnosti rakavih celic.....	4
2.2 KANCEROGENEZA.....	5
2.2.1 Geni udeleženi pri nastanku raka.....	6
2.2.2 Migracija, invazija in metastaziranje.....	7
2.3 ANGIOGENEZA	8
2.3.1 Celični mehanizmi	9
2.3.2 Molekularni mehanizmi.....	9
2.3.3 Lastnosti tumorskega žilja.....	10
2.4 TERAPEVTSKI PRISTOPI V ONKOLOGIJI.....	11
2.4.1 Kirurgija	12
2.4.2 Radioterapija	12
2.4.3 Kemoterapija	12
2.4.4 Hormonska in biološka terapija.....	13
2.4.5 Genska terapija	13
2.4.5.1 Elektroporacija	13
2.4.5.2 Genski elektroprenos kot dostavni sistem za gensko terapijo.....	15
2.4.6 Proti žilna terapija	17

2.5	ENDOGLIN	20
2.5.1	Genetika in struktura.....	20
2.5.2	Vloga v TGF-β receptorskem kompleksu	21
2.5.3	Vloga pri angiogenezi in raku	22
2.5.4	Endoglin kot tarča za antiangiogeno diagnostiko in terapijo	23
2.6	INTERFERENCA RNA	24
2.6.1	Tipi molekul RNAi in njihovi mehanizmi delovanja	24
2.6.2	RNAi in rak.....	26
2.7	SFEROIDI.....	26
3	MATERIAL IN METODE.....	28
3.1	CELIČNE LINIJE	28
3.2	PLAZMIDNI VEKTOR.....	28
3.2.1	Gojenje bakterij za izolacijo plazmidov.....	29
3.2.2	Izolacija plazmida	29
3.2.3	Genski elektroprenos plazmidne DNA <i>in vitro</i>	29
3.3	PRIPRAVA SFEROIDOV	31
3.4	SPREMLJANJE BIOLOŠKIH LASTNOSTI TUMORSKIH CELIC V SFEROIDIH	31
3.4.1	Rast sferoidov	31
3.4.2	Migracija sferoidov	32
3.4.3	Invazija sferoidov	33
3.5	STATISTIKA.....	34
4	REZULTATI	35
4.1	Rast.....	35
4.2	Migracija	39
4.3	Invazija	45
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	49
6	POVZETEK (SUMMARY).....	53
6.1	Povzetek	53
6.2	Summary	56
7	VIRI	59

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO SLIK

Sl. 1: Značilnosti rakavih celic in z njimi povezane potencialne zdravilne učinkovine.....	5
Sl. 2: Signalna pot za nastanek invadopodijev in razgradnjo zunajceličnega matriksa.	8
Sl. 3: Angiogeni preklon.....	10
Sl. 4: Shematičen prikaz normalnega in tumorskega ožilja.	11
Sl. 5: Shema elektroporacije.....	14
Sl. 6: Mehanizem elektroprenosa.	15
Sl. 7: Genski elektroprenos kot večstopenjski proces.	16
Sl. 8: Princip delovanja antiangiogenih molekul.....	17
Sl. 9: Mehanizem delovanja žilno razdiralne terapije.	18
Sl. 10: Shematski prikaz strukture endoglina.	21
Sl. 11: Hipotetična vloga endoglina v TGF- β /ALK1 in TGF- β /ALK5 signalnih poteh.	22
Sl. 12: Potencialna pot delovanja RNAi.....	25
Sl. 13: Shematičen prikaz tumorja <i>in vivo</i> in tumorskega sferoida <i>in vitro</i>	27
Sl. 14: Shematični prikaz poteka dela.	28
Sl. 15: Z rdečo obrobo označena površina sferoida (primer kontrolnega sferoida B16F1 po 48h).....	32
Sl. 16: Z rumeno obrobo označena celotna površina migracije celic skupaj s sferoidom (primer kontrolnega sferoida B16F1 po 24 h)..	33
Sl. 17: Z rumeno obrobo označena površina sferoida brez migriranih celic (primer kontrolnega sferoida B16F1 po 24 h)..	33
Sl. 18: Reprezentativne slike rasti posameznih skupin sferoidov B16F1 (2. dan).....	35
Sl. 19: Rast B16F1 sferoidov, *P<0,05 proti vsem skupinam.....	36
Sl. 20: Reprezentativne slike rasti posameznih skupin sferoidov B16F10 (2. dan).....	37
Sl. 21: Rast B16F10 sferoidov, *P<0,05 proti vsem skupinam.....	37
Sl. 22: Reprezentativne slike rasti posameznih skupin sferoidov TS/A (2. dan).....	38
Sl. 23: Rast TS/A sferoidov, *P<0,05 proti vsem skupinam.....	38
Sl. 24: Primerjava rasti sferoidov vseh 3 celičnih linij glede na kontrolno skupino (3. dan poskusa), *P<0,05 proti vsem skupinam.	39
Sl. 25: Reprezentativne slike migracije celic sferoidov B16F1.....	40
Sl. 26: Hitrost migracije B16F1 sferoidov, *P<0,05 proti vsem skupinam.	41

Sl. 27: Reprezentativne slike migracije celic sferoidov B16F10.....	42
Sl. 28: Hitrost migracije B16F10 sferoidov.	42
Sl. 29: Reprezentativne slike migracije celic sferoidov TS/A.....	43
Sl. 30: Hitrost migracije TS/A sferoidov, *P<0,05 proti vsem skupinam, NS (ni statistično značilno).	44
Sl. 31: Primerjava površine migracije vseh 3 celičnih linij glede na kontrolno skupino (po 48 urah), *P<0,05 proti vsem skupinam, NS (ni statistično značilno).	45
Sl. 32: Sferoid celične linije B16F1 brez vidne invazije (po 24 urah).	46
Sl. 33: Reprezentativne slike invazije posameznih skupin sferoidov B16F10.....	47
Sl. 34: Reprezentativne slike invazije posameznih skupin sferoidov TS/A.....	48

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Kratice poskusnih skupin, njihov pomen in število enkratnih GET na posamezno skupino.	30
--	----

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

ALK1	kinaza, podobna aktivinskemu receptorju 1 (ang. activin receptor like-kinase 1)
ALK5	kinaza, podobna aktivinskemu receptorju 5 (ang. activin receptor like-kinase 5)
ANOVA	analiza variance (ang. analysis of variance)
bFGF	osnovni fibroblastni rastni dejavnik (ang. basic fibroblast growth factor)
bp	bazni par
CDK	ciklin odvisna kinaza (ang. cyclin-dependent kinases)
DDT	dikloro-difenil-trikloroetan (ang. dichlorodiphenyltrichloroethane)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)
EBV	virus Epstein-Barr
EMT	epitelijsko-mezenhimski prehod (ang. epithelial-mesenchymal transition)
EP	elektroporacija (ang. electroporation)
ET-1	endotelin-1
FBS	fetalni goveji serum (ang. fetal bovine serum)
FGF	fibroblastni rastni dejavnik (ang. fibroblast growth factor)
GET	genski elektroprenos (ang. gene electrotransfer)
HIF	hipoksija inducibilni dejavnik (ang. hypoxia inducible factor)
HPV	humani papiloma virus
IgG1	imunoglobulin G1
IL	interlevkin
LB	Luria-Bertani
mAb	monoklonsko protitelo (ang. monoclonal antibody)
milliQ	prečiščena voda z odstranjenim endotoksinom
miRNA	mikro ribonukleinska kislina (ang. micro ribonucleic acid)
MMP	matriksne metaloproteaze (ang. matrix metalloproteinases)
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina (ang. messenger ribonucleic acid)

NOS	sintaza dušikovega oksida (ang. nitric oxide synthase)
PBS	fosfatni pufer (ang. phosphate-buffered saline)
PDGF	trombocitni rastni dejavnik (ang. platelet-derived growth factor)
qRT-PCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času
RISC	z RNA sprožen kompleks utišanja (ang. RNA induced silencing complex)
RNA	ribonukleinska kislina (ang. ribonucleic acid)
RNAi	interferenca RNA (ang. RNA interference)
rpm	obratov na minuto (ang. revolutions per minute)
shRNA	kratka RNA z zanko (ang. short hairpin RNA)
siRNA	mala interferenčna RNA (ang. small interfering RNA)
T β R-I,II,III	receptorji tipa I, II in III za TGF- β
TGF- α , β	transformirajoči rastni dejavnik alfa in beta (ang. transforming growth factor alpha and beta)
TNF- α	tumor nekrotični dejavnik alfa (ang. tumor necrosis factor alpha)
ULA	zmanjšana zmožnost pritrjevanja (ang. ultra low attachment)
VEGF	vaskularni endotelijski rastni dejavnik (ang. vascular endothelial growth factor)

SLOVARČEK

Adhezija	Povezava med celicami s celičnimi adhezijskimi molekulami ali med celicami in ekstracelularnim matriksom ali makromolekularni kompleks, ki omogoča povezavo.
Angiogeneza	Razvoj žil iz že obstoječega ožilja.
Apoptoza	Programirana celična smrt, ki jo označuje krčenje celične vsebine, razpad jedra in citoplazme v telesca, obdana z membrano, odstranitev iz tkiva in razgradnja v fagocitih ali v istovrstnih celicah s povečano fagocitno sposobnostjo.
Benigen tumor	Počasi rastoč tumor, ki ne vdira v okolico, ne tvori metastaz in je praviloma nenevaren za organizem.
Bevacizumab	Humanizirano monoklonsko protitelo, ki deluje na krvožilni sistem, natančneje na VEGF.
Diferenciacija celic	Postopna, z delitvami napredujoča specializacija celic glede na njihovo kemijsko zgradbo, morfološke značilnosti in funkcije.
Elektroporacija	Metoda, ki pod vplivom kratkotrajnih električnih impulzov (približno 1 ms), omogoča tvorbo prehodnih por v celični membrani, kar močno poveča prepustnost membrane in omogoča uvajanje učinkovin v celice (npr. kemoterapevtika pri zdravljenju tumorjev).
Endotelij	Notranja plast obtočil iz enoskladnega ploščatega epitelija.
Genska terapija	Vnos specifičnega gena v somatsko ali zarodno celico z namenom spremeniti patološki fenotip celice.
<i>in situ</i>	Na mestu.
Invazija celic	Potovanje celic skozi zunajcelični matriks ali preko bazalne membrane, ki se začne z encimsko razgradnjo bariere, kateri nato sledi poselitev nove lokacije.
<i>in vitro</i>	V umetnem okolju.
<i>in vivo</i>	V živem organizmu.
Kancerogeneza	Nastanek in razvoj malignega tumorja.
Kombinirana terapija	Uporaba več različnih načinov zdravljenja hkrati.
Maligen tumor	Tumor katerega celice se nezadržno množijo, vdirajo v okolico in tvorijo metastaze.

Metastaziranje	Večstopenjski proces, pri katerem se tumorske celice razširijo iz primarnega tumorja in kolonizirajo oddaljene organe.
Migracija celic	Potovanje celic med embrionalnim razvojem, vnetnimi procesi, imunskimi odgovori, celjenjem ran in metastaziranjem, praviloma v odziv na določen kemijski signal.
Morfologija	Veda o zgradbi normalnih ali patološko spremenjenih celic, tkiv, organov ali organizmov.
Onkogen	Gen, ki lahko spodbudi nastanek rakave celice in je mutiran protoonkogen.
Onkologija	Veda o tumorjih.
Plazmid	Samostojni zunajkromosomski obročasti delček nukleinske kisline, ki razmeroma lahko prehaja iz celice v celico in s tem omogoča prenos genov iz bakterije na (tudi nesorodno) bakterijo ali v celice višjih organizmov.
Prolifecija celic	Rast in razmnoževanje celic.
Protoonkogen	Katerikoli normalen gen, ki je vključen v nadzor celične rasti in delitve ter se z mutacijo lahko spremeni v onkogen.
Rak	Bolezen, pri kateri se izrojene celice nezadržno množijo, pri čemer nastajajo maligne bule, razjede..
Receptor	Beljakovinska molekula na celični membrani ali v notranjosti celice, na katero se specifično vežejo telesu lastne (npr. nevrotansmitorji, hormoni, citokini, rastni dejavniki) ali v telo vnesene (strupi, toksini, zdravila) učinkovine in druge molekule.
Tumor	Nenormalna, atipična, nekontrolirana, navadno lokalna patološka rast tkiva.
Tumorska angiogeneza	Vaskularizacija tumorja z rastjo novih kapilar in venul iz že obstoječih, ki jo uravnavajo tumorski angiogenetski dejavniki, nujni za razvoj malignega tumorja in metastaz.
Tumor-supresorski gen	Gen, ki s svojim beljakovinskim produktom zavira razmnoževanje celic in nasprotuje njihovi maligni spremembi.
Vektor	Prenašalec, ki omogoči vstop genov v celico.

1 UVOD

1.1 PREDSTAVITEV PROBLEMA

Proti žilna terapija je eden izmed novih načinov zdravljenja raka, ki si počasi že utira pot k ustaljeni klinični praksi. Terapija izkorišča odvisnost rasti tumorja od njegove ožiljenosti in tarčno vpliva na žile, kar ovira dovod hranil in kisika do tumorskih celic. Poznamo dva pristopa k tej terapiji; antiangiogenega, ki zavira nastanek novih žil in ima citostatičen učinek, ter žilno razdiralnega, ki vpliva na že obstoječo tumorsko ožilje in ima citotoksičen učinek. Pričakovani posledici tovrstnega zdravljenja sta zmanjšana rast tumorja in inhibicija širjenja metastaz, kar bi lahko vodilo v nazadovanje bolezni. Načini s katerimi terapiji učinkujeta vključujejo predvsem nizko molekularna zdravila in monoklonska protitelesa. Omenjene učinkovine delujejo na potencialne tarče in s tem vplivajo na lastnosti tumorskega ožilja. Ena izmed najbolj preučevanih tarč antiangiogene terapije je molekula VEGF, ki ob vezavi z monoklonskim protitelesom bevacizumab prepreči rast žil in tako vpliva na zaustavitev širjenja raka. Ker pa je za tumorska obolenja značilna izredna genska heterogenost celic, je možnost, da bo zdravljenje uspešno samo s tovrstno monoterapijo, precej majhna. Prav zaradi tega so raziskave usmerjene k intenzivnemu iskanju novih tarč proti žilne terapije in preizkušanju različnih kombinacij zdravljenja. Eno izmed obetavnih tarč predstavlja glikoprotein endoglin (CD105), ki se izraža v aktiviranih endotelijskih celicah ožilja, povečano pa je izražen tudi pri nekaterih vrstah tumorjev. Vendar njegova distribucija ni omejena le na tumorska tkiva, ampak se le-ta izraža tudi na endoteliju zdravih tkiv, zaradi česa se ob uporabi tovrstne terapije lahko pojavijo določeni neželeni učinki. Razvoj je tako šel v smer iskanja zdravil z večjo tumorsko specifičnostjo. Dobre možnosti kot alternativni sistemskemu zdravljenju z monoklonskimi protitelesi, dosedanje raziskave pripisujejo lokalni terapiji genskega elektroprenosa siRNA (ang. small interfering RNA). Dokazali so, da z uporabo siRNA, predvsem pa z dolgoživejšo shRNA (ang. short hairpin RNA) proti endoglinu, lahko na tumorskem ožilju dosežemo antiangiogene in žilno razdiralne učinke. Kakšne vplive ima tovrstna genska terapija z utišanjem endoglina na tumorske celice, v strokovni literaturi še ni bilo opisano.

Možnost uspešnega zdravljenja rakavega obolenja je odvisna od mnogih dejavnikov, ki vključujejo starost bolnika, njegovo splošno fiziološko stanje telesa, biološke lastnosti tumorja in razširjenost same bolezni. Med biološke lastnosti tumorja med drugim štejemo procese proliferacije, migracije in invazije celic, saj imajo pomembno vlogo v postopnem napredovanju bolezni. Za ovrednotenje učinkovitosti terapije utišanja endoglina je tako potrebno spremljanje bioloških lastnosti tumorjev in njihova primerjava med različnimi celičnimi linijami.

Metoda tvorbe tumorskih sferoidov, kot modelov za tumorje, se je v podobnih poskusih izkazala za primernejšo v primerjavi z dvodimenzionalnimi celičnimi kulturami, saj mnogo bolje odražajo dejansko stanje v organizmu. Njihova velikost je ključnega pomena za potek celotnega poskusa, saj bi preveliki sferoidi lahko hitro postali nekrotični in tako neprimerni za nadaljnje analize. Za doseg optimalnih rezultatov je, predvsem zaradi omejene dolgoživosti shRNA molekul, pomemben tudi čas njihove inkubacije po terapiji.

Test proliferacije lahko izvedemo na različne načine, pri čemer je eden izmed njih preprosto izmeriti površino sferoidov. Prav tako tudi za test migracije in invazije sferoidov v literaturi najdemo opisane številne metode, ki jim je v večini skupno to, da zahtevajo prisostnost ustreznega zunajceličnega matriksa, ta pa na osnovi interakcij s celicami omogoča njihovo gibanje. Za izvedbo migracije zadošča uporaba fibronektina, test invazije pa pogosto vključuje prekritje celic s fibronektinom, kolagenom in lamininom, nemalokrat pa tudi s kompleksnejšimi mešanici proteinov zunajceličnega matriksa, primer katerega je matrigel. Pri nanašanju matriksa je bistvena njegova koncentracija, saj previsoke vrednosti vplivajo na sam proces invazije in ga lahko v celoti onemogočijo. Migracijo in invazijo lahko kvantificiramo z merjenjem površine, ki so jo celice prepotovale.

1.2 HIPOTEZE IN NAMEN DELA

Delovna hipoteza je bila, da utišanje endoglina vpliva na nastanek sferoidov in zmanjša migracijo in invazijo sferoidov tumorskih celic z visokim izražanjem endoglina.

Namena naloge sta bila optimizirati pripravo sferoidov različnih tumorskih celic z visokim ali nizkim izražanjem endoglina in ugotoviti, ali utišanje endoglina vpliva na nastanek, migracijo in invazijo sferoidov različnih tumorskih celic z visokim ali nizkim izražanjem endoglina.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RAK

Beseda rak zaobjema širok nabor različnih bolezni, ki se lahko pojavijo v kateremkoli organskem sistemu preko celotnega živalskega kraljestva. Edinstvena karakteristika raka je proliferacija celic, ki se razlikujejo od normalnih, tudi če so te razlike le malenkostne. Osnova problema je tako pojav spremenjenih celic in njihovo nakopičenje (Holland in Frei, 2003: 3). Velja splošno soglasje, da je rak genetska bolezen, pri kateri je akumulacija molekularnih sprememb v genomu somatskih celic, osnova napredovanja bolezni (DeVita, Hellman in Rosenberg, 2011: 2).

Na pojav raka z medsebojnimi učinki vplivajo številni fizikalni, kemični in biološki dejavniki iz okolja in načina življenja (prehrana, telesna dejavnost, kajenje, alkohol idr.), imunski sistem, hormoni, dedna nagnjenost in naključne mutacije. Fizikalni dejavniki vključujejo UV svetlobo in ionizirajoče sevanje, med pomembnejšimi kemičnimi dejavniki pa najdemo aflatoksine, heterociklične aromatske amine, benzopirene, N-nitrozamine, katrane in akrilamid. Biološki kancerogeni dejavniki so predvsem razni virusi (hepatitis B, virus Epstein-Barr (EBV), humani papiloma virus (HPV) idr.), med mikroorganizmi pa je najbolj poznan vpliv bakterije *Helicobacter pylori*. Pri nastanku raka, kot genetski bolezni, so soudeležene nekatere osnovne kategorije genov. Če pride do njihove mutacije v somatskih celicah, gre za sporadično obolenje, v primeru mutacije v spolnih celicah pa gre za dedno obliko raka. Gene, ki so največkrat vpleteni pri nastanku raka, lahko v grobem razdelimo v dve skupini: skupina, ki spodbuja rast in delitev celic – onkogeni, ter geni, ki prek svojih produktov zavirajo delitev celic s poškodovano DNA – tumor supresorski geni (Novaković S. in sod., 2009: 28-47).

Rak je vodilen vzrok smrti v ekonomsko razvitih državah in drugi najpogostejši v državah v razvoju. V razvitejših državah je zlasti posledica staranja in rasti števila prebivalstva ter vedno bolj tudi nezdravega načina življenja. Velik del svetovnega bremena te bolezni bi lahko preprečili s prenosom trenutnega znanja o kontroli rakavih obolenj v prasko, z izvajanjem protikadilskih programov, ozaveščanjem o pozitivnih učinkih cepljenja (rak jeter in materničnega vratu) in zgodnjem odkrivanju in zdravljenju bolezni ter s promocijo zdravega načina življenja (Jemal in sod., 2011). Tudi v Sloveniji se ogroženost z rakom zmeroma večja in je največja po 65. letu starosti. Ker se slovensko prebivalstvo stara, je samo zaradi vedno večjega deleža starejših pričakovati, da se bo število novih primerov raka še večalo. Pet najpogostejših vrst raka pri nas so kožni (razen melanoma), rak debelega črevesa in danke, prostate, dojke in pljuč, pri čemer pri moških prevladuje rak prostate, pri ženskah pa je na prvem mestu rak dojke. Raziskava kaže manjšanje umrljivosti za rakom ob večanju incidence, iz česar se da sklepati, da je zdravljenje uspešnejše in da vse več bolnikov ozdravi ali živi z rakom, medtem ko jih je prej več umrlo zaradi raka. (Rak v Sloveniji 2010, 2013).

2.1.1 Vrste raka

Najosnovnejša delitev deli tumorje na benigne in maligne. Benigni tumorji lahko nastanejo skoraj v vsakem tkivu, rastejo lokalno in ne razsevajo. Maligni značilno invadirajo v podporni mezenhim in metastazirajo preko krvnega in limfnega obtoka v druge dele telesa.

Obstajajo številni različni tipi raka. Pri primarnem razvrščanju upoštevamo mesto oziroma organ, kjer se je rak pojavil (govorimo npr. o raku dojke, raku pljuč, kostnem raku), natančnejšo vrsto pa določimo z mikroskopskim pregledom rakastega tkiva.

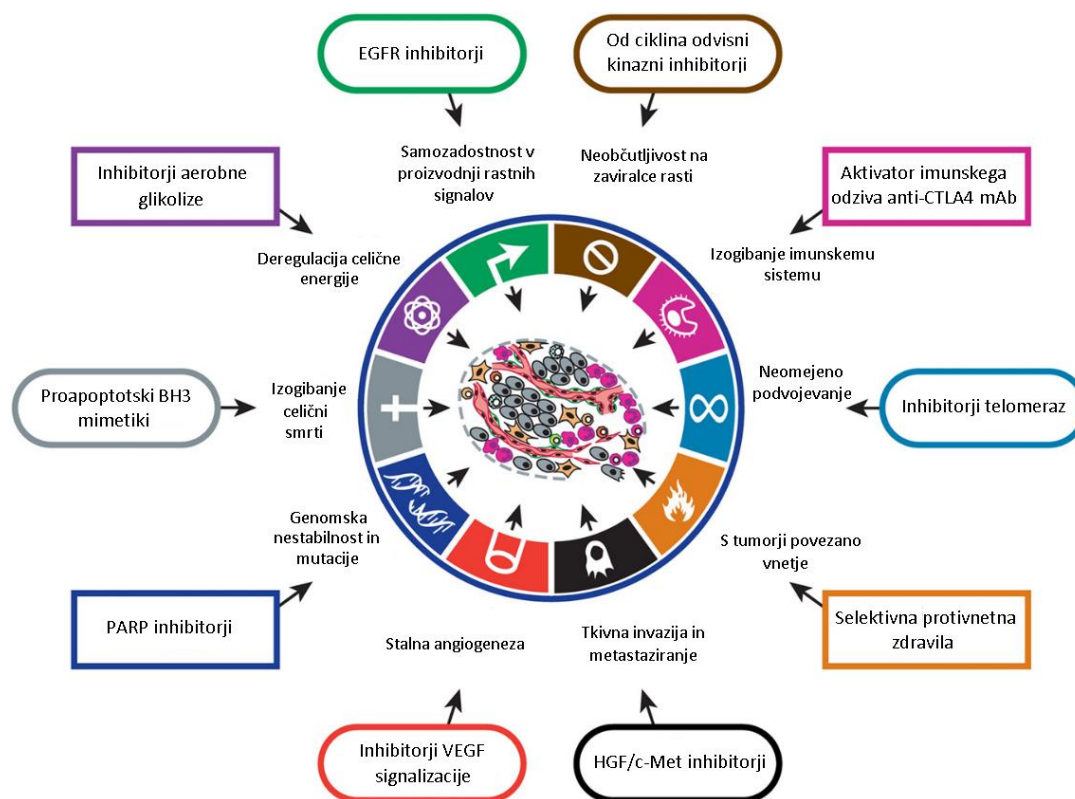
Ločimo štiri široke kategorije raka (Onkološki inštitut Ljubljana, 2015):

- Karcinomi so maligni tumorji, ki zrastejo iz epitelnih celic, ki gradijo večino telesnih organov. V kategorijo karcinomov uvrščamo okrog 80 % vseh rakov.
- Sarkomi so maligni tumorji, ki zrastejo iz celic opornih tkiv in se pojavljajo zlasti v vezivu, maščevju, kosteh in hrustancu.
- Levkemije so rakaste bolezni krvi in krvotvornih organov. V nasprotju z večino drugih rakov se navadno ne pojavljajo v obliki bul ali zatrdlin.
- Limfomi so rakaste bolezni limfatičnega sistema, ki ga v telesu tvori omrežje mezigovnic in bezgavk.

2.1.2 Značilnosti rakavih celic

Specifične značilnosti rakavih celic, po katerih se razlikujejo od normalnih, omogočajo tumorsko rast in pojav metastaz, pomagajo pa tudi pri razumevanju same biologije raka (Sl.1). Nedvomno najpomembnejša lastnost rakavih celic je njihova zmožnost vzdrževanja stalne proliferacije. Za razliko od njih normalna tkiva natančno nadzirajo nastajanje in izločanje rastnih dejavnikov, ki uravnavajo celični cikel, s čimer zagotovijo homeostazo števila celic in tako vzdrževanje normalne zgradbe in funkcije tkiva. Poleg samozadostnosti v proizvodnji rastnih signalov sta pomembni lastnosti rakavih celic tudi neobčutljivost na zaviralce rasti in izogibanje celični smrti. Splošno sprejeto je tudi dejstvo, da imajo rakave celice neomejen reproduktivni potencial. Normalnim celicam je zaradi senescence na račun krajšanja telomer to onemogočeno. Pri njih je namreč encim telomeraza, ki podaljšuje telomere, skoraj popolnoma odsoten. V normalnih odraslih tkivih poteka proces angiogeneze samo občasno, npr. v primeru celjenja ran. Pri tumorskih celicah je angiogeni preklap skoraj vedno aktiviran, kar povzroča stalno angiogenezo in s tem širjenje tumorja. Eni ključnih lastnosti, zaradi katerih je rak tako smrtonosen, sta invazija in metastaziranje v okoliška tkiva. Pri tem se povečata migracija in invazija celic, prav tako pa se spremeni tudi adhezija celic na ostale celice in zunajcelični matriks. Vedno več raziskav na tem področju predvideva dve dodatni lastnosti raka, ki sta vpleteni v patogenezo nekaterih ali vseh rakavih obolenj. Ena izmed njih je zmožnost modifikacije ali reprogramiranja celičnega metabolizma, da bi le-ta nudil najboljše možno podporo tumorski proliferaciji (aerobna glikoliza). Druga značilnost omogoča rakavim celicam izogibanje imunskemu uničenju, zlasti s T in B limfociti, makrofagi in naravnimi celicami ubijalkami. Pojavili sta se še dve dodatni značilnosti, ki olajšata pridobitev vseh prej naštetih lastnosti. Genomska nestabilnost in s tem mutacije povzročijo v rakavih celicah genetske spremembe, ki so vodilo tumorske progresije. Rast tumorja lahko spodbudijo tudi

s tumorjem povezana vnetja, sprožena z delovanjem celic prirojene imunosti, ki se v normalnih okoliščinah borijo proti infekcijam in celijo rane (Hanahan in Weinberg, 2011).



Slika 1: Značilnosti rakavih celic in z njimi povezane potencialne zdravilne učinkovine (Hanahan in Weinberg, 2011: 668).

2.2 KANCEROGENEZA

Kancerogeneza je kompleksen proces, med katerim prihaja do radikalnih sprememb na celični DNA. Pri tem je pomembno, da spremembe nastanejo na genih, ki stimulirajo delitev celic, in na genih, ki so vpleteni v mehanizme kontrole podvojevanja DNA, aktivacijo popravljanih mehanizmov ter sprožanje apoptoze. Vse nastale spremembe so ireverzibilne in se kot take prenesejo na naslednjo generacijo celic (Novaković S. in sod., 2009: 24). Kancerogenezo lahko delimo na tri stopnje: tumorska iniciacija, tumorska promocija in tumorska progresija. Proces zahteva maligno pretvorbo benignih hiperplastičnih celic v maligne ter invazijo in metastaziranje kot znaka nadaljnjih genetskih in epigenetskih sprememb pri čvrstih tumorjih. Rezultat iniciacije je začetna genetska sprememba, ki naredi te celice dozretnejše za maligne pretvorbe, kot so celice v normalnih razmerah, in je posledica kemijskih kancerogenov, sevanja, virusov, napak pri podvojevanju ipd. Tumorska promocija obsega selektivno klonalno ekspanzijo iniciranih celic. Ker je stopnja kopičenja mutacij proporcionalna stopnji celičnih delitev, klonalna ekspanzija tako producira še večjo populacijo celic, za katero velja visoko tveganje nadaljnjih genetskih sprememb. Tumorski promotorji so načeloma nemutageni in sami po sebi nimajo kancerogeneza učinka. Opisuje jih zmožnost zmanjšanja latentne dobe za

formacijo tumorja po izpostavitvi tkiva iniciatorju ali zmožnost povečanja števila nastalih tumorjev v tkivu, poleg tega pa lahko v povezavi s prenizko dozo iniciatorja za proženje kancerogeneze, inducirajo formacijo tumorja. Mednje uvrščamo specifične kemijske promotorje (dioksin, fenol, DDT), hormone, vnetne citokine ipd. Zadnja faza je tumorska progresija in obsega ekspresijo malignega fenotipa in tendenco tumorskih celic, da pridobijo še agresivnejše lastnosti. V tej fazi tumor preklopi iz avaskularne faze v vaskularno, kar posledično lahko vodi v invazijo in metastaziranje tumorskih celic iz primarne lokacije. Celice so tudi na tej stopnji nagnjene k povečani proliferaciji in genomski nestabilnosti, kar še naprej pomeni nove genetske in epigenetske spremembe, ki vključujejo aktivacijo onkogenov in izgubo funkcije tumor supresorskih genov (Holland in Frei, 2003: 267-269).

2.2.1 Geni udeleženi pri nastanku raka

Iz genetskega vidika je v nastanek raka vključenih veliko različnih genov, ki jih lahko razdelimo v nekaj osnovnih kategorij. Protoonkogeni kodirajo proteine, ki nadzorujejo rast in diferenciacijo celic. Z mutacijo protoonkogenov nastanejo onkogeni, kar lahko vodi v razvoj raka. Vključujejo gene, ki kodirajo različne rastne dejavnike, receptorje ali signalne prenašalce in jedrne transkripcijske dejavnike. Med procesom kancerogeneze se protoonkogeni ponavadi spremenijo v promotorskih regijah, kar ima za posledico nenadzorovano prepisovanje in povečano nastajanje produkta. Poleg mutacij na njihovo stopnjo izražanja vplivajo tudi metilacije. Njihovo izražanje na celičnem nivoju je dominantno, tako da za nastanek enega onko proteina zadostuje samo en mutiran alel. Med najboljše poznanimi onkogeni so *ras*, *myc*, *src* in *raf*.

Druga skupina genov so tumor supresorski geni. Osnovno delovanje njihovih produktov je zaviranje nekontrolirane delitve tumorskih celic in so za razliko od onkogenov med kancerogenezo neaktivni. Inaktivacija je lahko posledica mutacije v delu, kjer so kodirani strukturni proteini ali hipermetilacije regulatorne regije. V prvem primeru je rezultat neaktiven mutiran protein in v drugem zavrta transkripcija gena. Pogosto se mehanizma dopolnjujeta, s tem da imata vsak učinek na enega od obeh alelov. Med tumor supresorske gene štejemo zaviralce od ciklina odvisnih kinaz (CDK). CDK so encimi, ki nadzorujejo napredovanje celice skozi celični cikel. V to skupino tumorskih supresorjev med drugim sodijo, *p16*, *p21*, *p27* in tudi *p53*. Med tumor supresorske gene štejemo tudi gene, ki imajo regulatorno funkcijo pri podvojevanju celic in so neposredno odgovorni za nadzor kakovosti podvojene DNA ali za nadzor prehoda celic med fazami celičnega ciklusa. Med najbolj raziskane gene v tej skupini prištevamo *p53*, *apc*, *Rb*, *BRCA1* in *BRCA2*. Ob hudi poškodbi DNA se sprožijo mehanizmi, ki aktivirajo programirano celično smrt ali apoptozo in so prav tako regulirani s strani genov, ki jih lahko štejemo med tumor supresorske. Odziv se začne z aktivacijo proteaz (kaspaz), le te razkrojijo celične komponente vključno z DNA, kar nazadnje privede do smrti celice. Med tovrstne regulatorje štejemo gene iz skupine *bcl-2*.

Nedavno so znanstveniki odkrili prisotnost kratkih fragmentov RNA – mikro ribonukleinska kislina (miRNA); ta je s svojo vezavo na molekulo mRNA prav tako sposobna regulacije izražanja številnih genov. Ali bo miRNA delovala kot tumorski

supresor ali kot onkogen, je v veliki meri odvisno od tega, na katero mRNA se bo vezala. MiR-15a, miR-16 in let-7 zavirajo rast različnih tumorjev, zato jih uvrščamo med tumorske supresorje (Novaković S. in sod., 2009: 30-35).

2.2.2 Migracija, invazija in metastaziranje

Celična migracija je gibanje celic iz enega območja do drugega, praviloma gre za odziv na določen kemijski signal. Celična invazija je podoben proces, le da vključuje migracijo celic skozi zunajcelični matriks ali bazalno membrano, pri čemer najprej sledi encimska razgradnja bariere in nato poselitev nove lokacije (Sherman in sod., 2008). Celična migracija in invazija sta ključna koraka v številnih fizioloških procesih, kot so implantacija embria, embriogeneza, morfogeneza, nevrogeneza, angiogeneza, celjenje ran in vnetni procesi. Poleg tega sta oba vpletena tudi v patofiziologijo številnih bolezni, med drugimi v napredovanje rakavih obolenj (Bozzuto in sod., 2010).

Tvorba zasevkov ali metastaziranje je večstopenjski proces, pri katerem se tumorske celice razširijo iz primarnega tumorja in kolonizirajo oddaljene organe. Zasevki ali metastaze so krivi za več kot 90 % z rakom povezanih smrti. Glavne stopnje vključujejo invazijo tumorskih celic skozi bazalno membrano in okoliško tkivo, intravazacijo v krvne žile ter ekstravazacijo in rast na mestih različnih organov (Bravo-Cordero, 2012). Invazija in metastaziranje povzročita poškodbe tkiv na dva načina – z lokalno invazijo ter s kolonizacijo in poškodovanjem oddaljenih organov. Lokalna invazija lahko oslabi funkcijo vpletenega tkiva z lokalnim pritiskom, uničenjem in preprečevanjem normalne funkcije organa. Glavna prelomnica v napredovanju raka, je pojav oddaljenih metastaz. Od tega trenutka dalje zgolj lokalna terapija za zdravljenje pacienta ne zadošča več. Na tej stopnji se bolezen navadno konča s smrtjo (Holland in Frei, 2003: 151).

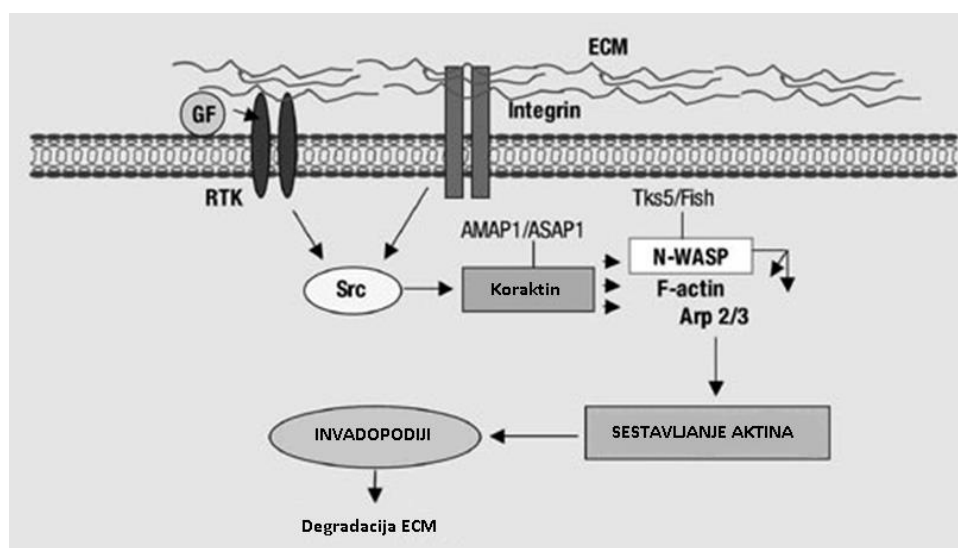
Epitelijsko-mezenhimski prehod (EMT) je pomemben prvi korak pri nastanku tumorskih celic z migratornim fenotipom, zmožnih sistemske tvorbe metastaz. Tumorske celice, podvržene EMT, tvorijo invadopodije z namenom pridobitve migratornega fenotipa. Te strukture jim omogočajo migracijo na račun razgradnje bazalne membrane in zunajceličnega matriksa. Sledi tvorba psevdopodijev s pomočjo katerih celice migrirajo skozi zunajcelični matriks. Možno je, da so na tej stopnji prisotni tudi še invadopodiji, ki v tem primeru omogočajo le usmerjeno migracijo in kemotaksijo. Ko tumorske celice dosežejo krvno žilo, naj bi spet uporabile invadopodije za razgradnjo bazalne membrane in tako vstopile v krvni obtok. Za učinkovito migracijo v prostoru je tako potrebno povezano delovanje obeh struktur. Formacija le-teh zahteva polimerizacijo aktina, pri čemer je molekularno ozadje delovanja invadopodijev in tudi psevdopodijev zelo podobno. Signalne poti (Sl. 2) invazivnih celic se v ta namen spremenijo, tako da povečajo aktivnost s kalcijem regulirane aktinske polimerizacije in s tem raven gibljivosti. Z nastankom teh struktur je tesno povezana družina Rho GTPaz (Bravo-Cordero in sod., 2012). Na direktno vpletenost invadopodijev v razgradnjo bazalne membrane žil tekom intravazacije in tvorbe metastaz kaže njihovo izločanje proteolitičnih encimov (Gligorijevic in sod., 2012).

Ločimo dva načina, na katera lahko celice migrirajo, in sta odvisna od tipa celic in razmer v samem tkivu. Prvi način je individualno potovanje celic, kot posledica odsotnosti

medceličnih stikov, to je značilno predvsem za limfome, levkemije in sarkome. Drugi način je kolektivna migracija celic v obliki večceličnih skupin, ta je prisoten v primerih, ko je medcelična adhezija ohranjena. Značilen je predvsem za tumorje epitelnega izvora (Friedl in Alexander, 2011).

Med invazijo igrajo pomembno vlogo interakcije med celicami in interakcije celic z okoliškim tkivom. Povezave preko celičnih adhezivnih molekul stabilizirajo tkivno integriteto, medtem ko je izguba ali sprememba teh celičnih površinskih proteinov povezana s povečanim metastatskim potencialom. Celična polarnost in organizacija sta med migracijo regulirana predvsem preko interakcij celičnih integrinov s proteini zunajceličnega matriksa. Interakcije med samimi celicami so pod vplivom transmembranskih glikoproteinov kadherinov, med katerimi je najboljše raziskan E(epitelni)-kadherin.

Proces invazije je aktiven in dinamičen proces, ki zahteva sintezo in razgradnjo proteinov. Med pomembnejšimi skupinami proteolitičnih encimov, ki so povezani s povečanim metastatskim potencialom številnih rakavih obolenj, najdemo matriksne metaloproteinaze (MMP) in družino aktivatorjev plazminogena (Holland in Frei, 2003: 152-154).



Slika 2: Signalna pot za nastanek invadopodijev in razgradnjo zunajceličnega matriksa. Okrajšave: ECM (zunajcelični matriks), F-actin (filamentozni aktin), GF (rastni dejavnik), RTK (receptorska tirozin-kinaza) (Bozzuto in sod., 2010: 70).

2.3 ANGIOGENEZA

Angiogeneza je temeljni proces, pri katerem se formirajo nove žile iz že obstoječih žil. Nujna je za reprodukcijo, razvoj in celjenje ran. S konstantno neregulirano angiogenezo je povezanih veliko bolezni. Med drugimi mora pri rakavih obolenjih tumor stalno stimulirati rast novih kapilar, da lahko nemoteno raste. Poleg tega novo nastale žile tumorja,

omogočajo tumorskim celicam možnost prehoda v krvožilni sistem in metastaziranje v oddaljene dele telesa, kot so jetra, pljuča ali kosti (Folkman, 1992).

Folkman in Becker (1963) sta z opazovanjem rasti tumorjev v izoliranih organih ugotovila, da je njihova rast na račun odsotnosti tumorske vaskularizacije močno omejena. Tako je Folkman leta 1971 predstavil hipotezo, da je rast tumorjev odvisna od angiogeneze.

Klinično zaznavanje rakavega obolenja načeloma postane mogoče šele potem, ko tumorji vzpostavijo angiogenezo in povečajo svojo maso. Brez dovoda krvi, so mikroskopski tumorji omejeni na velikost $< 1-2$ mm v premeru in so močno odvisni od kisika in hranil, s katerimi jih oskrbujejo okoliške žile. Sesalske celice, vključno s tumorskimi, zahtevajo žilo v bližini 100-200 μm . S tem, ko neožiljeni tumorji pridobivajo na masi, kar je posledica nekontrolirane proliferacije rakavih celic, nekatere celice padejo izven območja učinkovite difuzije kisika in postanejo hipoksične. Dobro je znano, da hipoksični pogoji inducirajo niz odzivov znotraj rakavih celic, kot je povečana transkripcija hipoksije inducibilnega dejavnika (HIF). Ta signalizacija privede do povečane koncentracije proangiogenih proteinov, kot so vaskularni endotelijski rastni dejavnik (VEGF), trombocitni rastni dejavnik (PDGF) in sintaza dušikovega oksida (NOS) (Davis in sod., 2008: 5-6).

Porušeno razmerje med proangiogenimi in antiangiogenimi dejavniki je privedlo do razvoja ideje o ti. angiogenem preklopu (Sl. 3), do katerega pride med tumorsko angiogenezo (Harris, 1997).

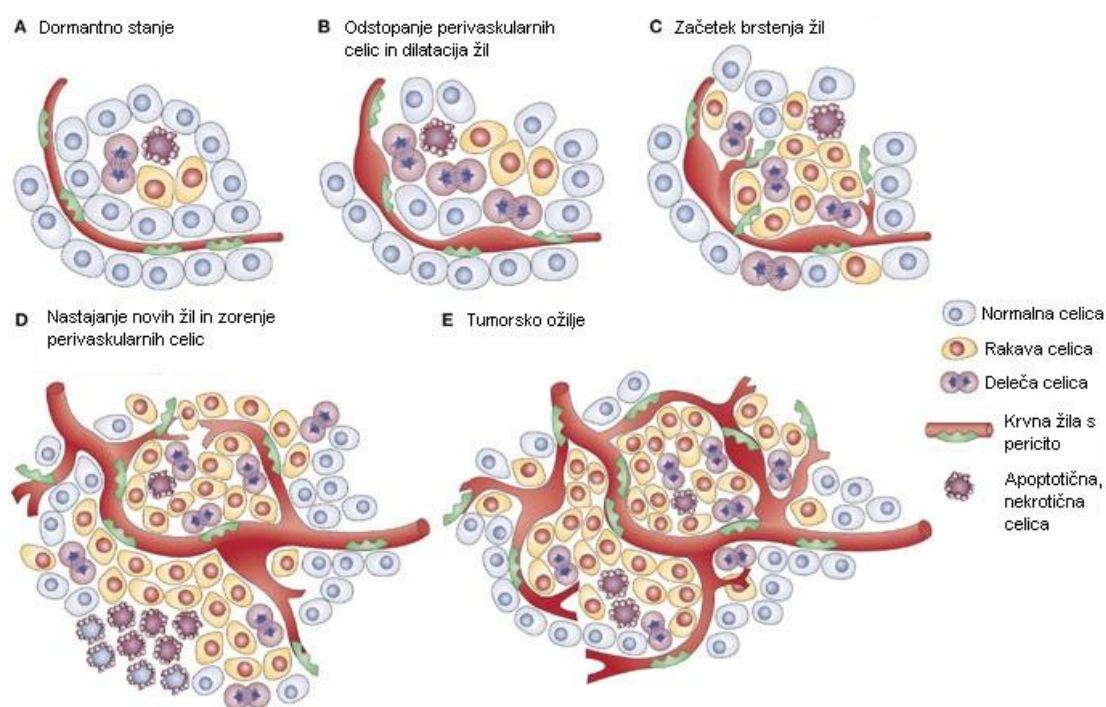
2.3.1 Celični mehanizmi

Tumorske žile rastejo na različne načine. Angiogeneza v ožjem pomenu besede je najpogostejši mehanizem neovaskularizacije, do katerega pride zaradi angiogenega preklopa, ki je posledica lokalne spremembe ravnotežja med endogenimi anti in proangiogenimi dejavniki v prid slednjim. Pri angiogenezi gre torej za izraščanje žil iz že obstoječe vaskulature. Drugi mehanizem je formacija žil *de novo* in ga imenujemo vaskulogeneza. Prekursorji endotelijskih celic (angioblasti) preidejo iz kostnega mozga ali periferne krvi v tumor, kjer pripomorejo k nastanku žilnega endotelija. Zadnji način nastanka žil je invaginacija, pri katerem se tumorske žile preoblikujejo in razširjajo z vključitvijo stolpca intersticijskega tkiva v lumen predhodno obstoječega ožilja. Prispevek posameznega mehanizma k nastanku tumorske vaskulature je še precej nejasen in variira med različnimi tumorji in stopnjami progresije, kar kaže na to, da gre za visoko časovno in prostorsko kontroliran proces. Kljub temu pa so molekularni mehanizmi, ki vodijo te tri procese precej podobni, saj je pri večini tumorjev vanje vključen VEGF (Davis in sod., 2008: 47-59).

2.3.2 Molekularni mehanizmi

Tumorske celice se hranijo na račun novih krvnih žil, katere se začnejo formirati, ko rakave celice začnejo izločati VEGF v okoliško tkivo. Vezava VEGF na receptor endotelijske celice aktivira številne proteine, ki posredujejo signal do njenega jedra. V

jedru signali povzročijo izražanje genov, ki so vpleteni v proliferacijo endotelijskih celic. Endotelijske celice aktivirane z VEGF začnejo izločati matriksne metaloproteinaze. MMP razgradijo zunajcelični matriks zgrajen iz proteinov in polisaharidov. Endotelijske celice se začnejo deliti in na račun razgrajenega matriksa migrirati v okoliško tkivo. Kmalu zatem se celice s pomočjo adhezijskih dejavnikov, kot sta npr. integrin α ali β , organizirajo v votle cevke, te pa se postopoma razvijejo v omrežje zrelih krvnih žil. Poleg VEGF kot angiogeni aktivatorji delujejo tudi osnovni fibroblastni rastni dejavnik (bFGF), transformirajoči rastni dejavnik $-\alpha$ in $-\beta$ (TGF- α in $-\beta$), tumor nekrotični dejavnik $-\alpha$ (TNF- α), PDGF, granulocitni stimulirajoči dejavnik, placentalni rastni dejavnik, interlevkin-8, hepatocitni ter epidermalni rastni dejavnik (Nishida in sod., 2006). Skupini naštetih rastnih dejavnikov se z novejšimi raziskavami pridružuje tudi endoglin.



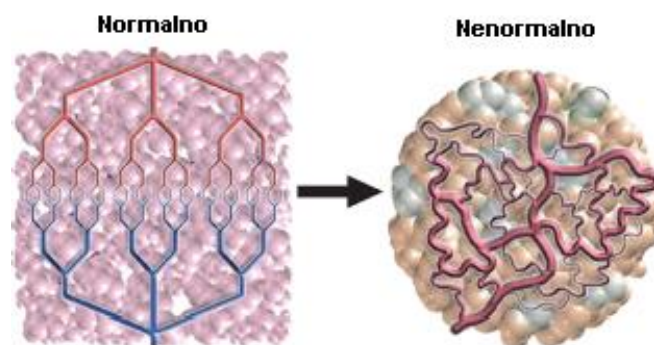
Slika 3: Angiogeni prekop (Bergers G. in Benjamin L. E., 2003: 403).

2.3.3 Lastnosti tumorskega žilja

Kljub pomembni vlogi tumorskega žilja za sam tumor in metastaziranje, sta njegova struktura in funkcija abnormalni (Sl. 4). Organizirana struktura in enakomerna distribucija normalnega žilja sta izgubljena, sistem nima definiranih arteriol, venul in kapilar, poleg tega so včasih lahko nepopolne tudi povezave med samimi žilami. Žile so neenakomerno oblikovane, z območji dilatacije in konstrikcije. Med endotelijskimi celicami so pogoste vrzeli, zaradi česar so žile visoko permeabilne, velikokrat pa izgubijo tudi odzivnost na endotelijske označevalce. Nepravilno so razvite podporne celice (pericite), ki so pogosto nezrele, imajo abnormalno proteinsko ekspresijo in morfologijo, njihova povezava z endotelijskimi celicami pa je ohlapna, kar še dodatno pripomore k povečani prepustnosti

tumorskega ožilja. Pri nekaterih tumorjih je bazalna membrana določenih žil popolnoma odsotna medtem, ko imajo žile nekaterih drugih tumorjev, kopičenje bazalnih komponent še povečano.

Odraž teh strukturnih nepravilnosti so številne funkcionalne abnormalnosti tumorskega žilja. Visoka permeabilnost vpliva na izgubo koncentracijskega gradienta med žilami in tumorjem, kakršen je prisoten v normalnih tkivih in kaže iz notranjosti žile navzven. To ovira predvsem zdravila z veliko molekulsko maso pri prehodu v tumor, okrnjen pa je prehod tudi hranilom in kisiku. Hiperpermeabilnost vpliva na počasen tok krvi v žilah in tako še dodatno pripomore k formaciji hipoksičnih in acidoznih regij. Hipoksija na račun zmanjšane razpoložljivosti reaktivnih kisikovih zvrsti, prispeva k rezistenci na določena zdravila in radioterapijo, poleg tega pa inducira genetsko nestabilnost in izražanje proangiogenih in prometastatskih genov. Zaradi zakisanosti in pomanjkanja kisika so ovirani tudi citotoksični učinki celic imunskega sistema, katere zaidejo v tumor (Davis in sod., 2008: 44-46).



Slika 4: Shematičen prikaz normalnega in tumorskega ožilja (Goel in sod., 2011: 1078).

2.4 TERAPEVTSKI PRISTOPI V ONKOLOGIJI

Vse od začetka 20. stoletja, ko sta terapijo predstavljala le kirurgija in radioterapija, pa do danes, ko se zdravniki že poslužujejo metod, kot sta genska terapija in antiangiogena terapija, je zdravljenje raka doživelo več kot očitni napredek. Ob pravočasnem odkrivanju predrakavih in rakavih sprememb ter novih uspešnejših tehnik zdravljenja se preživetje in kakovost življenja bolnikov s to kompleksno boleznijo iz leta v leto povečuje.

Ločimo različne načine uporabe zdravil. Kurativna uporaba zajema kirurške posege, obsevanje in različne postopke ter uporabo zdravil, paliativna uporaba pa je namenjena lažšanju simptomov bolezni brez zdravilnega učinka. Paliativno zdravljenje se največkrat uporablja pri neozdravljivo bolnih, kjer se je s prvotnim zdravljenjem že prenehalo.

Glede na delovanje poznamo lokalno in sistemsko zdravljenje. Lokalna terapija, med katero štejemo kirurške posege in radioterapijo, je uporabna predvsem za obravnavo prostorsko omejenih tumorjev in zdravljenje bolnikov v začetnih stadijih bolezni.

Sistemsko zdravljenje raka, med katero uvrščamo kemoterapijo, hormonsko zdravljenje in biološka zdravila, pa se uporablja pri naprednejših oblikah raka, ko je le-ta že metastaziral ter pri globoko ležečih tumorjih. Omenjena pristopa združuje kombinirana terapija in se zaradi boljših končnih rezultatov dandanes uporablja pri zdravljenju praktično vseh vrst tumorjev. Načini tovrstnega zdravljenja pogosto vključujejo kombinacijo kirurških posegov ali radioterapije s kemoterapijo.

Kljub intenzivnim raziskavam in napredku smo predvsem na račun izjemne heterogenosti samih tumorjev zaenkrat še vedno relativno daleč od odkritja nekega splošno učinkovitega zdravila proti raku. Dober doprinos k večjemu uspehu zdravljenja daje razvoj tarčnih zdravil, znanje molekularne biologije pa bi lahko utiralo pot predvsem k odkrivanju novih, še učinkovitejših terapij. Molekularna onkologija bi tako lahko omogočila spoznavanje biologije vsakega posameznega tumorja in s tem razvoj posameznemu bolniku in tumorju prilagojenega zdravljenja. Govorimo o ti. personalizirani medicini in z njo povezanim razvojem tarčnih zdravil na osnovi genomike, transkriptomike in proteomike.

2.4.1 Kirurgija

Kirurški posegi spadajo med lokalne načine zdravljenja in so namenjeni predvsem za odstranjevanje čvrstih, lokaliziranih tumorjev. Običajno se kombinira z obsevanjem ali kemoterapijo.

2.4.2 Radioterapija

Spada med lokalne načine terapije, kjer se uporablja ionizirajoče sevanje. Kritična tarča je DNA, na katero ima sevanje direkten ali indirekten učinek. Pri slednjem sevanje deluje na molekule, ki tvorijo proste radikale, ti pa nato poškodujejo kritično tarčo. Celice po obsevanju umirajo, ko se začnejo deliti (mitotska smrt celic). Ta metoda pri tem izkorišča razlike v bioloških lastnostih tumorjev in normalnih tkiv, saj so rakave celice načeloma občutljivejše na sevanje kot zdrave. Z ustreznim planiranjem posega v smislu ustrezne lokalizacije sevanja, lahko precej zmanjšamo poškodbe zdravega tkiva, kar pripomore k boljšemu izidu terapije. Tovrstno zdravljenje običajno poteka dlje, saj je zaradi nevarnosti, ki jo predstavlja izpostavljenost sevanju, le-to razdeljeno na več manjših odmerkov. Radioterapija se uporablja pri zdravljenju 60 % vseh tumorjev in se lahko izvaja v kombinaciji s kirurgijo ali kemoterapijo.

2.4.3 Kemoterapija

Kemoterapevtsko zdravljenje spada med sistemska in pomeni zdravljenje raka z naravnimi ali sintetičnimi produkti, ki imajo citotoksičen učinek. Slabost kemoterapije je pomanjkanje specifičnosti za tumorske celice, saj citostatiki delujejo na vse hitro deleče celice. Posledica tega so pogosti hudi neželeni stranski učinki in toksičnost. Učinek in varnost terapije sta odvisna od odmerka, ki je pod strogim nadzorom in je prilagojen bolniku glede na njegovo telesno površino, delovanje organov, psihofizično kondicijo in

glede na samo naravo neželenih učinkov. Včasih zdravljenje tumorja zaradi razvoja rezistentnih subklonov ni uspešno, kar privede do ponovitve bolezni.

Ublažitev neželenih učinkov zdravljenja bi lahko prinesel razvoj ti. ciljane kemoterapije, pri kateri so zdravila vezana na protitelesa ali ligande, ki se specifično vežejo na tumorske celice ali celice tkiv povezanih s tumorjem (tumorsko žilje) (Serša G., 2013).

2.4.4 Hormonska in biološka terapija

Hormonska terapija se uporablja za zdravljenje hormonsko odvisnih rakavih obolenj (dojka, prostata) in spada med sistemsko terapijo. Tudi biološka terapija spada med sistemsko zdravljenje in vključuje tarčna zdravila, primera katerih so male molekule in monoklonska protitelesa. Tarčna zdravila lahko delujejo na receptorje za rastne dejavnike, metabolizem tumorjev, telomerazno aktivnost, zavirajo angiogenezo, inhibirajo onkogene signalne poti s kinaznimi inhibitorji ipd. Med biološka zdravila štejemo še vaccine, modifikatorje biološkega odgovora (citokini, interferoni) in gensko terapijo (Čemažar M., 2013).

2.4.5 Genska terapija

Spada med nove načine zdravljenja raka in jo lahko z izjemo imunskega zdravljenja deloma uvrščamo tudi med tarčne terapije. Zanje je značilno, da delujejo na točno določene tarče, kar daje dobre obete za večjo učinkovitost in manjšo toksičnost teh metod. Strategije genske terapije vključujejo kompenzacijo mutacije (inhibicija ekspresije dominantnega onkogenega ali indukcija ekspresije tumor supresorskih genov), imunoterapijo (spodbuditev imunskega odziva), aktivacijo encimov za nastanek citotoksičnih produktov (genska aktivacija encima, ki ob dovajanju zdravila, le-tega spremeni iz neaktivne v aktivno obliko), v zadnjem času pa tudi proti žilno gensko terapijo (Kamenšek in Serša, 2008). Za vnos genetskega materiala uporabljamo različne vektorje. Ločimo vnos z virusnimi vektorji in nevirusne načine vnosa, kot so npr. direktno injiciranje gole DNA, uporabo liposomov, polimerov in nanodelcev ter fizikalne metode, kot je elektroporacija.

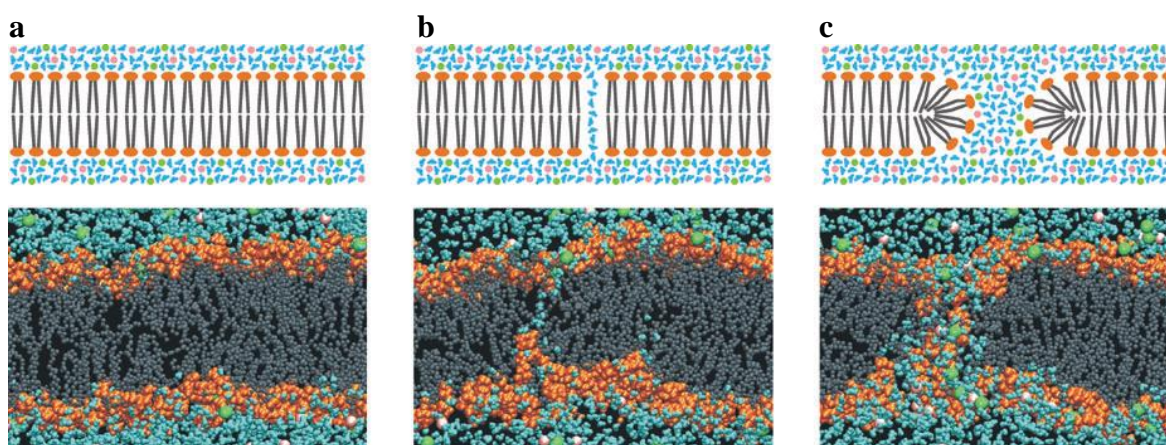
2.4.5.1 Elektroporacija

Elektroporacija je povečanje permeabilnosti celične membrane, zaradi vpliva zunanjega pulzirajočega električnega polja. Kljub temu da vplive električnega polja na biološki material opazujejo že več kot 250 let, se je praktična uporaba elektroporacije v predelavi hrane, farmaciji in medicini pojavila šele pred dvema desetletjema (Yarmush in sod., 2014).

Proces elektropermeabilizacije ali elektroporacije omogoča molekulam DNA in snovem, kot so zdravila proti raku, lažji vstop v celice in tkiva. V preteklem desetletju je potekal razvoj uporabe elektroporacije za dostavo terapevtskih molekul, vključno z zdravili, proteini in nukleinskimi kislinami, v širok nabor celic in tkiv. Strategija kombinacije

kemoterapevtikov in elektroporacije (elektrokemoterapija) se danes že uporablja v klinikah za zdravljenje rakavih obolenj. Poleg tega tudi vakcinacija in onkološka genska terapija predstavljata pomembna področja uporabe DNA elektroprenosa. Daud in sod. (2008) so tako že prišli do vzpodbudnih rezultatov pri genskem elektroprenosu (GET) plazmida z interleukinom-12, pri pacientih z metastatskim melanomom. Metoda se je za uspešno izkazala tudi pri tovrstnem zdravljenju psov in konj (Čemažar in sod., 2010; Tamzali in sod., 2007).

Vse od odkritja elektroporacije so se pojavljali opisi številnih teoretičnih ozadji, ki naj bi omogočali ta fenomen, in predvidevajo določen tip deformacije lipidov, njihove fazne tranzicije, razgradnjo vmesnikov med domenami z različnimi lipidnimi sestavi ali pa denaturacijo membranskih proteinov. Vendar pa se je večina teh mehanizmov izkazala za napačne, tako da danes velja splošen dogovor, da elektroporacija pomeni formacijo vodnih por v lipidnem dvosloju. V skladu s to teorijo, ki v veliki meri temelji na termodinamiki, je nastanek omenjenih por sprožen s penetracijo vodnih molekul v lipidni dvosloj membrane, kar vodi v preusmeritev bližnjih lipidov v položaj, v katerem so njihove polarne glave obrnjene proti tem vodnim molekulam (Yarmush in sod., 2014) (Sl. 12).



Slika 5: Shema elektroporacije na molekularni ravni (zgoraj) in njena dinamična simulacija na atomski ravni (spodaj). Nedotaknjeni dvosloj (a). Vodne molekule začnejo penetrirati v dvosloj (b). Preusmeritev lipidov in formacija vodne pore (c) (Yarmush in sod., 2014: 297).

V električnem smislu celično membrano lahko smatramo kot tanko plast izolatorja, ki je z obeh strani obdana z vodno raztopino elektrolitov. Za razliko od trdih izolatorjev, pri katerih električni razpad načeloma povzroči permanentno strukturno spremembo, se membrana na račun lipidov, ki delujejo kot dvodimenzionalna tekočina, lahko spontano vrne v stanje pred razpadom. Če je čas izpostavljanja primerno kratek in regeneracija membrane primerno hitra, da celica ostane viabilna, imamo elektroporacijo za reverzibilno, sicer pa jo označimo za ireverzibilno (Kotnik in sod., 2012).

Izmenjava preko membrane ni homogena preko celotne celične membrane. Pojavlja se na straneh celice, obrnjene proti elektrodam. Mehanizem prenosa je specifičen glede na fizikalno-kemične lastnosti elektroporirane molekule in se od tega odvisno pojavlja bodisi

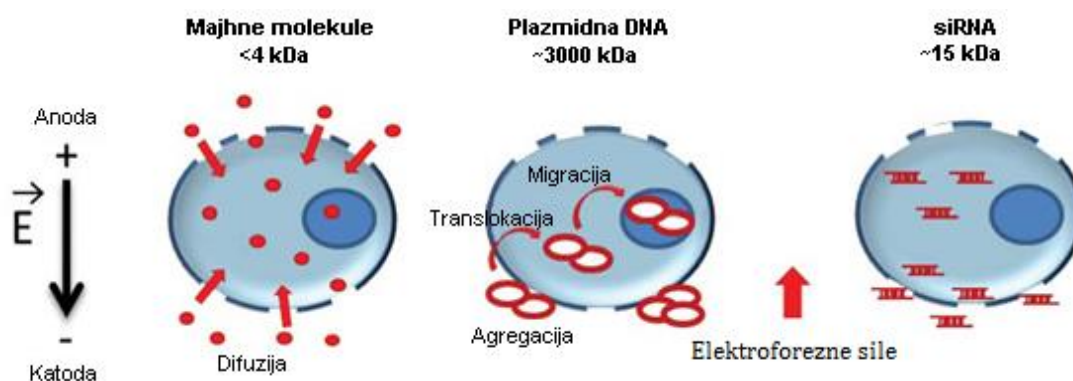
na strani celice obrnjene proti anodi bodisi na stani, ki je obrnjena proti katodi (Paganin-Gioanni in sod., 2011).

2.4.5.2 Genski elektroprenos kot dostavni sistem za gensko terapijo

Prenos genov v celice z namenom spremembe njihove biološke funkcije je bil prvič uporabljen za zdravljenje genetskih defektov imunskega sistema (Blaese in sod., 1990). Od takrat so testirali številne nove metode za prenos genov, med drugimi tudi genski elektroprenos, ki je nevirusna metoda za dostavo DNA molekul v celico s pomočjo električnih pulzov.

Prvi tovrsten prenos dednega materiala v kultivirane celice *in vitro* sta opravila Wong in Neumann (1982), skoraj 10 let po tem pa so izvedli tudi prvi GET v tkivo (Titomirov in sod., 1991). Od takrat dalje so številni raziskovalci preučevali njegovo uporabo na mišicah, tumorjih, jetrih, koži, pljučih, srcu, roženici in na centralnem živčnem sistemu. Kot se je izkazalo na uspešnost GET v tkivih vplivajo način dostave (lokalno injiciranje), velikost in oblika elektrod, parametri električnih pulzov in oblika same molekule DNA (Haberl in Miklavčič in sod., 2013). Poleg omenjenih karakteristik na elektroprenos vpliva tudi organizacija tkiva, katero določajo tip celic in prisotnost zunajceličnega matriksa (Čemažar in sod., 2012).

Celična membrana in jedrna ovojnica pa tudi gosto citoplazemsko omrežje struktur so ovire, ki jih mora molekula DNA premagati, da doseže jedro in začne proces transkripcije. Primarno oviro pri genski terapiji, posebno pri nevirusni genski terapiji, pa nato predstavlja težava pri doseganju visoke stopnje genske ekspresije. (Rosazza in sod., 2011)



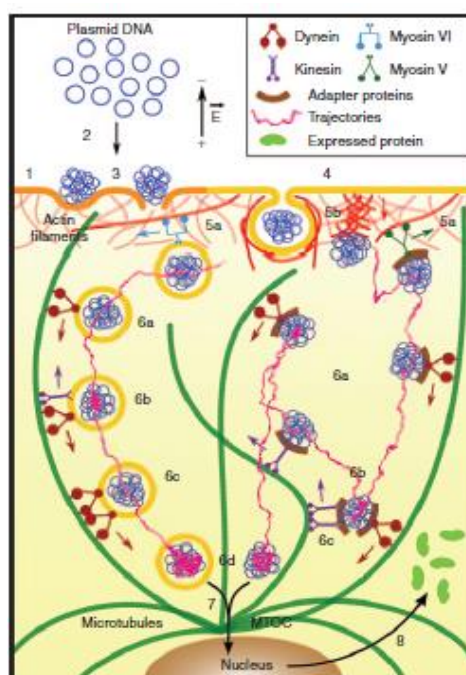
Slika 6: Mehanizem elektroprenosa (Chabot in sod., 2011: 4086).

Direkten prenos majhne negativno nabite molekule, kot je npr. mala interferenčna RNA (siRNA), je opazen na stani celice obrnjene proti katodi. Če siRNA dodamo po zaključenem proženju električnih pulzov, le-ta ne penetrira v celico. Električno polje tako vpliva na prepustnost membrane, pa tudi na vlek nabitih molekul v citoplazmo celice (Paganin-Gioanni in sod., 2011) (Sl. 5).

Iz vidika mehanizma je eden od ključnih procesov elektroprenosa DNA, formacija kompleksa DNA/membrana. Obstajata dva tipa interakcij med DNA in membrano:

- a) tvorba metastabilnega kompleksa DNA/membrana, iz katerega se DNA lahko odcepi in vrne v zunanji medij, kot posledica elektroporacijskega stresa (zaradi zamenjave smeri električnega polja v času znotraj 1 s po dovajanju prejšnjega pulza)
- b) in tvorba stabilnega kompleksa DNA/membrana, iz katerega se plazmid ne more odstraniti tudi ob dovajanju električnih pulzov nasprotne polaritete. Le DNA, ki spada k drugemu tipu, pripomore k učinkoviti genski ekspresiji. Ta mehanizem tako predvideva nastanek vezavnih struktur na celični površini, ki preprečujejo molekulam DNA sprostitev iz kompleksa na celični membrani (Faurie in sod., 2010).

Rosazza in sod. (2010) so v svoji raziskavi dokazali, da v času prisotnosti električnega polja v kombinaciji z molekulami DNA, ob membrani poteka polimerizacija aktina okoli kompleksov DNA/membrana. Sledi potovanje DNA molekule od membrane do jedra. Rosazza in sod. (2013) so z nadaljnjimi poskusi potrdili, da se plazmid v celico prenese z aktivnim transportom. Ta prenos je odgovoren za hitro znotrajcelično distribucijo DNA agregatov po njihovem vstopu v celico. Uspeli so dokazati, da je hiter aktiven transport povezan z mikrotubuli, medtem ko je počasnejši aktiven transport predvsem posledica potovanja vzdolž aktinskih filamentov (Sl. 6).



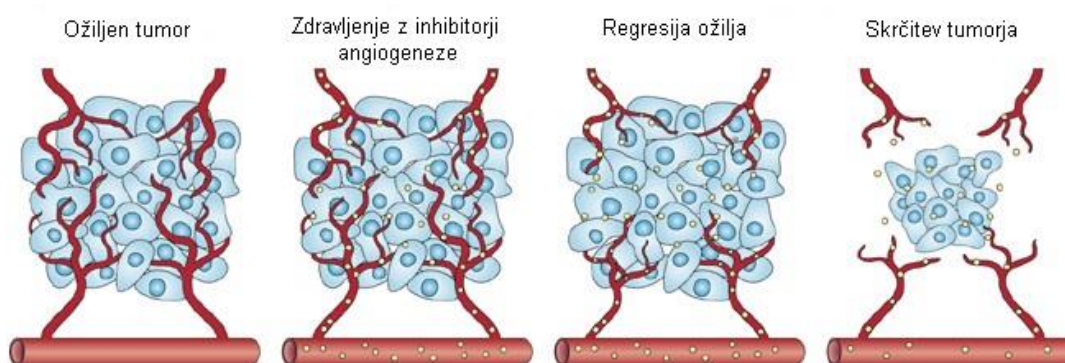
Slika 7: Genski elektroprenos kot večstopenjski proces. 1) Permabilizacija membrane. 2) Genski elektroprenos DNA na del membrane obrnjene proti katodi. 3) Interakcija DNA/membrana. 4) Endocitoza DNA. 5) Transport odvisen od aktina. 6) Transport odvisen od mikrotubulov. 7) Prehod DNA skozi jedrno membrano. 8) Izražanje genov in sinteza proteinov (Rosazza in sod., 2013: 2222).

2.4.6 Proti žilna terapija

Pomembnost razvoja in funkcije tumorske vaskulature kot tarče za zdravljenje se je pokazala v 70. letih prejšnjega stoletja z raziskavami Judaha Folkmana, ki je dokazal, da je angiogeneza ključnega pomena za rast in preživetje tumorskih celic. Uničenje tumorskega ožilja prikrajša tumorje za dovod nutrientov in kisika, ki so potrebni za njihovo rast, posledično pa naj bi inhibiralo tudi širjenje metastaz, kar bi teoretično lahko vodilo v nazadovanje tumorja. Delimo jih v dve skupini; antiangiogena zdravila, ki preprečujejo nastanek novih krvnih žil in žilno razdiralni agensi, kateri delujejo proti že obstoječi tumorski vaskulaturi. Antiangiogena terapija naj bi delovala citostatično, medtem ko naj bi žilno razdiralna terapija imela citotoksični učinek na celice (Ćirić in Serša, 2010). Prav zato se za slednje predvideva uporaba v prekinjenih dozah sinergično z ostalimi vrstami terapije, medtem ko bi bila antiangiogena terapija lahko uporabljena kronično v obdobju od nekaj mesev ali let (Davis in sod., 2008: 330).

Glede na mehanizem delovanja antiangiogena zdravila delimo na inhibitorje rastnih dejavnikov endotelija, inhibitorje signalnega prenosa v endotelijskih celicah, inhibitorje rasti endotelijskih celic, inhibitorje MMP, inhibitorje viabilnosti endotelijskih celic in na inhibitorje prekursorjev endotelijskih celic v kostnem mozgu (Al-Husein in sod., 2012). Ena najbolj preučevanih tarč tovrstne terapije so VEGF in njegovi receptorji.

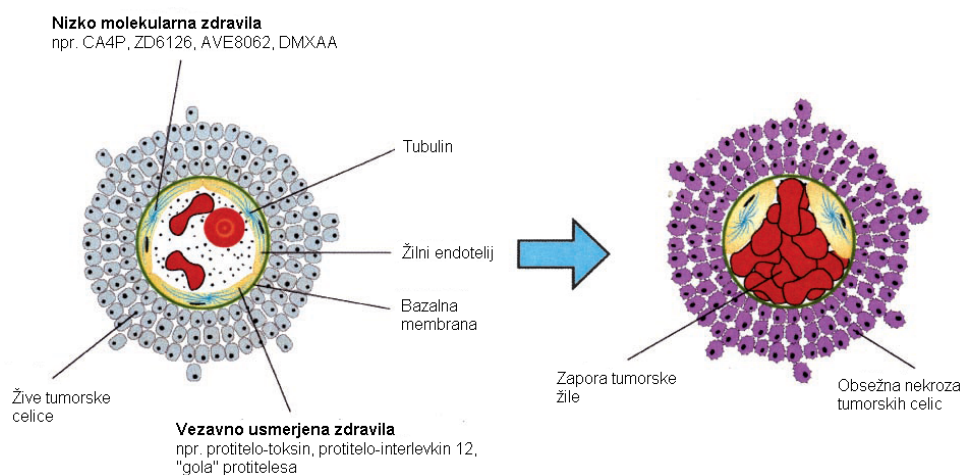
Zaradi uničenja tumorske vaskulature številne raziskave kažejo na antagonistično delovanje antiangiogene terapije v nasprotju s kemo in radioterapijo. Kljub temu se je izkazalo, da določene kombinacije terapij lahko prehodno normalizirajo tumorsko ožilje. Normalizacija tumorske vaskulature je definirana kot skupek strukturnih in funkcionalnih sprememb, ki omogočajo bolj učinkovito dostavo zdravil in kisika, kar v končni fazi privede do boljših rezultatov zdravljenja. To kaže, da bi ob poznavanju mehanizmov popravila tumorskega ožilja in posledične normalizacije tumorskega mikrookolja, tovrstno zdravljenje v kombinaciji s konvencionalnimi proti rakavimi terapijami, poleg že predhodno pričakovanih antiangiogenih učinkov, lahko vodilo do izboljšane končnega razpleta. Pri vsem tem je pomembna predvsem previdna izbira ustrezne doze in časa uporabe antiangiogenega zdravila, ki lahko v primeru neoptimalnega odmerjanja ovira dostop zdravilom in kisiku (Davis in sod., 2008: 67-69).



Slika 8: Princip delovanja antiangiogenih molekul (Zetter Bruce R., 2008: 649).

Žilno razdiralna zdravila se od antiangiogenih razlikujejo v tem, da povzročijo hitro in selektivno zaporo tumorske vaskulature, ki se pojavi v časovnem razponu od nekaj minut do nekaj ur po začetku terapije. Posledica tega je ishemija, ki povzroči hitro in obsežno smrt tumorskih celic. Kljub temu obstaja majhna možnost, da bi zgolj tovrstna terapija v celoti izkoreninila tumorsko maso, saj rob tumorja običajno ostane viabilen. Vseeno je razvoj na tem področju zaželen, saj pride do uničenja velikega dela tumorskega tkiva predvsem v centralnem delu, kjer celice ne morejo preživeti na račun gostiteljeve vaskulature, in v večini delov, kjer je prisotna rezistenca na kemo oz. radioterapijo. Boljši anti tumorski učinki so pričakovani pri kombiniranju te terapije z že uveljavljenimi vrstami zdravljenja (Davis in sod., 2008: 330-350).

Terapija kot sredstvo zdravljenja uporablja vezavno usmerjena in nizko molekularna zdravila. Prva vključujejo protitelesa, peptide ali rastne dejavnike, ki se selektivno vežejo na endotelij in povzročajo koagulacijo in/ali smrt endotelijskih celic, tako da na žilno razdiralni agens vežejo določen toksin ali prokoagulant (Sl. 8). Drugi tip agensov vključuje flavanoide in snovi, ki vežejo ali depolimerizirajo tubulin in delujejo tako, da inducirajo kolaps ožilja, kar vodi do obsežne nekroze tumorja (Ćirić in Serša, 2010).



Slika 9: Mehanizem delovanja žilno razdiralne terapije (Thorpe, 2004: 416).

Vaskulatura tumorja je zanimiva tarča za zdravljenje tumorjev, saj tumorsko ožilje vsebuje specifične molekule, ki bi lahko predstavljale terapevtske tarče (Neri in sod., 2006). Teoretična prednost tovrstnega zdravljenja je, da endotelijske celice niso transformirane, zaradi česa je malo verjetno, da bodo podvržene mutacijam, katerih rezultat je rezistenca na zdravila, poleg tega pa je zdravljenje usmerjeno proti endotelijskim celicam primerno za vse čvrste tumorje, ne glede na izvor tumorskih celic. Ker so vse endotelijske celice nedvomno izpostavljene snovem v krvi, se tako izognemo tudi problemu dostave zdravil v center tumorja, kar je lahko ovira pri nekaterih konvencionalnih oblikah zdravljenja (Hayes in sod., 2000).

Poleg vloge pri rasti tumorja ima nastanek žil vpliv na tumorsko progresijo in ponovitev bolezni. V prihodnosti bi inhibicija tega procesa lahko preprečila rast tumorja *in situ* ali dormantnih tumorjev, trenutne proti rakave terapije pa potekajo predvsem v smeri razvoja strategij, ki bi preprečile ali zakasnile lokalno ali oddaljeno invazijo primarnega tumorja. S tumorsko progresijo se večja genetska heterogenost, kot posledica tega pa se spremenijo tudi morfološke in funkcionalne lastnosti tumorja. Vse to je rezultat mutacij, pridobljenih med nekontrolirano proliferacijo tumorskih celic. Ta genetska nestabilnost se odraža v povečani ekspresiji številnih drugih proangiogenih dejavnikov, kot sta npr. fibroblastni rastni dejavnik (FGF) in interleukin 8 (IL-8). To direktno implicira na to, da bi angiogenezo lokalno napredovanih ali metastaziranih oblik tumorjev bolj verjetno uspešnejše zaustavili z blokado večjih signalnih poti hkrati in ne samo z anti VEGF monoterapijo. V povezavi s tem je bilo narejenih več raziskav, pri katerih se je izkazalo, da antiangiogena monoterapija ne poveča preživetja rakavih bolnikov. Za uspešnejšo se je izkazala kombinirana terapija, primer katere je uporaba anti VEGF monoklonskega protitelesa (mAb) bevacizumab v kombinaciji s kemoterapijo.

Cilji za prihodnost na področju proti žilne terapije vključujejo boljše razumevanje mehanizmov anti tumorske aktivnosti le-teh, kako bi jih lahko najbolj optimalno kombinirali z drugimi pristopi zdravljenja, kot sta kemoterapija in obsevanje, kako bi te učinke najboljše klinično spremljali, predvsem s pomočjo bioloških označevalcev ter možnost njihove potencialne uporabe za zdravljenje drugih bolezni (Davis in sod., 2008: 46-80).

2.5 ENDOGLIN

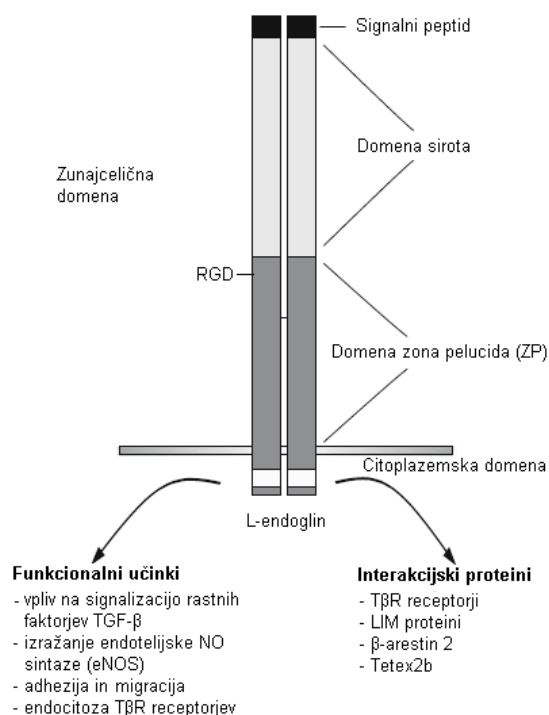
Endoglin (CD105) je transmembranski glikoprotein izražen na aktiviranih endotelijskih celicah ožilja. Je pomožni protein za transformirajoči rastni dejavnik- β (TGF- β) in ga poleg endotelijskih celic, najdemo tudi na drugih celičnih tipih. Mutacije pri endoglinu ali v njegovi signalni poti vodijo v razvoj hemoragičnih dednih boleznih, novejša raziskava pa so pokazale njegovo vpletenost in povečano ekspresijo tudi pri številnih tipih čvrstih tumorjev (Dallas in sod., 2008).

2.5.1 Genetika in struktura

Gen za endoglin je dolg 40 kbp in je lociran na kromosomu 9q34. Rezultat genske transkripcije je mRNA produkt dolžine 3,4 kbp in 14 eksonov. Eksoni od 1 do 12 kodirajo zunajcelično domeno, ekson 13 transmembransko in ekson 14 citoplazemsko domeno (Dallas in sod., 2008).

Človeški endoglin je 633 aminokislinski dolg, 180 kDa velik, z disulfidno vezjo povezan homodimeren transmembranski glikoprotein. Njegovo ekspresijo inducira tudi stanje hipoksije. Vsebuje veliko zunajcelično domeno, hidrofobno transmembransko domeno in kratko znotrajcelično domeno (Nassiri in sod., 2011). Zunajcelična domena je sestavljena iz domene sirota na N-koncu in domene zona pelucida (ZP) na delu ob membrani, ki je potencialno vpletena v oligomerizacijo receptorja. Znotraj domene ZP najdemo tripeptid Arg-Gly-Asp (RGD), ki deluje kot prepoznavna sekvenca za integrine. Citoplazemska domena vsebuje serinske in treoninske ostanke, ki jih lahko fosforilira TGF- β receptorska kinaza, poleg tega pa ima tudi ti. PDZ-vezujoči motiv (Ser-Ser-Met-Ala) na C-koncu, ki naj bi moduliral fosforilacijo sosednjih serinskih in treoninskih ostankov (Sl. 9).

Poznamo dve različni izoobliki endoglina, dolgi L-endoglin in kratek S-endoglin, oba sta izražena v človeških in mišjih tkivih. Med seboj se razlikujeta v sestavi citoplazemske domene. L-endoglin ima citoplazemsko domeno iz 47 aminokislinskih ostankov, medtem ko je citoplazemski rep S-endoglina sestavljen le iz 14. Znatno del S-oblike najdemo v nekaterih tkivih, kot sta pljučno in jetrno tkivo, L-oblika pa je prevladujoča v večini tkiv, posebno v endotelijskih, in je zato osrednja tarča raziskav biologije endoglina. (Perez-Gomez in sod., 2010).



Slika 10: Shematski prikaz strukture endoglina (ten Dijke in sod., 2008: 80).

2.5.2 Vloga v TGF- β receptorskem kompleksu

Rastni dejavniki TGF- β izvajajo svoje biološke učinke z vezavo na heterodimerni kompleks, ki vsebuje transmembranske serin/treonin kinazne receptorje za TGF- β tipa I (T β RI) in receptorje tipa II (T β RII), čeprav samo signalizacijo določa predvsem T β RI. Ti rastni dejavniki igrajo pomembno vlogo pri embrionalnem razvoju, homeostazi zrelih tkiv in pri patogenezi številnih bolezni. Njihovi signali aktivirajo ti. signalizacijo smad, poleg tega pa tudi neodvisne signalne poti smad, ki regulirajo osnovne celične procese, kot so proliferacija, diferenciacija, migracija, apoptoza, adhezija, organizacija citoskeleta, preoblikovanje zunajceličnega matriksa in fenotipska plastičnost.

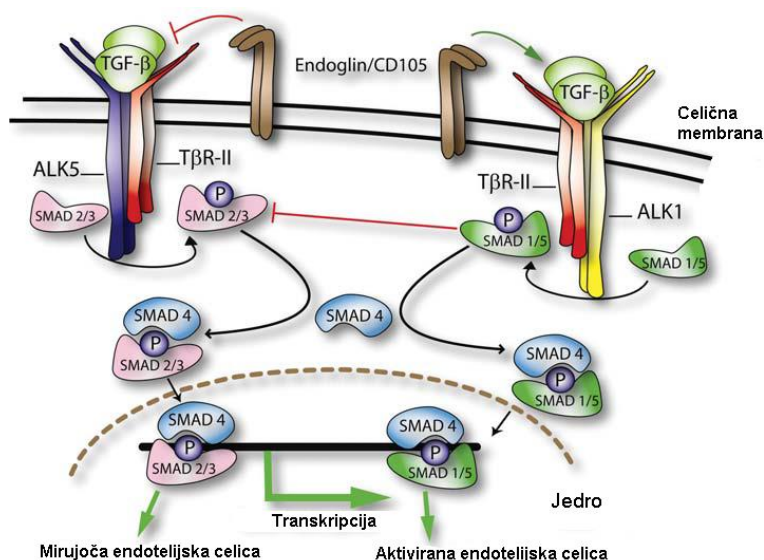
Človeški genom kodira 7 T β RI (ALK 1-7) in 5 T β RII receptorjev. TGF- β receptorski kompleks vsebuje tudi 2 receptorja tipa III (T β RIII), endoglin in betaglikan, ki vežeta različne predstavnike družine rastnih dejavnikov TGF- β . Delita si visoko stopnjo homolognih aminokislinskih sekvenc v transmembranski in citoplazemski domeni. Betaglikan promovira visoko afinitetno vezavo TGF- β 2 na T β RII, medtem ko endoglin v prisotnosti signalizacije T β RI in T β RII receptorjev veže TGF- β 1, TGF- β 3, aktivin-A, BMP-2 (ang. bone morphogenetic protein) in BMP-7 (Perez-Gomez in sod., 2010).

TGF- β se veže na T β RII homodimer, ki rekrutira receptorja tipa I (ALK1 ali ALK5) in se z njima poveže v heterotetramerni receptorski kompleks. Pri celicah, ki izražajo endoglin, je le-ta kot dimer vključen v ta kompleks. T β RII tako fosforilira bodisi ALK1, bodisi ALK5, kar povzroči konformacijsko spremembo receptorja. Signalizacija se prenese do jedra preko fosforilacije proteinov smad, ki delujejo kot transkripcijski koaktivatorji ali

korepresorji. Identificiranih je 8 proteinov smad. ALK1 se združi in aktivira smad-1, smad-5 in proteine smad-8, ALK5 pa se združi s proteini smad-2 in smad-3. Smad-4, skupen mediator poti smad, veže te aktivirane receptorsko posredovane proteine smad in jih premakne v jedro, kjer sprožijo transkripcijo ustreznih genov (Sl. 10).

Aktivacija ALK1 povzroča povečanje proliferacije in migracije endotelijskih celic, pa tudi transkripcijo proangiogenih genov in endoglina samega, kateri je potreben za aktivacijo te poti. Za razliko od njega, pa ALK5 inducira mirovanje epitelnih celic z inhibicijo proliferacije in migracije, ter inducira ekspresijo za zorenje specifičnih genov. Signalizacija ALK5 na endotelijskih celicah pospešuje tudi rekrutacijo in diferenciacijo gladko mišičnih celic žil med formacijo vaskulature. ALK5 je tako prevladujoč mediator signalizacije TGF- β v mirujočih endotelijskih celicah, med angiogenezo pa se preferenčno aktivira ALK1 (Dallas in sod., 2008).

Citoplazemska domena endoglina reagira tudi z β -arestinom, proteini tctex2b, ziksinom in proteini ZRP-1. Preko teh interakcij, bi endoglin lahko vplival na prerazporeditve aktinskih filamentov, celično adhezijo in migracijo, pa tudi na transport proteinov preko endocitotskih veziklov (Perez-Gomez in sod., 2010).



Slika 11: Hipotetična vloga endoglina v TGF- β /ALK1 in TGF- β /ALK5 signalnih poteh. Vezava TGF- β na kompleks endoglina in receptorja ALK1 povzroči aktivacijo endotelijskih celic; vezava TGF- β na receptor ALK5 brez prisotnosti endoglina povzroči mirovanje endotelijskih celic (Fonsatti in sod., 2010: 14).

2.5.3 Vloga pri angiogenezi in raku

Endotelijske celice v normalnem mirujočem endoteliju so stabilne in imajo podvojitveni čas več kot 1000 dni. Ravno obratno velja za endotelij v procesu angiogeneze, ki ga tvorijo ti. aktivirane celice. Potencialen označevalec aktiviranega endotelija je tudi

endoglin (Dallas in sod., 2008). Visoko je izražen na vaskularnih endotelijskih celicah na območjih aktivne angiogeneze med embrionalnim razvojem, v vnetih tkivih ter v notranjosti in okolici tumorjev (ten Dijke in sod., 2008). Pri odraslih osebah je njegova ekspresija omejena le na proliferirajoče endotelijske celice, aktivirane monocite in proeritroblaste (Rosen in sod., 2014).

Li in sod. (1999) so pokazali, da izbitje gena za endoglin pri mišjih embrijih povzroči smrt zaradi nepravilnega razvoja krvožilja, po 11,5 dneh razvoja. Za razliko od teh pa je razvoj vaskularnega sistema pri miših brez TGF- β potekel nemoteno. Izguba endoglina se je kazala v slabo razvitih gladkih mišicah ožilja in v zaustavljenem oblikovanjem endotelija.

Večina študij o vpletenosti endoglina pri rakavih obolenjih se osredotoča na njegovo proangiogeno vlogo in njegovo uporabnost kot označevalca mikrovaskularne gostote tumorjev. Obstaja dokaz, da endoglin vpliva na celično proliferacijo, adhezijo in migracijo tumorskih celic, kar nakazuje na njegovo direktno vpletenost v razvoj raka, bodisi z vplivom na odziv tumorskih celic na TGF- β bodisi z vplivom na neodvisne mehanizme TGF- β , ki pa še niso povsem jasni (Perez-Gomez in sod., 2010).

2.5.4 Endoglin kot tarča za antiangiogeno diagnostiko in terapijo

V luči njegove vpletenosti v razvoj, morfogenezo in fiziologijo ožilja ter njegove močne ekspresije v krvnih žilah tumorskega tkiva, ima potencialna vloga endoglina, kot tarče za diagnostične in terapevtske antiangiogene strategije pri rakavih obolenjih, pomembno mesto v predkliničnih raziskavah.

Čvrsti tumorji so načeloma dobro ožiljeni, poleg tega pa se endotelijske celice, ki tvorijo tumorsko vaskulaturu, delijo veliko hitreje kot endotelijske celice krvnih žil normalnih tkiv. Idealen označevalec za prikaz tumorskega ožilja je tako povečano izražen na aktivno delečih se endotelijskih celicah tumorjev, medtem ko je njegova izraženost na mirujočih endotelijskih celicah šibka ali nezaznavna. Na podlagi tega je odkritje, da stopnja izraženosti endoglina korelira s stopnjo proliferacije endotelijskih celic in da je le-ta povečano izražen na endoteliju znotraj tumorskih tkiv, spodbudilo raziskave o endoglinu, kot potencialni tarči za diagnostičen prikaz čvrstih tumorjev. Rezultati kažejo, da bi endoglin lahko bil uporaben in varen za takšno rabo, ne glede na tip tumorskega tkiva in ekspresijo endoglina na rakavih celicah. Tovrstno ciljanje endoglina je bilo predlagano, kot možna metoda za spremljanje odziva bolnika na zdravljenje. Oba načina vključujeta vezavo monoklonskih protiteles, označenih z radioaktivnimi označevalci na molekulo endoglina.

Med protitelesi z antiangiogeno aktivnostjo, ki so bila do sedaj testirana na rakavih bolnikih, ima odobreno uporabo le humanizirano anti VEGF mAb bevacizumab. Ker pa je ciljanje endotelijskih celic, smatrano kot ena bolj obetavnih terapevtskih strategij prihodnosti, pa so v postopku aktivnih kliničnih raziskav tudi različna nova zdravila s podobnim načinom delovanja, med drugimi tudi različna mAb proti endoglinu (Fonsatti in sod., 2010). Endoglin se razlikuje od družine VEGF molekul in je vpleten v mehanizem VEGF rezistence. Povišano je izražen kot posledica hipoksije, ki jo inducira inhibicija

VEGF in tako omogoči nadaljevanje endotelijske proliferacije. Raziskave tako kažejo, da sočasno ciljanje endoglina in poti VEGF, izboljša antiangiogeno terapijo in zmanjša rezistenco na bevacizumab pri nekaterih rakavih pacientih (Rosen in sod., 2014).

Lebrin in sod. (2004) so dokazali, da se z utišanjem ekspresije endoglina z interferenco RNA inhibira proliferacija in migracija mišjih embrionalnih endotelijskih celic. Utišanje endoglina z interferenco RNA je tako postalo zanimiv predmet raziskav potencialne uporabe v antiangiogeni terapiji. Molekule siRNA so pokazale dober antiangiogeni potencial *in vitro* in izrazit antiangiogeni in protitumorski učinek *in vivo* (Dolinšek in sod., 2013).

2.6 INTERFERENCA RNA

V zadnjih letih se je razumevanje mehanizmov delovanja interference RNA (RNAi) precej povečalo. Dejstvo, da imajo kratki oligonukleotidi sposobnost utišanja genov je pomenilo možen razvoj nove oblike zdravljenja tumorjev kot metode genske terapije. RNAi omogoča ciljanje in utišanje kateregakoli patološkega proteina na specifičen način. Posledica tega je utišanje izražanja genov. Njihove fizikalno-kemične lastnosti (npr. velika molekulska masa in anionski naboj) preprečujejo pasivno difuzijo preko celične membrane večine celičnih tipov. Trenutno gredo zato raziskave predvsem v smeri razvoja uspešnega dostavnega sistema teh molekul RNA v tumor. Obetavne rezultate kaže tudi uporaba GET (Chabot in sod, 2011).

2.6.1 Tipi molekul RNAi in njihovi mehanizmi delovanja

Mikro ribonukleinska kislina (miRNA) igra pomembno vlogo v številnih bioloških procesih, vključno z imunskim odzivom, kontrolo celičnega cikla, metabolizmom, virusno replikacijo, diferenciacijo matičnih celic in razvojem človeškega organizma. Njegova ekspresija in funkcija sta bistveno spremenjena pri številnih bolezenskih stanjih, med drugimi tudi pri raku. Ker miRNA, za razliko od siRNA ne zahteva popolne komplementarnosti za prepoznavo tarče, je posamezna molekula sposobna regulirati številne molekule mRNA (Chabot in sod, 2011).

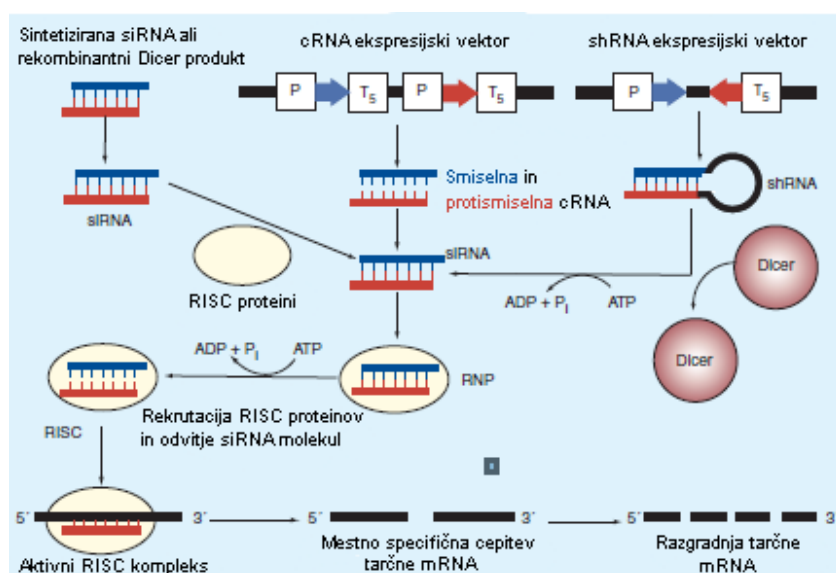
Malo interferenčno RNA (siRNA) in kratko RNA z zanko (shRNA) uporabljajo za doseg podobnih funkcionalnih učinkov, čeprav sta si molekuli sami po sebi precej različni. SiRNA je 19-23 baznih parov dolga dvoverižna molekula RNA, katere smiselna in protismiselna veriga sta sintetizirani ločeno. Po dostavi v samo citoplazmo, se siRNA inkorporira direktno v encimski kompleks RISC (ang. RNA-induced silencing complex).

Vektorsko posredovana shRNA je sekvenca RNA, za katero je značilna tvorba tesne lasnične zanke. Po vstopu v jedro celice, najprej pride do produkcije pri-shRNA, ta se nato preko encima drosha predela v pre-shRNA. Pre-shRNA se nadalje prenese v citoplazmo preko proteina exportin-5, kjer se procesira s pomočjo encima dicer, ki spada med endonukleaze RNA tipa III, v funkcionalno molekulo siRNA. Ta siRNA se vključi v encimski kompleks RISC (Li in Mahato, 2011).

Pri siRNA in shRNA je postopek, ki sledi tvorbi kompleksa z RISC, enak. SiRNA se v kompleks vključi preko vezave s proteinom, ki spada v družino proteinskih domen argonaute. Za vključitev v encimski kompleks RISC je potrebno, da je siRNA fosforilirana na 5' koncu. Aktivacija kompleksa se začne z razvitjem molekule siRNA, pri čemer se smiselna veriga odstrani. Protismiselna veriga usmerja RISC do homologne sekvence na tarčni molekuli mRNA. Čeprav te molekule mRNA se pojavi na enem mestu, in sicer 10 nukleotidov stran od 5' konca protismiselne verige razvite molekule siRNA. Zaradi izgube 7-metilgvaninske kape na 5' koncu in poli(A)-repa na 3' koncu, tarčna mRNA ni več varna pred endogenimi RNazami, ki jo razgradijo.

Velika pomanjkljivost uporabe molekul siRNA je prehodni učinek genskega utišanja. Zato je prišlo do razvoja uspešnejših in stabilnejših metod z dolgoročnim učinkom genskega utišanja. Ti pristopi uporabljajo virusne ali plazmidne vektorje, ki vsebujejo ekspresijsko kaseto za produkcijo transkriptov siRNA, ki se sintetizirajo iz molekul shRNA. Alternativa temu bi bila uporaba ekspresijske kasete, ki bi usmerjala ločen nastanek smiselne in protismiselne verige, pri čemer bi se verigi v funkcionalno aktivno molekulo siRNA hibridizirali v notranjosti celice (Lage, 2005).

V primeru endoglina, so rezultati preteklih raziskav pokazali, da vnos siRNA proti endoglinu v endotelijske celice *in vitro* in tumorje *in vivo* uspešno regulira angiogenezo, vendar je bil učinek kratkoročen. Da bi dosegli dolgotrajen učinek utišanja so izdelali plazmid, ki kodira shRNA proti tarčnemu genu. Za razliko od molekul siRNA, je plazmidna DNA bolj odporna proti nukleotidni degeneraciji, poleg tega pa omogoča daljše izražanje molekul shRNA, kar omogoča tudi daljšo terapevtsko učinkovitost (Dolinšek in sod., 2015).



Slika 12: Potencialna pot delovanja RNAi. Okrajšave: cRNA (komplementarna RNA), P (promotor), RNP (ribonukleotidno proteinski kompleks), T₅ (terminacijski signal za RNA polimerazo III) (Lage, 2005: 105).

2.6.2 RNAi in rak

Številne *in vitro* študije so pokazale potencialno uporabo shRNA in siRNA pri zdravljenju tumorjev. Maligne celice večinoma kažejo spremenjeno regulacijo celičnega cikla, kar vodi v nekontrolirano proliferacijo in izogibanje celični smrti, kot posledici spremembe apoptotskih signalnih poti. Vse s tem povezane lastnosti rakavih celic so posledica spremenjenega delovanja onkogenov, tumor-supresorskih genov ali drugih alternativnih genov vpletenih v signalne poti, ki vodijo v nastanek s tumorji povezanih fenotipov. Veliko teh genov je zato vključenih v raziskave, kot potencialne tarče zdravljenja raka.

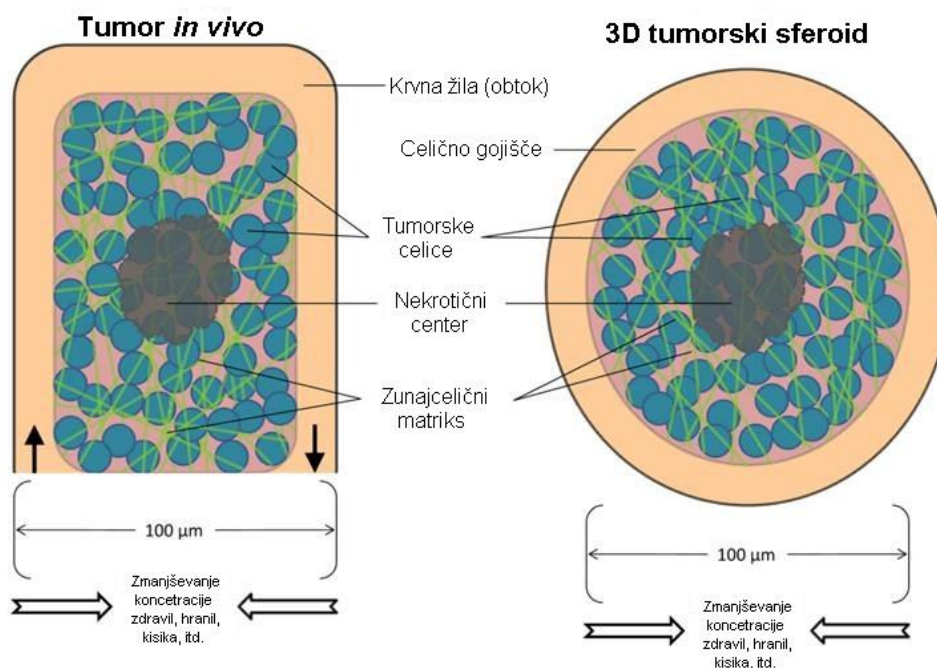
Primeri uspešnega utišanja z rakom povezanih genov z uporabo RNAi (Lage, 2005):

- geni povezani z apoptozo/regulacijo celičnega cikla (p53, Bcl-2, hdm2, p21, PLK1),
- geni povezani s signalno transdukcijo (Her2/neu, K-ras, Bcl-Abl, B-RAF, TEL-PDGF- β -receptor, Wnt-1, NPM-ALK),
- geni povezani z rezistenco na terapijo (MDR1/P-glikoprotein, Prkdc),
- virusni geni povezani z rakom (HPV E6, HPV E7, EBV LMP-1),
- in drugi (telomeraza, sintaza maščobnih kislin, katepsin B, Upar, VEGF, β -katenin).

2.7 SFEROIDI

Obstajajo dokazi, da *in vitro* tridimenzionalne (3D) tumorske celične kulture bolj natančno odražajo kompleksnost *in vivo* mikrookolja, kot preproste dvodimenzionalne celične kulture (2D), predvsem v zvezi z gensko ekspresijo, aktivnostjo signalnih poti in občutljivostjo na zdravila. Številne raziskave tako izpostavljajo značilne razlike med celičnim kulturami 2D in 3D. Slednje naj bi bolj prikazovale tumorsko mikrookolje *in vivo* v smislu celične heterogenosti, gradientov hranil in kisika, celičnih interakcij, odlaganja matriksa in genske ekspresije. Kot učinkovit model čvrstih tumorjev, je bilo predstavljenih veliko različnih sistemov 3D, med katerimi so za najboljše označeni in najpogosteje uporabljeni večcelični tumorski sferoidni modeli. Tumorski sferoidi so heterogeni celični agregati, ki pri velikosti večji od 500 μm , pogosto začnejo tvoriti hipoksične regije in nekrotične centre. Sferoide imajo za dobre modele, ki posnemajo lastnosti tumorskih mikroregij, intervaskularnih domen in mikrometastaz. Prvi, ki so uporabili to metodo, so bili Sutherland in sod. (1971).

Trenutne raziskave in razvoj na področju tridimenzionalnih celičnih kultur so usmerjeni predvsem v metode, ki se izogibajo celični adheziji na površino in spodbujajo medsebojno pritrditev celic. Primer je metoda visečih kapljic, ki sicer omogoča nastanek podobno velikih sferoidov, vendar je časovno potratna, poleg tega pa je za nadaljnjo analizo potreben prenos sferoidov na ustrezen nosilec. Časovno bolj ekonomična metoda katere produkt so velikostno zelo enaki sferoidi s kompaktno in enotno strukturo, je uporaba plošč ULA (ang. ultra low attachment) s 96 vdolbinicami z okroglim dnom. Tovrstni in podobni sistemi, predstavljajo pomemben korak v razvoju bolj rutinske uporabe tridimenzionalnih celičnih kultur, večjo napovedno vrednost raziskav onkoloških zdravil *in vitro* ter zmanjšano potrebo po poskusih *in vivo* (Vinci in sod., 2012).



Slika 13: Shematičen prikaz tumorja *in vivo* in tumorskega sferoida *in vitro* (Phung in sod., 2012: 508).

3 MATERIAL IN METODE

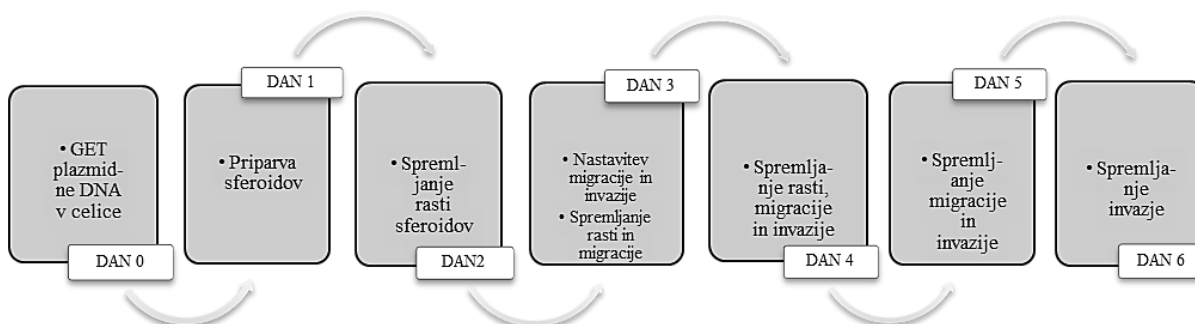
3.1 CELIČNE LINIJE

Študija je bila opravljena na treh celičnih linijah: na dveh melanomskih z visokim izražanjem endoglina – B16F1 in B16F10 in liniji mišjega adenokarcinoma dojke TS/A z nizkim izražanjem endoglina. Razlika med linijama B16F1 in B16F10 je v tem, da ima linija B16F10 večji metastatski potencial, kar pomeni, da imajo celice večjo zmožnost migracije in invazije. Potek raziskave je bil na vseh treh celičnih linijah enak (Sl. 14).

Cilj naloge je bil optimizirati pripravo sferoidov različnih tumorskih celic z visokim ali nizkim izražanjem endoglina in ugotoviti ali utišanje le-tega vpliva na nastanek, migracijo in invazijo različnih tumorskih celic z visokim ali nizkim izražanjem endoglina.

Melanomski celični liniji B16F1, B16F10 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, ZDA) in celice mišjega karcinoma dojke TS/A (Nanni P. in sod., 1983) smo vzdrževali v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO₂ v gojišču AMEM (Advanced Minimum Essential Medium) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ZDA), kateremu so bili dodani 5 % goveji fetalni serum (FBS, Gibco), 10 mM/ L-glutamina (GlutaMAX, Gibco), 100 U/ml penicilina (Grünenthal, Aachen, Nemčija) in 50 mg/ml gentamicina (Krka, Novo mesto, Slovenija).

V poskusih smo uporabili celice iz eksponentne faze rasti.



Slika 14: Shematični prikaz poteka dela. Enoten je za vse celične linije le, da pri celični liniji B16F1 nismo izvajali testa invazije.

3.2 PLAZMIDNI VEKTOR

Pri študiji smo uporabili plazmidni vektor (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) v katerega so bili predhodno klonirani komplementarni oligonukleotidi terapevtske sekvence, ki nosi zapis za kratko lasnično molekulo RNA (shRNA) proti endoglinu in je pod kontrolo konstitutivnega promoterja U6. Omenjena plazmidna DNA je predstavljala ti. terapevtski plazmid pU6-antiCD105 (Priloga A).

Poleg terapevtskega plazmida smo uporabljali tudi plazmid pU6-SCR (Priloga B), ki je predstavljal ti. kontrolni plazmid. Kontrolni plazmid nosi zapis za shRNA in ima za razliko od terapevtskega plazmida, premešano zaporedje oligonukleotidov DNA, in tako ni homogen nobenemu genu znotraj mišjega genoma (Dolinšek in sod., 2015). Z uporabo kontrolnega plazmida smo preverili, ali do učinka na sferoidih pride že samo zaradi samega vstopa netarčne DNA v celice sferoidov in posledično nastanka nespecifične shRNA ali je to posledica terapije. Vse plazmide smo hranili v obliki trajnih bakterijskih kultur, saj so bili predhodno transformirani v bakterije *Escherichia coli* TOP10.

3.2.1 Gojenje bakterij za izolacijo plazmidov

Bakterije iz trajne kulture, shranjene v zamrzovalni skrinji pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ smo najprej nacepili na plošče s trdnim gojiščem Luria-Bertani (LB) z dodanim selekcijskim antibiotikom kanamicinom v koncentraciji $50\text{ }\mu\text{g/ml}$. Plošče smo gojili čez noč v inkubatorju pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Eno bakterijsko kolonijo, zrastle na trdnem gojišču LB, smo naslednji dan prenesli v 10 ml tekočega gojišča LB (pred-inoculum) z dodanim kanamicinom in jih gojili 8 ur v stresalniku pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 300 rpm. Nato je sledilo gojenje bakterij v večji količini tekočega gojišča LB (inoculum). Pripravili smo 4 avtoklavirane 1 l erlenmajerice in vanje napipetirali 250 ml tekočega gojišča LB ter dodali selektivni antibiotik kanamicin v koncentraciji $50\text{ }\mu\text{g/ml}$. Vsebinsko erlenmajeric smo premešali z rahlim kroženjem. Nato smo v vsako erlenmajerico prenesli še $500\text{ }\mu\text{l}$ bakterijske kulture iz pred-inoculuma in jih dali v vodno kopel na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in na stresanje (300 rpm) za 16 h.

3.2.2 Izolacija plazmida

Združili smo vsebini dveh erlenmajeric v eno plastično 500 ml centrifugirko in tako dobili 2 polni centrifugirki bakterijske kulture. Izolacija plazmida je potekala po ustaljenem protokolu proizvajalca izolacijskega kompleta JETSTAR 2.0 Endotoxin-free Plasmid MEGA/GIGA (Genomed, Löhne, Nemčija).

Po končani izolaciji smo izmerili koncentracijo in preverili čistost izoliranega plazmida s spektrofotometrom UV (Epoch Microplate Spectrophotometer, Take3 Micro-Volume Plate, BioTek, Winooski, VT, ZDA) v programu GEN5. Pripravili smo ploščo Take3 Session, jo očistili in na dve mesti nanесли po $2\text{ }\mu\text{l}$ slepega vzorca (voda, v kateri smo raztopili plazmid), na dve mesti pa po $2\text{ }\mu\text{l}$ raztopine izoliranega plazmida. Po opravljeni meritvi smo si zapisali koncentracijo plazmida in sproti preverili še razmerje $A_{260/280}$ (onesnaženost s proteini), pri čemer je vrednost $A_{260/280} \geq 1,8$ predstavljala primerno čistost vzorcev. Raztopino plazmida smo nato razredčili do koncentracije $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in ga shranili v zamrzovalnik na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3 Genski elektroprenos plazmidne DNA *in vitro*

Celicam na ploščah s premerom 15 cm smo odpipetirali gojišče, jih sprali z 10 ml fosfatnega pufra (PBS) (Merck, Millipore, Darmstadt, Nemčija), jim dodali 8 ml tripsina in

počakali približno pol minute, da so se celice odlepile od podlage. Nato smo celični suspenziji dodali 8 ml gojišča in jo z avtomatsko pipeto prenesli v 50 ml plastične epruvete. Morebitne ostale celice smo sprali z dodatkom 10 ml PBS pufra. Tako pripravljeno celično suspenzijo smo centrifugirali (5 min, 1500 rpm) (THERMO, Heareus MULTIFUGE 1S-R centrifuge, Waltham, MA, ZDA), odlili supernatant in previdno odpipetirali še preostanek gojišča. Celice smo resuspendirali v 5 ml hladnega (4 °C) elektroporacijskega pufra (EP) (125 mmol/l saharoza, 10 nmol/l K₂HPO₄, 2,5 mmol/l KH₂PO₄, 2 mmol/l MgCl₂·6H₂O) in celično suspenzijo ponovno centrifugirali (5 min, 1500 rpm). Po centrifugiranju smo odlili supernatant, previdno odpipetirali še preostanek pufra EP in celice resuspendirali v ~150 µl (glede na velikost peleta) hladnega pufra EP. Od tu naprej smo celično suspenzijo hranili na ledu. Pred nadaljevanjem smo celice najprej prešteli s pomočjo hemocitometra. Celice smo 100-krat redčili s pufrom EP, jih prešteli in za tem natančno izmerili še volumen celične suspenzije. Iz dobljenih vrednosti smo, ob upoštevanju, da za en GET potrebujemo 1*10⁶ celic v 40 µl celične suspenzije, izračunali koliko GET lahko naredimo in pripravili primerno koncentracijo celic.

Pripravili smo 8 epic namenjenih za genski elektroprenos in dodatne 3 za skupine brez GET. Vanje smo dali 44 µl pripravljene celične suspenzije in jih predstavili na led. Pri kontrolni skupini (B16F1, B16F10, TS/A) smo celicam dodali 11 µl vode, pri skupini pU6-SCR 11 µl plazmida pU6-SCR in pri skupini pU6-antiCD105 11 µl plazmida pU6-antiCD105. Za razliko od teh skupin smo pri skupini EP celicam dodali 11 µl vode, pri skupini pU6-SCR+EP 11 µl plazmida pU6-SCR in pri skupini pU6-antiCD105+EP 11 µl plazmida pU6-antiCD105, temu pa je sledil še GET (Preglednica 1). S tretiranjem celic le z električnimi pulzi (skupina EP) smo želeli preveriti, ali je učinek na sferoide posledica delovanja električnega polja ali je to posledica utišnja endoglina.

Tik pred GET smo k celicam v epici dodali 11 µl vode ali plazmidne DNA in s pipetiranjem dobro premešali njeno vsebino. 50 µl te mešanice smo prenesli med 2 vzporedni elektrodi iz nerjavečega jekla z medsebojno oddaljenostjo 2 mm, povezani s pulznim generatorjem GT-01 (Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija). Dovedli smo 8 električnih pulzov pravokotne oblike z amplitudo 120 V (600 V/cm), dolžine 5 ms pri frekvenci 1 Hz. Elektroporirano kapljico celic smo stresli na pred tem pripravljeno in ustrezno označeno petrijevko. Celicam smo takoj po GET dodali 100 µl FBS, 5 minut za tem pa še 9 ml gojišča in petrijevke dali v inkubator na 37 °C in 5 % CO₂ za 24 h. Med posameznimi genskimi elektroprenosi smo elektrodi sprali v alkoholu in ju dobro obrisali s sterilno gazo.

Preglednica 1: Kratice poskusnih skupin, njihov pomen in število enkratnih GET na posamezno skupino (ker električni pulzi sami delujejo citotoksično, smo naredili več ponovitev, da smo zagotovili dovolj celic za nadaljnje poskuse).

Ime skupine	Pomen	Število GET
B16F1, B16F10, TS/A	Celična suspenzija + voda	0
pU6-SCR	Celična suspenzija + plazmid pU6-SCR	0
pU6-antiCD105	Celična suspenzija + plazmid pU6-antiCD105	0
EP	Celična suspenzija + voda + EP	2
pU6-SCR+EP	Celična suspenzija + plazmid pU6-SCR + EP	3
pU6-antiCD105+EP	Celična suspenzija + plazmid pU6-antiCD105 + EP	3

3.3 PRIPRAVA SFEROIDOV

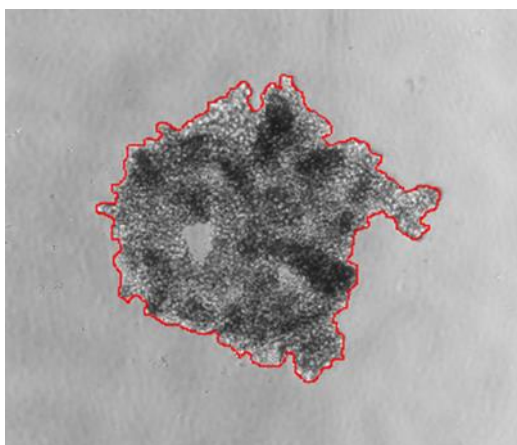
Po 24 urni inkubaciji smo celice vseh šestih petrijevk tripsinizirali. Najprej smo jim odpipetirali gojišče, jih sprali s 5 ml pufru PBS, jim dodali 4 ml tripsina in počakali približno pol minute, da so se celice odlepili od podlage. Nato smo celični suspenziji dodali 5 ml gojišča in jo z avtomatsko pipeto prenesli v 50 ml plastične epruvete. Morebitne ostale celice smo sprali z dodatkom 5 ml pufru PBS. Po končani tripsinizaciji smo imeli 6 plastičnih epruvet, ki smo jih nato centrifugirali (5 min, 1500 rpm), odlili supernatant, previdno odpipetirali še preostanek gojišča in celice resuspendirali v 500 μ l gojišča. Tako pripravljene celice smo prešteli z uporabo hemocitometra (10- kratno redčenje s pufrom PBS). S pomočjo tega podatka smo izračunali, koliko celične suspenzije posamezne poskusne skupine potrebujemo za pripravo sferoidov z začetno koncentracijo 1000 celic v 150 μ l gojišča. V 6 ustrezno označenih 50 ml centrifugirkih smo najprej prenesli 4,5 ml gojišča in jim nato dodali še izračunane količnine celičnih suspenzij, kar je ustrezalo količini suspenzije za 30 vdolbinic na plošči ULA s 96 vdolbinicami z okroglim dnom (zmanjšana zmožnost pritjevanja celic) (Corning Inc., Corning, NY, ZDA). Pripravili smo kadičke in vanje prenesli večino vsebine posamezne 50 ml centrifugirke. Vzeli smo 8 kanalno pipeto, jo nastavili na vrednost 150 μ l in z njo premešali vsebino kadičke ter jo prenesli v 8 ustreznih vdolbinic plošče ULA. Vsaki skupini sta ustrezala 2 stolpca vdolbinic, kar je pomenilo 16 sferoidov na skupino. Ko smo zapolnili vseh 96 vdolbinic, smo ploščo centrifugirali (3 minute, 1500 rpm). Tako pripravljene skupke celic, ki so tvorili sferoide, smo dali v inkubator na 37 °C in 5 % CO₂ za približno 24 h.

3.4 SPREMLJANJE BIOLOŠKIH LASTNOSTI TUMORSKIH CELIC V SFEROIDIH

3.4.1 Rast sferoidov

Spremljanje rasti sferoidov se je začelo en dan po GET in je potekalo 3 dni zaporedoma na vsakih 24 ur. Slike izbranih 8 sferoidov vsake skupine smo zajemali z digitalno kamero Olympus DP72 (Olympus, Hamburg, Nemčija), povezano z invertnim mikroskopom Olympus IX-70 (Olympus) pod 40-kratno povečavo. Kamero Olympus DP72 (Olympus) in s tem kvaliteto fotografij smo nadzirali s pomočjo programa CellSens Dimension (Olympus). Dva dni po GET smo sferoidom odvzeli 70 μ l gojišča in jim dodali 100 μ l svežega. Na tak način smo spremljali rast 48 sferoidov na posamezen poskus.

Slikanim sferoidom smo po zaključku poskusa izmerili površino, ki jo je tvoril skupek tumorskih celic, značilnih za posamezno celično linijo. Površino sferoidov smo izmerili s programskim orodjem FIJI (verzija 1.48, Wayne Rasband, National Institutes of Health, ZDA) tako, da smo jih obrisali, in s tem dobili njihovo površino (Sl. 15). Za test rasti smo v programu Microsoft Excel 2010 dobljene vrednosti po 24, 48 in 72 urah normalizirali na začetno vrednost (po 24 urah). Tako dobljene rezultate vseh treh poskusov smo združili in izračunali povprečje in standardno napako vseh vrednosti po 24, 48 in 72 urah za vsako skupino posebej. Sledila je izdelava grafov in njihova statistična analiza. Montažo reprezentativnih fotografij smo naredili s programskim orodjem FIJI.

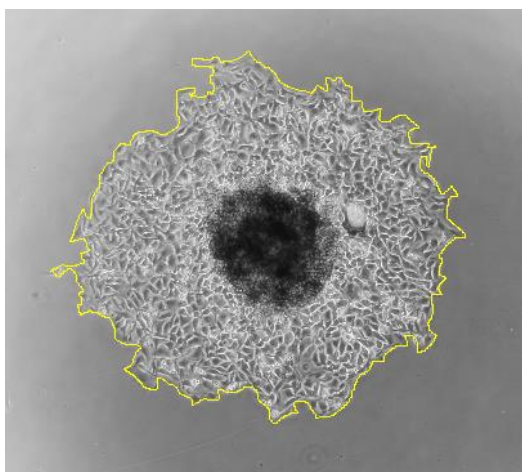


Slika 15: Z rdečo obrobo označena površina sferoida (primer kontrolnega sferoida B16F1 po 48h).

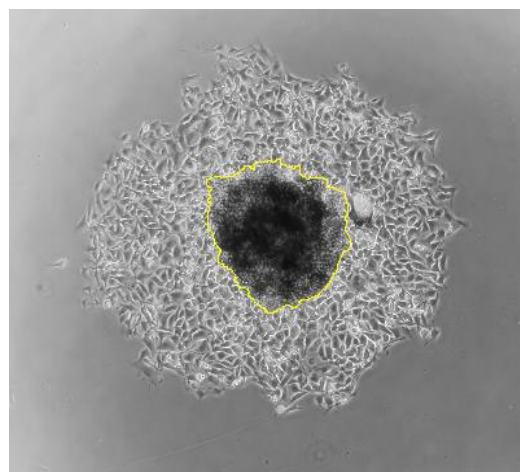
3.4.2 Migracija sferoidov

Migracijo sferoidov smo začeli spremljati 2 dni po GET plazmidne DNA. Za test migracije smo uporabili plošče s 24 vdolbinicami prekritimi s fibronektinom (Corning), ki smo jih do uporabe hranili v hladni sobi. Najprej smo v vdolbinice napipetirali 500 μ l gojišča, nato smo s pipeto s širšim tipsom v vsako prenesli po en sferoid (4 na skupino). Ploščo s sferoidi smo dali v inkubator na 37 °C in 5 % CO₂. Sledilo je pregledovanje sferoidov z invertnim mikroskopom Olympus IX-70 pod 40-kratno povečavo in zajetje njihovih fotografij z digitalno kamero Olympus DP72 po 1, 4, 8, 24 in 48 urah. Na tak način smo spremljali migracijo 24 sferoidov na posamezen poskus.

Slikanim sferoidom smo po zaključku poskusa izmerili površino migracije. Migracija celic je vidna kot strnjeno območje posameznih celic, ki se ločijo od sferoida v njegovo neposredno bližino. Površino migracije posameznega sferoida smo določili, tako da smo s pomočjo programskega orodja FIJI najprej obrisali sferoide skupaj z območjem migracije, nato pa še same sferoide brez migratornih celic. Razlika teh vrednosti nam je za rezultat dala površino migracije (Sl. 16 in 17). Iz dobljenih vrednosti smo želeli izračunati hitrost oziroma stopnjo migracije celic. Najprej smo za vsakega od 4 sferoidov iz vsake skupine s pomočjo programa Microsoft Excel 2010 narisali grafe migracije v odvisnosti od časa in izračunali njihove naklone. Slednje smo izračunali po formuli za graf linearne funkcije ($y=kx+n$), pri čemer nas je zanimal smerni koeficient grafa (k), ki je hkrati pomenil tudi naklon premice. Naklone grafov iz vseh poskusnih skupin smo nato normalizirali na naklon grafa iz kontrolne skupine. Tako dobljene rezultate vseh treh poskusov smo združili ter izračunali povprečje in standardno napako vrednosti za vsako skupino posebej. Sledila je izdelava grafov in njihova statistična analiza. Montažo reprezentativnih fotografij smo naredili s programskim orodjem FIJI.



Slika 16: Z rumeno obrobo označena celotna površina migracije celic skupaj s sferoidom (primer kontrolnega sferoida B16F1 po 24 h).



Slika 17: Z rumeno obrobo označena površina sferoida brez migriranih celic (primer kontrolnega sferoida B16F1 po 24 h).

3.4.3 Invazija sferoidov

Pred začetkom poskusa smo iz zamrzovalnika vzeli Matrigel™ (BD Biosciences, San Jose, ZDA) in ga takoj prestavili na led ter počakali, da se počasi odtali. Matrigel je ekstrakt zunajceličnega matriksa, izoliranega iz mišjega sarkoma Engelbreth-Holm-Swarm in se začne hitro strjevati, ko je temperatura višja od 4 °C. Njegovo začetno koncentracijo 8,9 mg/ml smo z dodatkom hladnega izotoničnega pufru PBS razredčili na koncentracijo 1 mg/ml. Tako pripravljene smo nato tudi tekom priprave invazije shranjevali na ledu. Za test invazije smo vzeli 2 ploščici μ -Slide Angiogenesis (Ibidi, Martinsried, Nemčija) in v vdolbinice z ohlajenim tipsom napipetirali 10 μ l hladnega matrigela ter ploščice pol ure inkubirali pri 37 °C in 5 % CO₂. Ko se je strdil, smo s pipeto s širšim tipsom na predhodno nanešen matrigel previdno prenesli po 4 sferoide iz vsake skupine, v vsako vdolbinico enega. Skupno smo torej opazovali celično invazijo 24 sferoidov, pri čemer omenjenega poskusa na celični liniji B16F1 nismo izvajali, saj te celice ne invadirajo. Sferoide smo nato prekrili z 10 μ l matrigela in inkubirali še dodatno uro pri 37 °C in 5 % CO₂. Po izteku inkubacije smo v vsako vdolbinico s sferoidom dodali 40 μ l gojišča in ponovno dali v inkubator.

Po 24, 48 in 72 urah je sledilo pregledovanje sferoidov z invertnim mikroskopom Olympus IX-70 pod 40-kratno povečavo in zajetje njihovih fotografij z digitalno kamero Olympus DP72. Na ta način smo spremljali invazijo 24 sferoidov na posamezen poskus.

Ker terapija ni imela izrazitega vpliva na invazijo sferoidov, grafične analize nismo izvajali. Montažo reprezentativnih fotografij smo naredili s programskim orodjem FIJI.

3.5 STATISTIKA

Za vsako proučevano skupino smo preverili, ali so podatki normalno porazdeljeni (test Shapiro-Wilk) in izračunali aritmetično sredino in njeno standardno napako. Razlike med posameznimi skupinami smo določili s pomočjo enosmerne analize variance (one-way ANOVA) ter Holm-Sidakovim testom za množično primerjavo med skupinami.

Za statistično značilne smo šteli tiste rezultate, za katere je veljalo, da je njihova P-vrednost manjša od 0,05. Vsa statistična obdelava podatkov in grafični prikaz rezultatov so bili opravljeni v programu SigmaPlot Software (verzija 12.0, Systat Software, London, Velika Britanija).

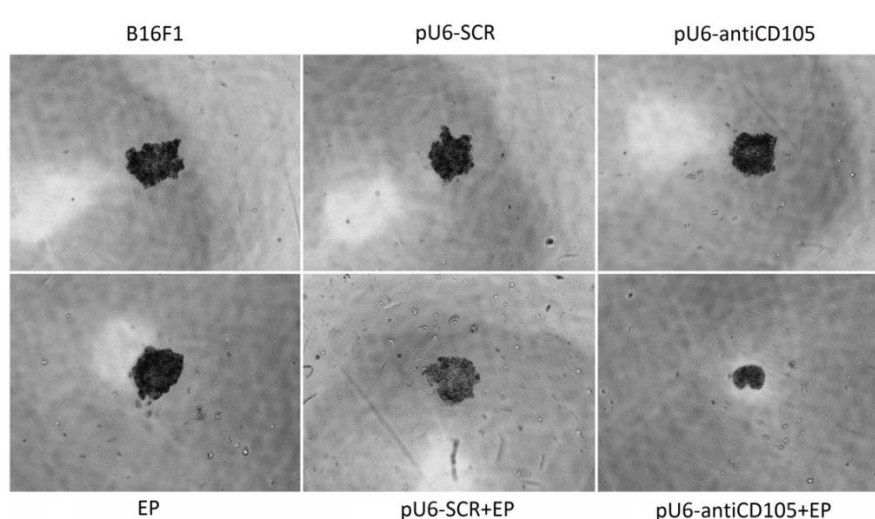
4 REZULTATI

V magistrski nalogi smo želeli preveriti učinek genskega elektroprenosa plazmida, ki kodira shRNA proti endoglinu na sferoide različnih tumorskih celic. Poskus je vključeval celični liniji B16F1 in B16F10 z visokim izražanjem endoglina ter celično linijo TS/A z nizko stopnjo izražanja endoglina. Kot terapevtski plazmid smo uporabili plazmid pU6-antiCD105, ki nosi zapis za kratko lasnično molekulo RNA (shRNA) proti endoglinu, negativno kontrolo pa je predstavljal plazmid pU6-SCR. Spremljali smo učinek na rast, migracijo in invazijo sferoidov. Do sedaj je bilo dokazano, da utišanje endoglina s tem plazmidom zmanjša proliferacijo, migracijo in invazijo ter poveča adhezijo endotelijskih celic *in vitro*, hkrati pa ima protitumorski učinek *in vivo* (Dolinšek in sod., 2015).

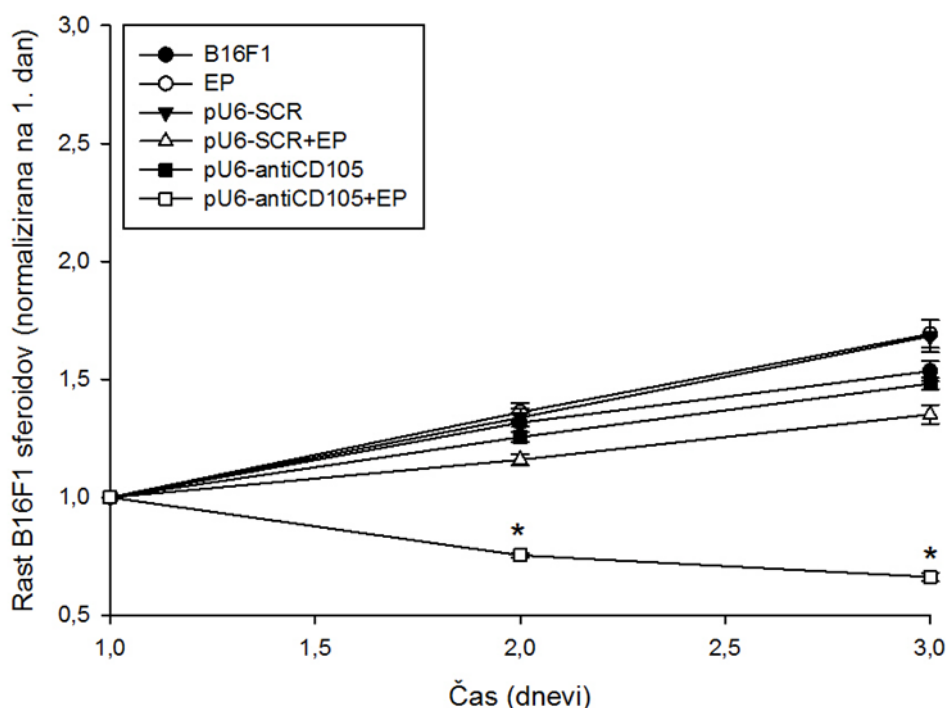
4.1 Rast

Velikost in oblika sferoidov kontrolne skupine celične linije B16F1 je primerljiva z vsemi ostalimi skupinami, izjema so le sferoidi v terapevtski skupini pU6-antiCD105+EP. Pri tej skupini so sferoidi precej manjši od sferoidov ostalih skupin, poleg tega pa izgledajo tudi kompaktnejši in manj razvejani (Sl. 18).

Iz poteka grafa je mogoče sklepati, da se je rast pri kontrolni skupini tekom opazovanja linearno povečevala, enako kot tudi pri skupinah EP, pU6-SCR, pU6-SCR+EP in pU6-antiCD105. Genski elektroprenos plazmidne shRNA proti endoglinu je pri terapevtski skupini pU6-antiCD105+EP statistično značilno zmanjšal rast sferoidov, kar kaže na zmanjšano proliferacijo tumorskih celic v sferoidih (Sl.19).



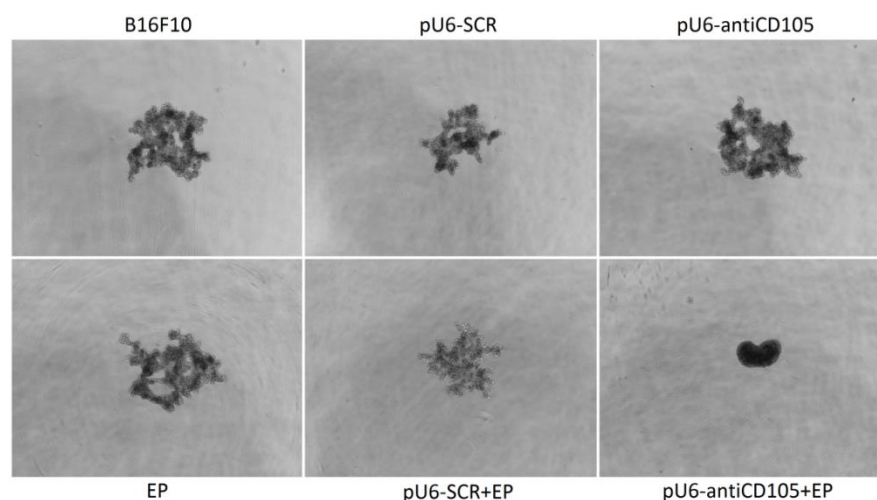
Slika 18: Reprezentativne slike rasti posameznih skupin sferoidov B16F1 (2. dan).



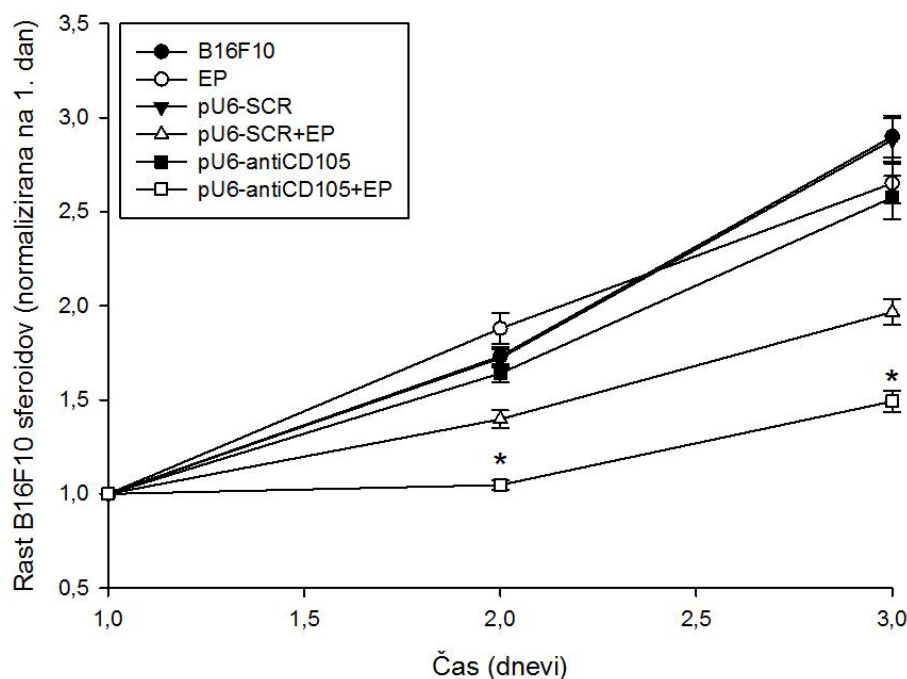
Slika 19: Rast B16F1 sferoidov, * $P < 0,05$ proti vsem skupinam.

Pri celični liniji B16F10 sta velikost in oblika sferoidov kontrolne skupine prav tako primerljiva z velikostjo in rastjo sferoidov ostalih skupin. Nekaj razlik je v primerjavi s skupino pU6-SCR+EP, pri kateri so sferoidi nekoliko manjši. Največje razlike se kažejo pri sferoidih skupine pU6-antiCD105+EP, saj so le-ti precej manjši od sferoidov ostalih skupin, bolj kompaktni in nerazvejani (Sl. 20).

Iz grafa, ki prikazuje rast sferoidov, se vidi, da se je rast vseskozi povečevala pri vseh skupinah. Najpočasnejše so rastli sferoidi iz skupine pU6-antiCD105+EP, pri katerih je bila rast tudi statistično značilno počasnejša od ostalih (Sl. 21). Tudi v skupini pU6-SCR+EP so sferoidi rastli počasneje, vendar razlike niso bile statistično značilne.



Slika 20: Reprezentativne slike rasti posameznih skupin sferoidov B16F10 (2. dan).

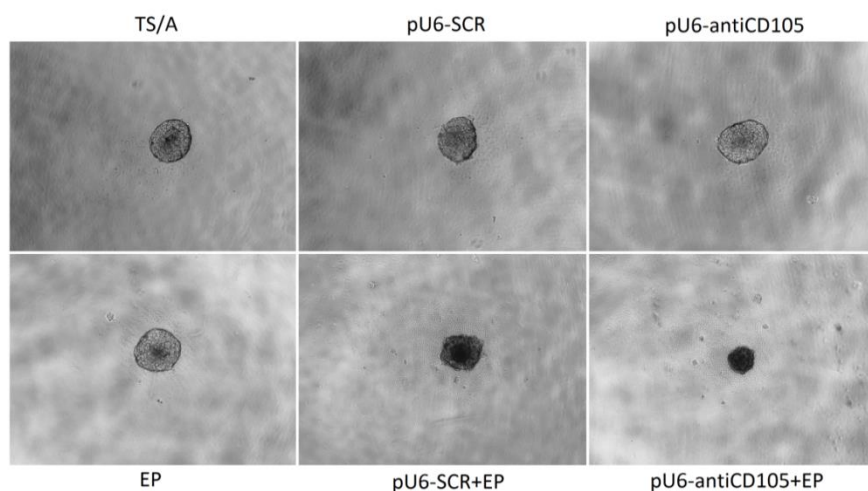


Slika 21: Rast B16F10 sferoidov, * $P < 0,05$ proti vsem skupinam.

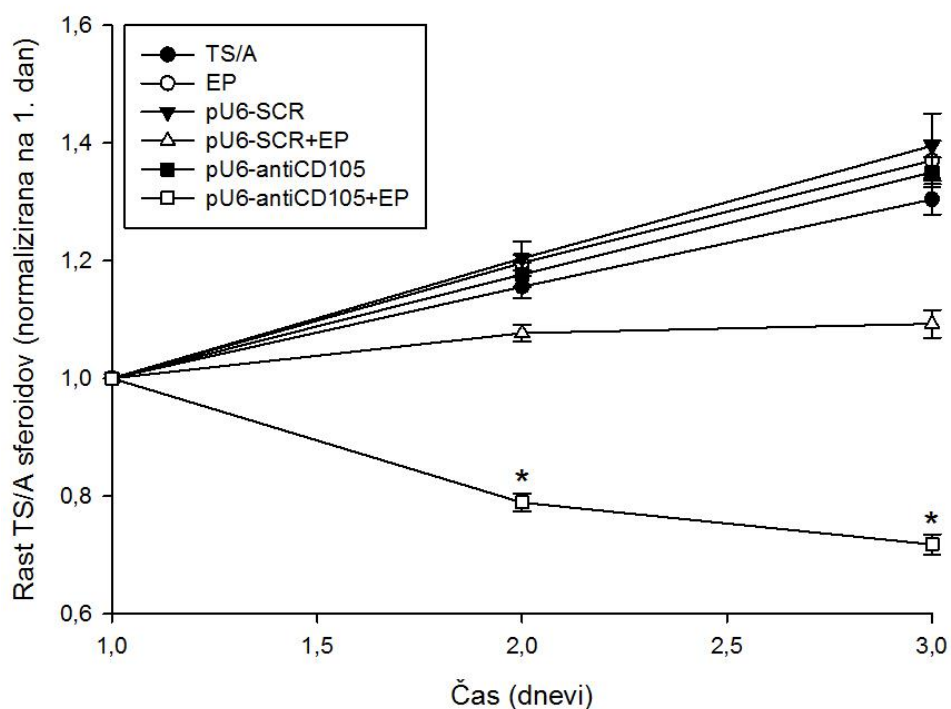
Sferoidi pri celični liniji TS/A so si po velikosti in obliki med seboj precej podobni. Sferoidi pri kontrolni, kot tudi pri ostalih skupinah, so približno enako veliki in okrogle oblike. Po velikosti nekoliko odstopajo le sferoidi terapevtske skupine pU6-antiCD105+EP, ki so nekoliko manjši od ostalih in bolj kompaktni (Sl. 22).

Iz grafa, ki prikazuje rast sferoidov, lahko razberemo, da se je rast pri kontrolni skupini ter skupinah EP, pU6-SCR in pU6-antiCD105 vse tri dni linearno povečevala. Rast sferoidov

pri skupini pU6-SCR+EP je bila počasnejša, medtem ko se je rast pri terapevtski skupini med poskusom počasi zmanjševala, sferoidi pa so statistično značilno manjši od ostalih (Sl. 23).



Slika 22: Reprezentativne slike rasti posameznih skupin sferoidov TS/A (2. dan).

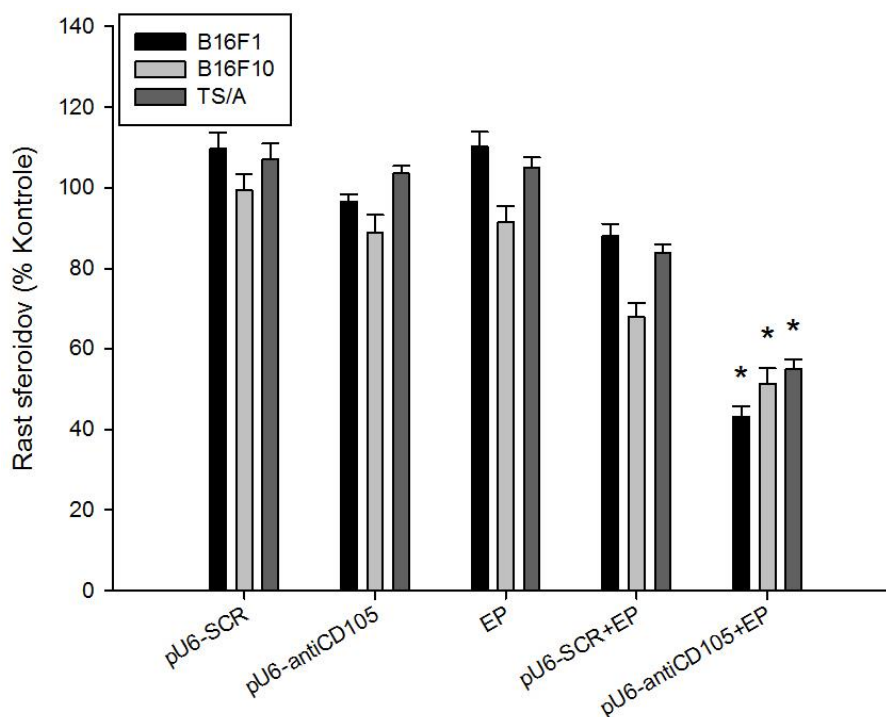


Slika 23: Rast TS/A sferoidov, * $P < 0,05$ proti vsem skupinam.

Če med seboj primerjamo vse tri celične linije, lahko ugotovimo, da liniji B16F1 in B16F10 tvorita sferoide, ki so nepravilnih oblik, so nekompaktni in imajo številne izrastke, medtem ko celice TS/A tvorijo pravilne, okrogle in kompaktne sferoide.

Terapija je najbolj zmanjšala rast sferoidov celične linije B16F1, pri kateri so bili sferoidi skupine pU6-antiCD105+EP v povprečju za ~ 57 % manjši od sferoidov kontrolne skupine (3. dan poskusa). Pri invazivnejši celični liniji B16F10 se rast tumorjev terapijske skupine v času poskusa sicer ni zmanjševala, vendar je končna velikost sferoidov terapijske skupine kljub temu v povprečju za ~ 49 % manjša od sferoidov kontrolne skupine, kar kaže na zaostanek v njihovi rasti. Zmanjševanje rasti pri terapijski skupini je opazno tudi pri celicah TS/A, pri katerih so sferoidi terapijske skupine v povprečju za ~ 45 % manjši od sferoidov kontrolne skupine (Sl. 24).

Iz primerjave potekov posameznih grafov je razvidno, da je hitrost rasti največja pri sferoidih B16F10, pri kateri premice bolj strmo naraščajo, medtem ko je pri sferoidih B16F1 in TS/A potek grafov položnejši, kar kaže na nižjo stopnjo rasti, ki je med obema omenjenima linijama podobna.



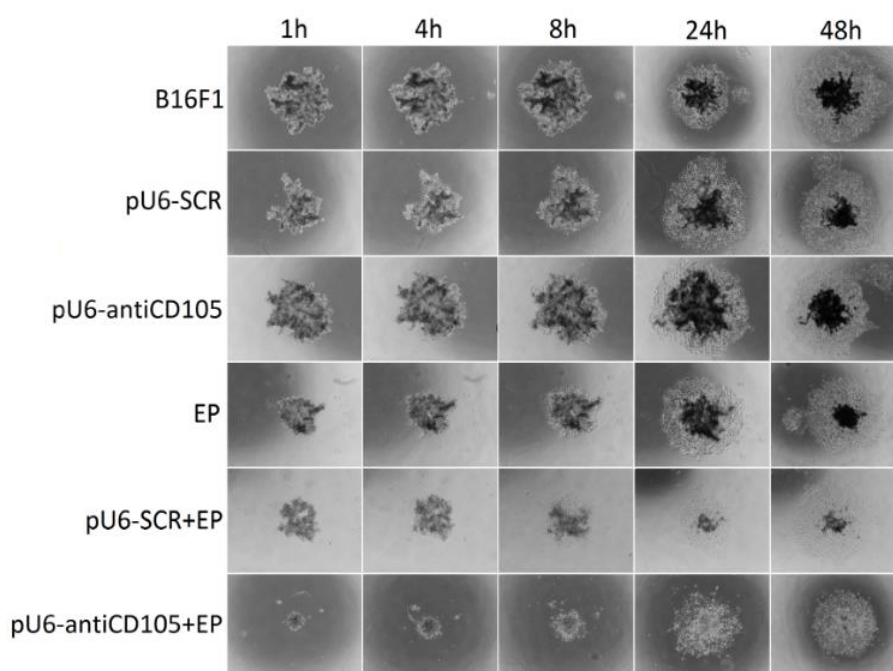
Slika 24: Primerjava rasti sferoidov vseh 3 celičnih linij glede na kontrolno skupino (3. dan poskusa), * $P < 0,05$ proti vsem skupinam.

4.2 Migracija

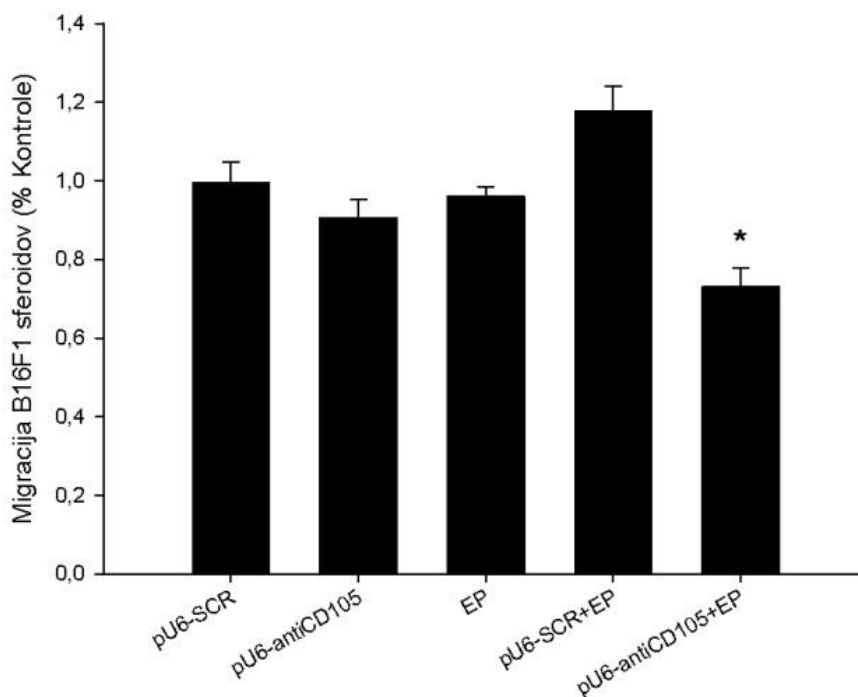
Migrirane celice kontrolne skupine pri celični liniji B16F1 okoli sferoidov tvorijo strnjeno območje celic, ki je po površini primerljivo z vsemi ostalimi skupinami razen s skupino

pU6-antiCD105+EP, pri kateri je površina migracije nekoliko manjša. Pri vseh skupinah so bile migracije posameznih celic opažene že po štirih urah (Sl. 25).

Do podobnih ugotovitev pridemo tudi z analizo grafa, ki prikazuje hitrost migracije sferoidov. Hitrost migracije glede na kontrolno skupino je pri skupinah pU6-SCR, pU6-antiCD105 in EP zelo podobna, nekoliko večja je pri skupini pU6-SCR+EP. V primerjavi z ostalimi skupinami, je pri terapevtski skupini statistično značilno manjša (Sl. 26).



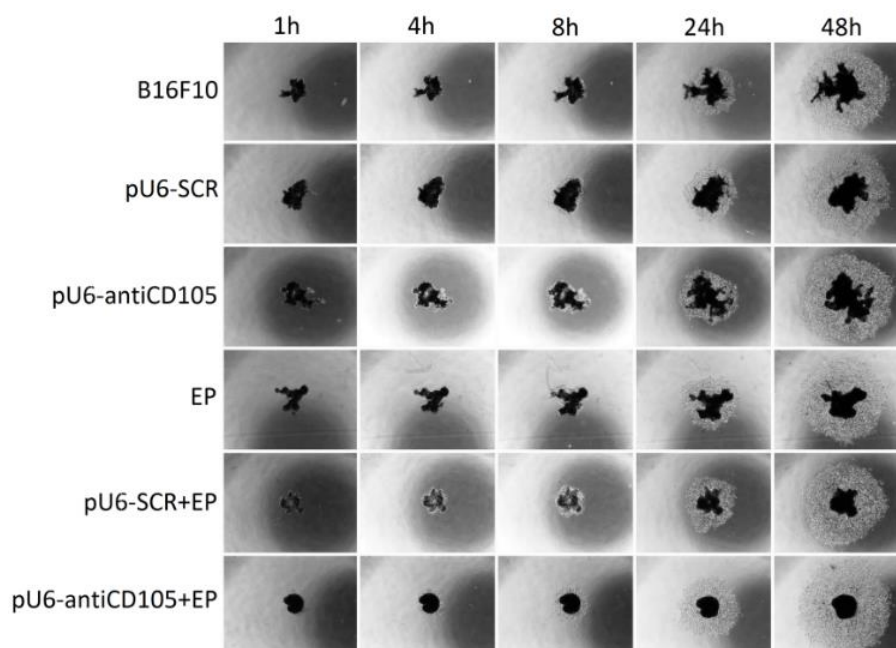
Slika 25: Reprezentativne slike migracije celic sferoidov B16F1.



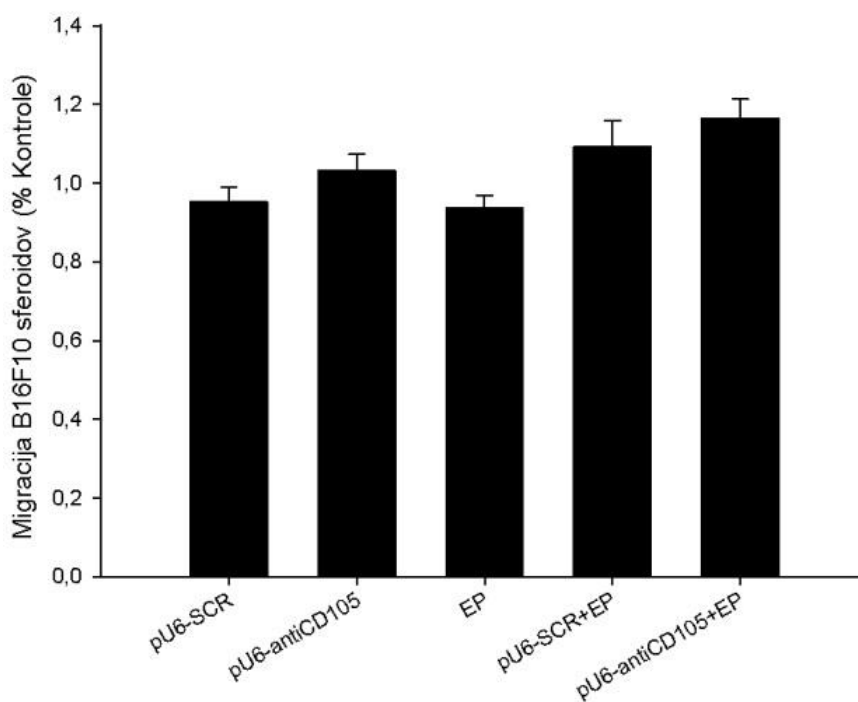
Slika 26: Hitrost migracije B16F1 sferoidov, * $P < 0,05$ proti vsem skupinam.

Območje migriranih celic kontrolne skupine celične linije B16F10 je podobno kot pri vseh ostalih eksperimentalnih skupinah. Migracije posameznih celic so bile tudi pri tej liniji opažene že po štirih urah (Sl. 27).

Iz grafa hitrosti migracije sferoidov lahko razberemo, da se hitrosti migracije posameznih skupin, med seboj statistično značilno ne razlikujejo (Sl. 28).



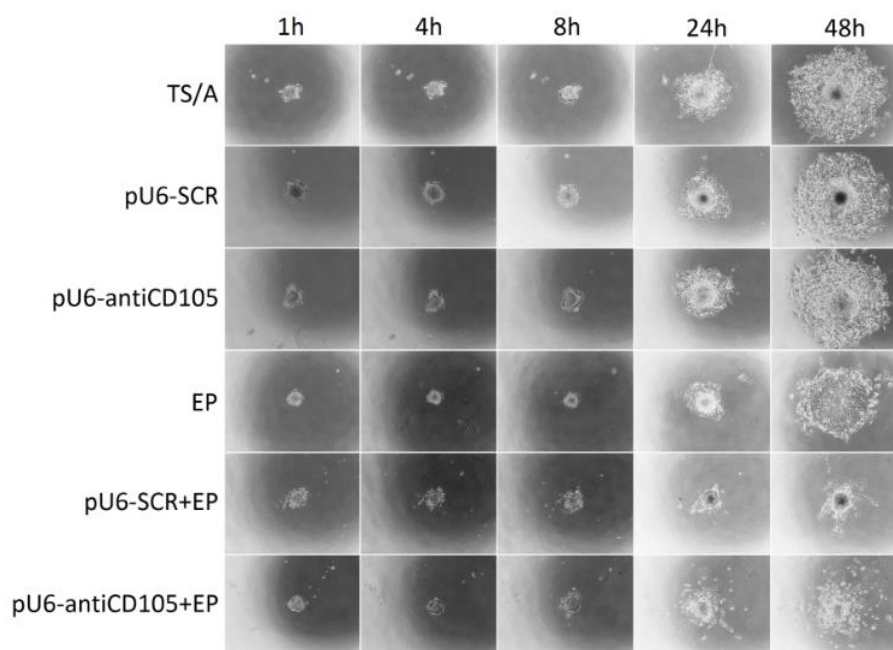
Slika 27: Reprezentativne slike migracije celic sferoidov B16F10.



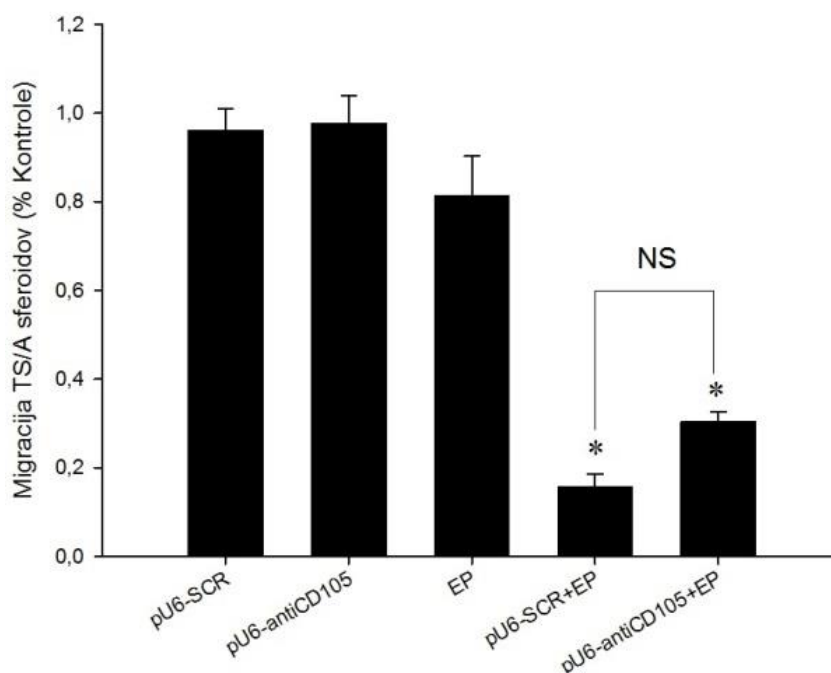
Slika 28: Hitrost migracije B16F10 sferoidov.

Površina migracije celic kontrolne skupine celične linije TS/A je primerljiva s skupinama pU6-SCR in pU6-antiCD105, medtem ko je pri skupini EP nekoliko manjša. Pri skupinah pU6-SCR+EP in pU6-antiCD105+EP je območje migracije izrazito zmanjšano, poleg tega pa tudi ni več strnjeno kot pri ostalih skupinah, temveč je prisotno v obliki posameznih oddaljenih celic. Tudi pri tej celični liniji so se prve migracije posameznih celic pojavile že po štirih urah, vendar so bile zelo redke in prisotne predvsem pri skupinah z EP. Pri ostalih skupinah je migracija v začetku nekoliko počasnejša, vendar se proti koncu hitro stopnjuje in po površini preseže skupine z elektroporacijo, predvsem skupini pU6-SCR+EP in pU6-antiCD105+EP. Opaznejša migracija pri vseh skupinah nastopi šele po 24 urah (Sl. 29).

Podobne ugotovitve lahko razberemo iz grafa, ki prikazuje hitrost migracije sferoidov. Glede na kontrolno skupino je pri skupinah pU6-SCR in pU6-antiCD105 hitrost migracije zelo podobna, medtem ko je pri skupini EP nekoliko nižja. Statistično značilno manjša je pri skupinah pU6-SCR+EP in pU6-antiCD105+EP. Omenjeni skupini se statistično značilno ne razlikujeta, pri čemer je hitrost migracije sferoidov pri skupini pU6-SCR+EP celo manjša kot pri skupini pU6-antiCD105+EP (Sl. 30).



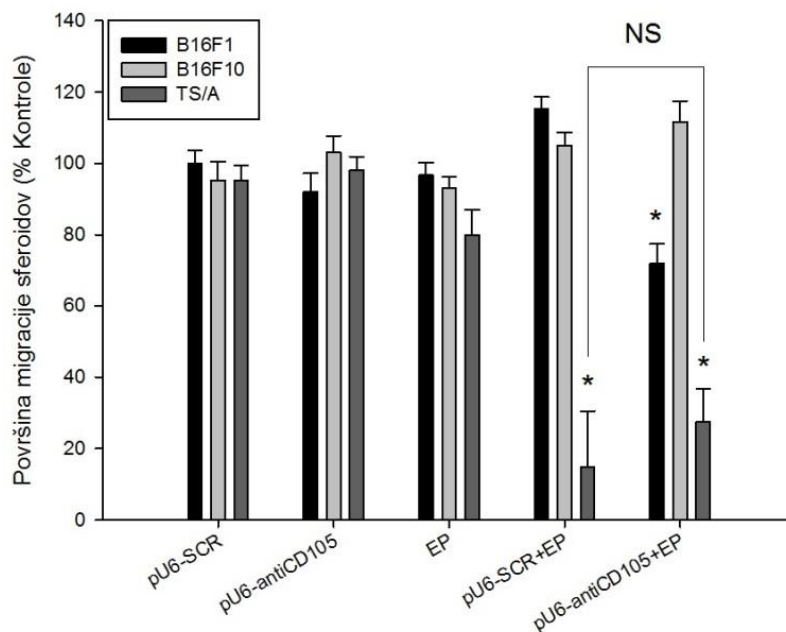
Slika 29: Reprezentativne slike migracije celic sferoidov TS/A.



Slika 30: Hitrost migracije TS/A sferoidov, * $P < 0,05$ proti vsem skupinam, NS (ni statistično značilno).

Primerjava vseh treh celičnih linij med seboj kaže na to, da se je na terapijo najbolje odzvala celična linija B16F1. Pri slednji je bila površina migracije skupine pU6-antiCD105+EP v primerjavi s kontrolno skupino v povprečju manjša za ~ 28 %, stopnja migracije pa v povprečju za ~ 27 % (po 48 urah). Na invazivnejšo linijo B16F10 terapija ni imela učinka, saj je bila površina migracije sferoidov skupine pU6-antiCD105+EP večja za ~ 12 %, njihova stopnja migracije pa za ~ 16 % v primerjavi s kontrolno skupino. Največje zmanjšanje površine in hitrosti migracije sferoidov je bilo pri celični liniji TS/A. Pri teh celicah je bila površina migracije sferoidov terapevtske skupine v primerjavi s sferoidi kontrolne skupine v povprečju manjša za ~ 72 %, hitrost migracije pa v povprečju za 70 %. Ker pa se pri omenjeni celični liniji površina in hitrost migracije pri skupini pU6-SCR+EP (negativna kontrola) zmanjšata kar za ~ 85 % v primerjavi s kontrolno skupino, uspešnosti terapije ne moremo potrditi (Sl. 31).

Končna površina migracije sferoidov je pri celicah B16F1 in TS/A zelo podobna, medtem ko je pri celični liniji B16F10 nekoliko večja. V primerjavi z linijama B16F1 in B16F10 se pri liniji TS/A v začetnih osmih urah površina migracije povečuje nekoliko počasneje.

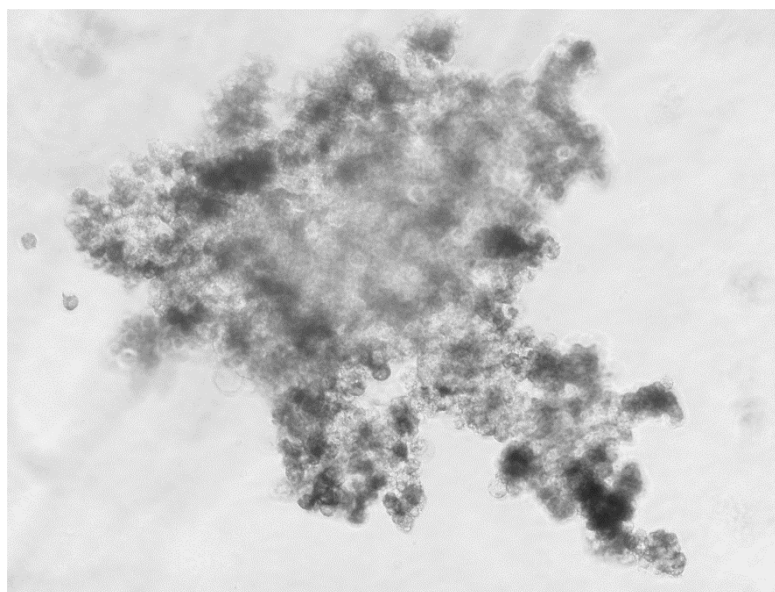


Slika 31: Primerjava površine migracije vseh 3 celičnih linij glede na kontrolno skupino (po 48 urah), * $P < 0,05$ proti vsem skupinam, NS (ni statistično značilno).

4.3 Invazija

Štiri sferoide iz vsake eksperimentalne skupine smo tri dni po terapiji prestavili na ploščo za izvedbo testa invazije in jih prekrili z matrigelom. Naslednji dan po nastavitvi poskusa smo začeli s tridnevnim opazovanjem in fotografiranjem sferoidov. Invazija celic pri celični liniji TS/A je vidna kot strnjeno območje celic, ki se žarkasto razširja v matrigel, ki obdaja sferoide. Pri celični liniji B16F10 se strnjeno območje celic prav tako razširja v matrigel, le da je robni predel bolj ali manj enotne oblike.

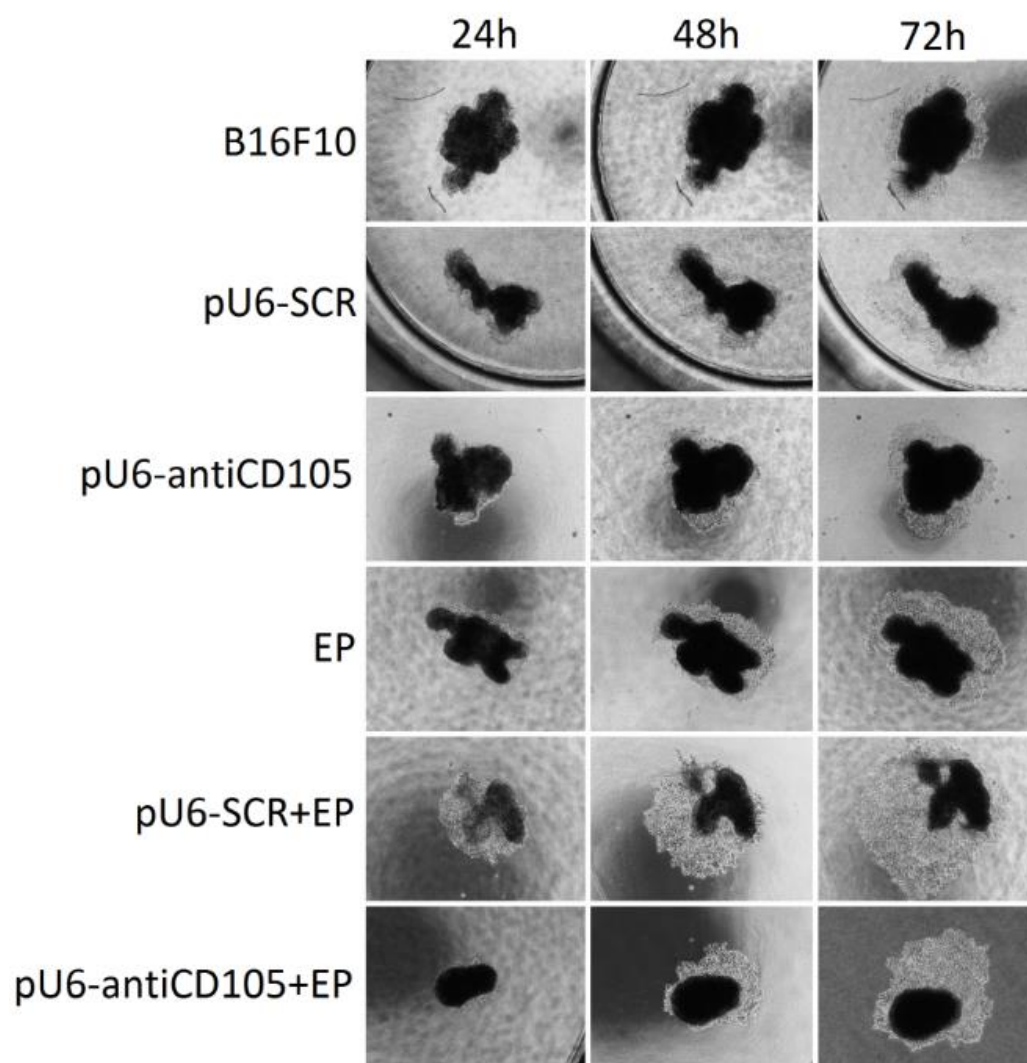
Postopek je bil enoten za obe celični liniji, na katerih smo izvajali poskus invazije. Na celični liniji B16F1 poskusa invazije nismo izvajali, ker smo tekom postopka optimizacije metode ugotovili, da celice B16F1 niso sposobne invazije v matrigel (Sl. 32).



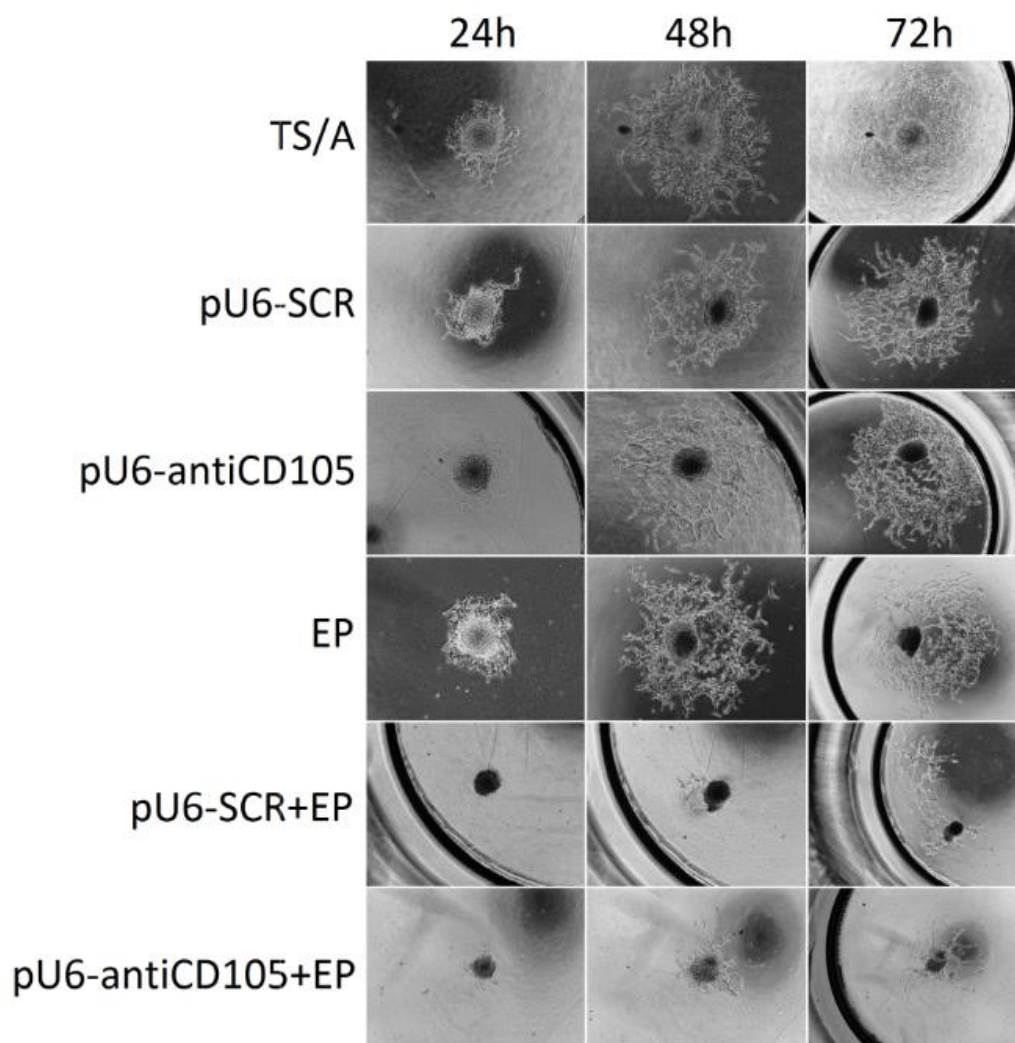
Slika 32: Sferoid celične linije B16F1 brez vidne invazije (po 24 urah).

Pri celični liniji B16F10 je površina invazije pri vseh skupinah podobna, zato lahko sklepamo, da utišanje endoglina nima opaznejšega vpliva na invazijo omenjene celične linije (Sl. 33).

Pri celični liniji TS/A je bilo območje invazije najizrazitejše pri kontrolni skupini. Nekoliko manjša in med seboj podobna površina invazije je prisotna pri sferoidih iz skupin pU6-SCR, pU6-antiCD105 in EP. Pri skupinah pU6-SCR+EP in pU6-antiCD105+EP je bilo območje invazije zelo majhno in še izrazitejše žarkasto oblikovano (Sl. 34). Slednje opažanje bi lahko kazalo na uspešnost terapije pri tej celični liniji, ker pa tega nismo opazili pri večini sferoidov skupin pU6-SCR+EP in pU6-antiCD105+EP, o statistični pomembnosti rezultatov ne moremo govoriti. Ker iz pregleda slik torej nismo opazili očitnega vpliva na invazijo in zaradi zahtevne obdelave slik, nadaljnje analize nismo izvedli.



Slika 33: Reprezentativne slike invazije posameznih skupin sferoidov B16F10.



Slika 34: Reprezentativne slike invazije posameznih skupin sferoidov TS/A.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Predvsem v zadnjem desetletju smo priča številnim raziskavam, ki so potrdile vpletenost endoglina v proces angiogeneze in njegovo potencialno možnost za uporabo, kot diagnostično, prognostično in terapevtsko sredstvo pri bolnikih s tumorji (Dallas in sod., 2008; Nassiri in sod., 2011). Naslednji korak, ki se je tako zdel smiseln, je bil zasnovati poskuse, ki bi endoglin uporabili kot terapevtsko tarčo in tako omogočili razvoj nove potencialne metode antiangiogenega zdravljenja in diagnostike. Predstavljenih je bilo več monoklonskih protiteles specifičnih za endoglin. Poskusi na mišjih modelih pri nekaterih vključujejo konjugacijo mAb s toksini in radioaktivnimi kemikalijami, kar bi lahko omogočilo njihovo uporabo v terapiji in slikovnem prikazu tumorjev (Balza in sod., 2001).

Obetavne rezultate pri bolnikih z napredovalim rakom kaže študija anti endoglinkega monoklonskega protitelesa TRC105. Gre za uporabo himernega imunoglobulinskega protitelesa G1 (IgG1), ki veže humani endoglin in inducira protitelesno odvisno celično citotoksičnost in apoptozo humanih vaskularnih endotelijskih celic in pozitivnih tumorskih celic CD105. Klinične raziskave so pokazale dober učinek tovrstne terapije, njeno dobro prenašanje pri klinično relevantnih odmerkih in odsotnost neželenih učinkov kot so hipertenzija, proteinurija in tromboza, kateri so pogosto povezani z uporabo inhibitorjev VEGF (Rosen in sod., 2012).

Čeprav je endoglin nedvomno povečano izražen na tumorskem žilju, njegova ekspresija ni omejena le na tumorska tkiva, temveč je njegova distribucija prisotna tudi na žilah normalnih zrelih tkiv. Kljub temu da je njegovo izražanje na zdravih tkivih nizko, so po uporabi terapije anti CD105 opazili pojav določenih stranskih učinkov, zaradi česar je zagotovitev tumorsko specifične vezave zdravil postala ključnega pomena (Rosen in sod., 2014). Dobro alternativo sistemskemu zdravljenju z monoklonskimi protitelesi bi lahko predstavljal lokalni genski elektroprenos molekul siRNA proti endoglinu. Dolinšek in sod. (2013) so potrdili dober antiangiogeni potencial omenjene terapije, ki bi jo tako v prihodnosti lahko uporabljali, ne sicer kot samostojno obliko zdravljenja, marveč kot dodatek k že uveljavljenim terapevtskim tehnikam. Zaradi kratke razpolovne dobe molekule siRNA, je skupina v sledeči raziskavi (2015) predstavila plazmid, ki nosi zapis za shRNA proti genu za endoglin. Poskus je poleg podaljšanega protitumorskega vpliva potrdil, da ima utišanje endoglina antiangiogene in žilno razdiralne učinke na tumorsko ožilje. V principu shRNA deluje enako kot siRNA, le da se v celici prepíše v obliki lasnične zanke. V celici se nato ta lasnična zanka odstrani, tako da ostane samo siRNA, ki deluje na tarčno molekulo mRNA. Uporaba plazmida z shRNA je optimalnejša od uporabe same siRNA, saj je plazmid manj občutljiv na razgradnjo z nukleazami, poleg tega pa se ta shRNA pod vplivom promotorja kontinuirano izraža. V nasprotnem primeru direktna vstavitev siRNA v celico privede do tega, da bo zaradi "učinka razredčenja" kot posledice večkratne delitve celic utišanje endoglina trajalo manj časa, saj bo dejavne le toliko siRNA, kot jo je uspelo priti v celico. V skladu so to raziskavo smo tudi mi pri našem poskusu uporabili manj občutljivo shRNA.

Korak naprej v razvoju uporabe plazmida z shRNA je povečanje njegove tumorske specifičnosti. Obetavne rezultate kaže raziskava Tesič in sod. (2015), pri kateri so namesto plazmida pU6-antiCD105 s konstitutivnim promotorjem U6, ki celicam omogoča

konstantno izražanje, uporabili plazmid pET-antiCD105 s tkivno specifičnim promotorjem. Le-ta je specifičen za endotelijski celični označevalec endotelin-1 (ET-1). Endotelin-1 je vazokonstriktorski peptid, ki je povečano izražen na endotelijskih celicah tumorjev in na melanomskih celicah. Rezultati *in vitro* poskusov na endotelijskih celicah, kot tudi *in vivo* na melanomskih celicah B16F10, predvidevajo podoben terapevtski potencial plazmida pET-antiCD105 v primerjavi s plazmidom pU6-antiCD105. Do podobnih izsledkov je privedla tudi *in vivo* raziskava na celicah mišjega karcinoma dojke TS/A (Štimac in sod., 2015). Rezultati kažejo na dober in hkrati podoben protitumorski učinek genskega elektroprenosa obeh plazmidov. Terapija je vplivala na rast večjih tumorjev in na proliferacijo manjših neožiljenih tumorjev, kar v skladu s predhodno raziskavo še enkrat potrjuje dvojno vlogo utišanja endoglina pri žilno ciljani terapiji – antiangiogeno in žilno razdiralno. Obe raziskavi s plazmidom pET-antiCD105 dajeta dobro osnovo nadaljnjim poskusom, saj je pri omenjenem plazmidu zaradi boljše specifičnosti pričakovati tudi manj neželenih stranskih učinkov terapije.

V nalogi smo želeli z uporabo vektorsko posredovane RNA interferenčne tehnologije, preveriti vpliv utišanja endoglina na sferoide iz tumorskih celic. Glede na objavljene raziskave so bili podobni poskusi do sedaj izvedeni le na endotelijskih celicah. V raziskavi smo uporabili tri različne tumorske celične linije z različnim izražanjem endoglina – B16F1 in B16F10 z visokim izražanjem ter TS/A z nizkim izražanjem endoglina. Glede na protokol smo pripravili 6 različnih eksperimentalnih skupin. Pri kontrolni skupini smo celicam dodali samo vodo, pri skupini pU6-SCR kontrolni plazmid in pri skupini pU6-antiCD105 terapevtski plazmid. Pri poskusnih skupinah EP, pU6-SCR+EP in pU6-antiCD105+EP smo izvedli genski elektroprenos. Skupina EP je vključevala smo celice in vodo. Skupina pU6-SCR+EP je predstavljala negativno kontrolo. Pri slednji smo z uporabo kontrolnega plazmida preverjali, ali do učinka na sferoidih pride že samo zaradi vstopa katerekoli DNA v celice, saj njeno zaporedje ni homologno nobenemu genu v mišjem genomu. Pri terapevtski skupini pU6-antiCD105+EP smo izvedli GET terapevtskega plazmida, ki naj bi glede na izsledke predhodnih raziskav imel sposobnost utišanja endoglina in tako deloval kot možno sredstvo antiangiogene terapije. Naslednji dan po terapiji smo iz celic vseh 6 skupin pripravili sferoide, temu pa je nato sledila njihova časovno ustrezna inkubacija do nadaljnjih meritev. Spremljali smo biološke lastnosti tumorjev po utišanju endoglina, ki smo jih ocenili s testi proliferacije, migracije in invazije.

Za razliko od konvencionalnih dvodimenzionalnih (2D) sistemov celičnih kultur, smo pri našem poskusu uporabili tridimenzionalno (3D) tehniko tvorbe tumorskih sferoidov. Sistemi 3D imajo pred metodo 2D številne prednosti, med drugim potrebo po manjših količinah fetalnega govejega seruma (FBS), odsotnost stika s plastičnimi površinami pa omogoča celicam tvorbo lastnega zunajceličnega matriksa. Posledica tega je, da se celice obeh sistemov ne razlikujejo med seboj le po morfologiji, temveč tudi po občutljivosti rakavih celic na terapijo (Amann in sod., 2014). Vse večje je soglasje, da modeli 3D poustvarjajo ključne aspekte tumorskega mikrookolja in tako v nekaterih primerih zagotavljajo celovitejšo in ustreznejšo biološko informacijo o stanju samih tumorjev, kot celične kulture 2D. To spoznanje je spodbudilo uporabo celičnih kultur 3D kot *in vitro* modela v raziskavah raka (Sung in sod., 2013).

Enkratni genski elektroprenos (GET) plazmida v tumorske celice je imel največji vpliv na rast sferoidov B16F1 in TS/A. Pri obeh celičnih linijah se je rast v prvih treh dneh po terapiji rahlo zmanjševala, pri B16F10 pa je bila končna velikost sferoidov s terapijo sicer statistično značilno manjša od ostalih skupin, vendar so sferoidi kljub temu tekom poskusa počasi rastle.

V skladu s pričakovanji je utišanje endoglina zmanjšalo proliferacijo sferoidov B16F1, za katere je značilna visoka ekspresija omenjene signalne molekule. Zaostanek v rasti pri celični liniji B16F10, ki prav tako izraža endoglin, je bil nekoliko manjši, kar bi lahko pripisali večjemu metastatskemu potencialu teh tumorskih celic. Glede na izsledke predhodnih raziskav, bi boljše rezultate utišanja lahko pričakovali po večkratni uporabi terapije.

Skupina je v predhodnih poskusih pokazala, da je imel GET pU6-SCR, na proliferacijo celic TS/A enak vpliv kot GET terapevtskega plazmida. Neuspešnost terapije so pripisali nizki stopnji izražanja endoglina pri tej celični liniji, nižja rast celic obeh skupin pa naj bi bila posledica vpliva samega transfekcijskega postopka in tega, da so celice TS/A verjetno bolj občutljive nanj (Dolinšek in sod., 2015). V skladu s to raziskavo smo tudi mi pričakovali, da bo terapija na tej celični liniji tudi pri našem poskusu manj uspešna. Izkazalo se je, da je bila proliferacija tudi v našem primeru znižana pri obeh skupinah z GET plazmidov enako kot pri omenjenem poskusu s to razliko, da je bila rast pri terapevtski skupini statistično značilno manjša tudi od skupine z GET kontrolnega plazmida. Nižja proliferacija pri skupini pU6-SCR+EP bi lahko bila posledica citotoksičnosti transfekcije v kombinaciji s povečano dejavnostjo kontrolnega plazmida medtem, ko statistično značilno nižja proliferacija pri skupini pU6-antiCD105+EP zaenkrat ostaja še nepojasnjena.

Vpliv transfekcije na celice so potrdili že Rols in sod. (1998), ki so v svoji raziskavi ugotovili, da imajo krajše dolžine pulzov pri visoki jakosti električnega polja negativen vpliv na viabilnost celic. Tudi prisotnost kontrolnega plazmida je kazala podobne učinke pri predhodnih poskusih, iz česar so sklepali, da ima že sama osnova plazmida brez terapevtskih genov vpliv na biološke lastnosti tumorskih celic. Slednje so v svojih *in vitro* raziskavah pokazali Heller L. in sod. (2013), ki so manjšo rast tumorskih celic po vstopu DNA brez terapevtskih genov povezali s spremembami v celični proliferaciji in metabolizmu, ki nastanejo po vstopu katerekoli DNA v celico. Kot možen dejavnik vpleten v povečan protitumorski učinek kontrolnega plazmida pa so s poskusi *in vivo* predpostavili prisotnost motivov CpG v nukleotidnem zaporedju plazmida, kar naj bi stimuliralo imunski odziv telesa.

Iz slikovnega prikaza rezultatov vseh preučevanih celičnih linij se vidi nekoliko znižana rast pri negativni kontroli in izrazito zmanjšani sferoidi pri terapevtski skupini. Gostejši in manjši sferoidi bi lahko bili posledica povečane adhezije tumorskih celic po utišanju endoglina. Za uspešno metastaziranje je na začetku potrebna sprememba normalne adhezije med samimi celicami in adhezije med celicami ter substratom, kar ima za posledico sprostitev tumorskih celic iz primarne tumorske lokacije. Izgubi medcelične adhezije sledi migracija tumorskih celic v krvnožilni sistem, za kar pa so potrebne učinkovite interakcije celic s substratom (Albelda, 1993). Dolinšek in sod. (2015) so v

svoji raziskavi zmanjšanje migracije in invazije endotelijskih celic razložili, kot možno posledico povečane adhezije, ki je bila rezultat utišanja endoglina, zaradi česar se celice niso mogle ločiti in migrirati na druge lokacije. Za tovrstne zaključke pri naši raziskavi bi bilo na sferoidih teh celičnih linij smiselno izvesti še test adhezije.

Utišanje endoglina z metodo GET je imelo največji učinek na migracijo sferoidov B16F1. Na migracijo celične linije B16F10 terapija ni imela vidnega učinka, saj je bila hitrost migracije glede na kontrolo pri vseh skupinah bolj ali manj podobna. Migracija sferoidov TS/A se je pri negativni kontroli znižala v približno enakem obsegu kot pri terapevtski skupini, kar kaže na to, da je nižja stopnja migracije posledica transfekcijskega postopka. V nadaljnjih poskusih bi lahko skrajšali inkubacijski čas med GET in nastavitvijo poskusa migracije iz treh na dva dni, saj je slabši vpliv terapije na migracijo lahko posledica razgradnje plazmida.

Invazijo smo izvedli samo na celičnih linijah B16F10 in TS/A, saj je za tumorske celice B16F1 značilna nizka stopnja invazije v okoliška tkiva, kar se kaže tako, da celice ne migrirajo v matrigel. Iz primerjave reprezentativnih slik lahko opazimo, da utišanje endoglina na invazijo celic B16F10 nima bistvenega vpliva. Pri sferoidih TS/A je območje invazije zmanjšano pri skupini, ki predstavlja negativno kontrolo, in pri terapevtski skupini, kar bi spet lahko imeli za posledico citotoksičnosti samega transfekcijskega postopka. Zaradi premajhnega števila vzorcev in njihovega nezadostnega odziva na terapijo se za grafični prikaz rezultatov nismo odločili, saj za izsledke nebi mogli trditi, da so statistično značilni. Za izoblikovanje konkretnih zaključkov so na tem področju potrebne še dodatne analize. V nadaljnjih poskusih bi bilo tako smiselno nekoliko optimizirati sam postopek testiranja invazije, saj je bilo precej rezultatov neprimernih za obdelavo. Kot pri migraciji bi bilo zaradi enakih razlogov tudi pri poskusu invazije smotrno skrajšati čas inkubacije na dva dni.

Povzamemo lahko, da utišanje endoglina z genskim elektroprenosom ne inducira samo antiangiogenega in žilno razdiralnega učinka, ampak ima tudi začasen antiproliferativni učinek na tumorske celice. Zatorej lahko sklepamo, da ima terapija anti CD105 vpliv na endotelijske in na tumorske celice. Za potrditev naših rezultatov bi lahko v nadaljnjih poskusih z analizo qRT-PCR preverili stopnjo ekspresije endoglina pred in po transfekciji. Večjega vpliva utišanja endoglina na migracijo in invazijo naši rezultati niso pokazali.

Kljub vsemu nam vsaj začetno zmanjšanje rasti tumorjev ter v manjši meri tudi migracije in invazije tumorskih celic daje osnovo za nadaljnje raziskave. Ob morebitnem dobrem časovnem načrtu uporabe terapije in njene povečane tumorske specifičnosti na račun tumorsko specifičnih promotorjev bi se lahko pojavile dobre možnosti za razvoj nove uspešne metode, vsaj kot del kombiniranega zdravljenja.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 Povzetek

Rak je kompleksna bolezen, ki lahko prizadene tako rekoč vsak organski sistem v telesu. Povezan je z nastankom malignega tumorja, ki ga sestavljajo prekomerno namnožene celice, ki se razlikujejo od normalnih in so zmožne invazije in razsejevanja v druga tkiva. Bolezen poteka v večih stopnjah, ki vključujejo ireverzibilno spremembo s tumorjem povezanega gena (iniciacija), klonsko razširitev mutiranih celic (promocija) in tumorsko progresijo, ki obsega ekspresijo malignega fenotipa in lahko vodi v tvorbo metastaz. Celoten proces imenujemo kancerogeneza in je sprožen z medsebojnim učinkom številnih fizikalnih, kemičnih in bioloških dejavnikov iz okolja, nanj pa vplivajo tudi endogeni vplivi v smislu dedne nagnjenosti, napak pri popravilu mutacij in hormonske dejavnosti. Vsi ti kancerogeni agensi v grobem delujejo na dve veliki skupini genov, in sicer na onkogene in na tumorsupresorske gene. Pomembna prelomnica v rasti tumorja je formacija novih žil oziroma angiogeneza, ki tumorjem omogoča rast preko velikosti 1-2 mm, hkrati pa tumorskim celicam daje možnost prehoda v krvnožilni sistem in s tem metastaziranje v druge dele telesa. Eden najpomembnejših angiogenih aktivatorjev je VEGF, poleg njega pa poznamo tudi številne druge molekule, ki sodelujejo v kompleksni signalni poti tvorbe žil, med katerimi je tudi endoglin. Omenjene molekule so glavna tarča proti žilne terapije, razvoj katere obeta dobre možnosti njene uporabe v praksi, še posebej v kombinaciji s konvencionalnimi oblikami zdravljenja, kot sta kemoterapija in obsevanje. Proti žilna terapija deluje na tumorsko žilje, tako da bodisi zavira nastanek novih žil (antiangiogena terapija) ali pa uničuje že formirane žile (žilno razdiralna terapija). Med novejših tarč antiangiogenega zdravljenja spada tudi endoglin (CD105). Endoglin je transmembranski glikoprotein, ki ima vlogo pomožnega receptorja za transformirajoči rastni dejavnik- β (TGF- β) in je specifično izražen na aktiviranih endotelijskih celicah normalnih tkiv, najdemo pa ga tudi v nekaterih tumorskih celicah. Njegova vloga pri angiogenezi tumorjev obsega proliferacijo, adhezijo in migracijo tumorskih celic, kar kaže na tesno vpletenost v razvoj bolezni, hkrati pa daje dobre obete njegovi uporabi kot tarči pri antiangiogenem zdravljenju. Sprva so raziskave šle predvsem v smer uporabe monoklonskih protiteles proti endoglinu, pri mnogih novejših raziskavah pa dobre rezultate kaže tudi uporaba interference RNA. Pri tej metodi genske terapije gre za uporabo kratkih zaporedij oligonukleotidov, kot sta siRNA in shRNA, ki imajo zmožnost utišanja genov in tako preprečijo nastanek proteina. Ker te molekule težko prehajajo celično membrano, je zelo pomembna izbira ustreznega dostavnega sistema teh učinkovin v tumor. Elektroporacija kot proces, ki povečuje prepustnost celične membrane, se je pri tem izkazala za potencialno uspešno izbiro. Pokazali so, da tovrstno utišanje endoglina vpliva na tumorsko ožilje in s tem zmanjša rast tumorjev, medtem ko učinek terapije na same tumorske celice še ni bil raziskan.

V magistrski nalogi smo želeli preveriti kakšen vpliv ima utišanje endoglina z shRNA na proliferacijo, migracijo in invazijo sferoidov iz tumorskih celic. Uporabili smo melanomski celični liniji B16F1 in B16F10 z visokim in celično linijo mišjega karcinoma dojke TS/A z nizkim izražanjem endoglina. Delali smo z dvema različnima plazmidoma in sicer s pU6-SCR, kateri je predstavljal negativno kontrolo in pU6-antiCD105, ki je predstavljal

terapijo. Pred izvedbo poskusov smo iz trajne kulture bakterij *Escherichia coli* TOP10 izolirali oba plazmidna vektorja, ju redčili do koncentracije 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in do nadaljevanja raziskave hranili v zamrzovalniku. Med seboj smo primerjali 6 skupin; kontrolo, pU6-SCR in pU6-antiCD105 brez GET ter EP, pU6-SCR+EP (negativna kontrola) in pU6-antiCD105+EP (terapevtska skupina) z GET. Prvi dan poskusa smo izvedli genski elektroprenos plazmidne DNA in pripravili 6 omenjenih poskusnih skupin. Po 24 urah inkubacije smo na plošči ULA s 96 vdolbnicami z okroglim dnom iz namnoženih celic naredili sferoide. Rast 8 sferoidov vsake skupine smo začeli spremljati en dan po njihovi tvorbi in nato še sledeča 2 dneva. S testoma migracije in invazije smo začeli dva dneva po pripravi sferoidov. Za poskus migracije smo 4 sferoide vsake skupine prenesli na ploščo prekrito s fibronektinom in jih opazovali po 1, 4, 8, 24 in 48 urah. Za test invazije smo uporabili isto število sferoidov le, da smo jih prekrili z matrigelom in opazovali po 24, 48 in 72 urah. Spremljanje rasti, migracije in invazije je temeljilo na slikanju sferoidov z digitalno kamero DP72, povezano z invertnim mikroskopom IX-70. Njihovo površino in površino migracije smo izmerili s programskim orodjem FIJI, pri čemer smo iz dobljenih vrednosti za migracijo izračunali tudi hitrost migracije celic. S pomočjo istega programa smo naredili tudi montažo reprezentativnih fotografij. Slednja nam je omogočila slikovno primerjavo rasti, migracije in invazije med sferoidi posameznih skupin. Razlike med skupinami smo ocenili s pomočjo enosmerne analize variance (one-way ANOVA) ter Holm-Sidakovim testom za množično primerjavo. Za statistično značilne rezultate smo smatrali tiste s P-vrednostjo manjšo od 0,05. Celotna statistična analiza in grafični prikaz rezultatov sta bila narejena s programom SigmaPlot Software. Potek poskusov je bil na vseh celičnih linijah enak s to razliko, da testa invazije na celicah B16F1 nismo izvajali. Na vsaki celični liniji smo opravili 3 ponovitve celotnega postopka.

Sferoidi posameznih skupin se med seboj razlikujejo po velikosti in obliki. Najmanjši sferoidi pri vseh treh celičnih linijah so bili pri skupini pU6-antiCD105+EP, poleg tega pa so bili tudi bolj kompaktni in manj razvejani. Grafa rasti za celični liniji B16F1 in TS/A kažeta linearno povečevanje rasti vseh skupin razen terapevtske, pri kateri se je rast tekom poskusa zmanjševala in se statistično razlikuje od ostalih skupin. Tudi pri sferoidih B16F10 je rast pri terapevtski skupini statistično značilno manjša od ostalih skupin le, da so se ti sferoidi tekom opazovanja počasi povečevali.

Migracija je opazna kot strnjeno ali nekoliko bolj razredčeno območje celic, ki se ločijo od sferoida v njegovo okolico. Pri celični liniji B16F1 najmanjše območje migracije vidimo pri terapevtski skupini, pri sferoidih B16F10 razlik med površinami migracije posameznih skupin praktično ni, pri sferoidih TS/A pa je migracija zmanjšana in v obliki posameznih celic pri skupinah pU6-SCR+EP in pU6-antiCD105+EP. Pri vseh 3 celičnih linijah so se prve migracije večinoma pojavile že po 4 urah inkubacije. Iz grafa, ki prikazuje hitrost migracije smo razbrali, da je pri celični liniji B16F1 omenjeni parameter najmanjši pri terapevtski skupini in se hkrati tudi statistično značilno razlikuje od ostalih, medtem ko se skupine sferoidov B16F10 med seboj ne razlikujejo. Pri celični liniji TS/A je hitrost migracije sferoidov pU6-SCR+EP in pU6-antiCD105+EP statistično značilno manjša od ostalih skupin, med njima pa statistično značilnih razlik ni.

Invazija je vidna kot strnjeno območje celic, ki se od sferoidov razširja v matrigel. Iz pregleda fotografij smo opazili, da utišanje endoglina nima večjega vpliva na invazijo celic

B16F10. Pri celični liniji TS/A je bilo območje invazije najbolj očitno zmanjšano pri skupinah pU6-SCR+EP in pU6-antiCD105+EP.

Z našim poskusom smo dokazali, da ima utišanje endoglina z genskim elektroprenosom shRNA vpliv na tumorske celice in ne samo na endotelijske, kar so dokazali v preteklih raziskavah. Terapija je imela največji učinek na rast sferoidov, saj se je le-ta pri večini vsaj na začetku zmanjšala. Tudi vpliv na migracijo in invazijo ni popolnoma zanemarljiv in bi ga bilo smiselno vključiti v bodoče raziskave. V luči teh ima terapija dobre možnosti za ustrezen razvoj, ki bi ji v prihodnosti lahko omogočil klinično uporabo pri zdravljenju rakavih obolenj.

6.2 Summary

Cancer is a complex disease that can affect practically any organ system in the body. It is associated with the formation of a malignant tumor, which consists of highly proliferating cells that differ from normal ones and are capable of invading and spreading to other tissues. The disease is carried out in several stages that include an irreversible alteration of a tumor-associated gene (initiation), clonal expansion of mutated cells (promotion) and tumor progression, which comprises expression of the malignant phenotype and can lead to the formation of metastases. The whole process is known as carcinogenesis and it is triggered by the interaction between the number of physical, chemical and biological agents from the environment and by endogenous effects in terms of hereditary predisposition, errors in the mutation repair system and hormonal activity. All of these carcinogenic agents broadly have an impact on two large groups of genes, namely on oncogenes and tumor suppressor genes. An important turning point in the growth of tumors is new blood vessel formation or angiogenesis. It enables tumors to grow beyond the size of 1-2 mm and at the same time gives tumor cells the possibility of entering the circulatory system and thus metastasizing to other parts of the body. One of the key angiogenic activators is vascular endothelial growth factor (VEGF), beside which there are also numerous other molecules involved in the signaling pathway of blood vessel formation, including endoglin. These molecules are the main target of antivascular therapy, development of which shows good possibilities of its practical use, especially in combination with conventional therapies, such as chemotherapy and irradiation. Antivascular therapy acts on tumor blood vessels so that it either inhibits the establishment of new blood vessels (antiangiogenic therapy) or destroys the already formed blood vessels (vascular disrupting therapy). Among the most recent targets of antiangiogenic treatment is also endoglin (CD105). Endoglin is a transmembrane glycoprotein, which has a role of an auxiliary receptor for transforming growth factor- β (TGF- β), and is specifically expressed on activated endothelial cells of normal tissues as well as in some tumor cells. Its role in the angiogenesis of tumors comprises proliferation, adhesion and migration of endothelial cells, suggesting a close involvement in the development of the disease, while giving a good outlook to its use as a target for antiangiogenic treatment. Initially, the research went mainly in the direction of the use of monoclonal antibodies against endoglin. However, in many recent studies, the use of RNA interference also showed antitumor effect. This method of gene therapy involves the use of short oligonucleotide sequences, such as siRNA or shRNA, which have the ability to silence a particular gene at the mRNA level and thus prevent the formation of a certain protein. Because these molecules are unable to cross the cell membrane, it is very important to choose an appropriate delivery system of these agents into the tumor. Electroporation as a process that increases the permeability of cell membranes, has shown to be a potentially successful selection. It has been demonstrated that such silencing of endoglin has an effect on tumor blood vessels, thereby reducing the growth of tumors, while the effect of the therapy on the tumor cells themselves has not yet been investigated.

In the master thesis, we wanted to verify the effect of shRNA against endoglin on proliferation, migration and invasion of tumor cells. We used B16F1 and B16F10 melanoma cell lines with high and murine mammary adenocarcinoma cells TS/A with low endoglin expression. We used two different plasmids, namely pU6-SCR, which

represented the negative control plasmid and pU6-antiCD105, which represented the therapeutic plasmid. Before performing the experiment, we isolated both plasmids from a permanent culture of *Escherichia coli* TOP10 bacteria. We diluted the plasmids to a concentration of 1 µg/µl and stored them in the freezer until the continuation of our research. We compared six groups: Control, pU6-SCR and pU6-antiCD105 without electroporation and EP (electric pulses only), pU6-SCR+EP (negative control) and pU6-antiCD105+EP (therapeutic group) with electroporation. On the first day of the experiment, we performed gene electrotransfer of the plasmid DNA and prepared aforementioned six experimental groups. After 24 hours of incubation, we made spheroids from the cells in a 96-well ULA plate with round bottoms. We started monitoring proliferation of 8 spheroids from each treatment, one day after their formation and then the following 2 days. The migration and invasion assays began 2 days after the formation of spheroids. For the migration test, we transferred 4 spheroids of each group to a plate coated with fibronectin and examined them after 1, 4, 8, 24 and 48 hours. For the invasion test, we used the same number of spheroids, only that we covered them with Matrigel and examined them after 24, 48 and 72 hours. Proliferation, migration and invasion monitoring was based on capturing images of the spheroids with a DP72 digital camera, connected to the IX-70 inverted microscope. We measured the proliferation and migration area with FIJI software tools. From the values regarding migration of cells from spheroids, the migration rate of the cells was calculated. Using the same program, we made a montage of representative images, which enabled us to visually compare proliferation, migration and invasion of the spheroids between various treatments. The differences between the experimental groups were estimated by one-way analysis of variance (one-way ANOVA) and Holm-Sidak test for multiple comparison. Results with a P-value of less than 0,05 were considered statistically significant. The overall statistical analysis and graphical display of the results were made with SigmaPlot Software. In all cell lines the workflow of the experiments was equal, the only difference was, that the invasion assay on B16F1 cells was not performed.

Spheroids from individual treatments differed from each other in size and shape. The smallest of all three cell lines were pU6-antiCD105+EP spheroids. In addition to that, they looked less branched and their cell density appeared to be higher. Our results indicated a linear increase in growth of B16F1 and TS/A spheroids in all groups except in the therapeutic one, in which growth has declined over the course of the experiment and was statistically different from other groups. In B16F10 cells, the proliferation of the spheroids from the treatment group was also statistically significantly lower than in the other groups, except that these spheroids had during the observation slowly grown.

Migration was visible as a compact or slightly diluted area of cells, which separated from the spheroid into its surroundings. The smallest migration area in B16F1 spheroids was seen in the treatment group, in B16F10 spheroids there was practically no difference between individual groups and in the TS/A cells the migration was reduced and in the form of individual cells in pU6-SCR+EP and pU6-antiCD105+EP experimental groups. In all three cell lines, the first migrations mostly occurred as early as after 4 hours of incubation. From the graph showing the migration rate of B16F1 spheroids, it is evident that the aforementioned parameter is the smallest in the therapeutic treatment and statistically significantly different from the other groups, while the B16F10 spheroids do not differ

from each other. The migration rate in pU6-SCR+EP and pU6-antiCD105+EP groups of TS/A cells were significantly lower than in other groups, while between them there were no statistically significant differences.

Invasion was visible as a compact area of cells, which extended from the spheroids into the Matrigel. From the examination of the images, we found that silencing of endoglin did not have a significant impact on the invasion of B16F10 cells. In the case of TS/A spheroids, the area of the invasion was most notably decreased in pU6-SCR+EP and pU6-antiCD105+EP experimental groups.

Our study proves that silencing of endoglin with gene electrotransfer of shRNA, effects the tumor cells and not only the tumor blood vessels as shown in previous researches. The therapy had a maximum effect on the proliferation of the spheroids. The impact on the migration and invasion was also not completely negligible and should be included in future research. Therefore, the therapy has a good chance for further development, which would enable its clinical use in the treatment of cancer in the future.

7 VIRI

- Albelda S. M. 1993. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Journal of Technical Methods and Pathology*, 68, 1: 4-17
- Al-Husein B., Abdalla M., Trepte M., DeRemer D.L., Somanath P.R. 2012. Antiangiogenic therapy for cancer: An update. *Pharmacotherapy*, 32, 12: 1095-1111
- Amann A., Zwierzina M., Gamerith G., Bitsche M., Huber J.M., Vogel G.F., Blumer M., Koeck S., Pechriggl E.J., Kelm J.M., Hilbe W., Zwierzina H. 2014. Development of an Innovative 3D Cell Culture System to Study Tumour - Stroma Interactions in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *PLoS ONE*, 9, 3: e92511. doi: 10.1371/journal.pone.0092511
- Balza E., Castellani P., Zijlstra A., Neri D., Zardi L., Siri A. 2001. Lack of specificity of endoglin expression for tumor blood vessels. *International Journal of Cancer*, 94: 579-585
- Blaese M., Rosenberg S.A., Aebersold P., Cornetta K., Kasid A., Morgan R.A., Moen R., Karson E.M., Lotze M.T., Yang J.C., Topalian S.L., Merino M.J., Culver K., Miller D., Anderson W.F. 1990. Gene Transfer into Humans - Immunotherapy of Patients with Advanced Melanoma, Using Tumor-Infiltrating Lymphocytes Modified by Retroviral Gene Transduction. *The New England Journal of Medicine*, 323: 570-578
- Bozzuto G., Ruggieri P., Molinari A. 2010. Molecular aspects of tumor cell migration and invasion. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 46, 1: 66-80
- Bravo-Cordero J.J., Hodgson L., Condeelis J. 2012. Directed cell invasion and migration during metastasis. *Current Opinion in Cell Biology*, 24: 277-283
- Chabot S., Pelofy S., Paganin-Gioanni A., Teissie J., Golzio M. 2011. Electrotransfer of RNAi-based Oligonucleotides for Oncology. *Anticancer Research*, 31: 4083-4090
- Čemažar M. 2013. Novi načini zdravljenja. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 77 str.
- Čemažar M., Jarm T., Serša G. 2010. Cancer Electrogene Therapy with Interleukin-12. *Current Gene Therapy*, 10, 4: 300-311
- Čemažar M., Golzio M., Serša G., Escoffre J., Coer A., Vidic S., Teissie J. 2012. Hyaluronidase and Collagenase Increase the Transfection Efficiency of Gene Electrotransfer in Various Murine Tumors. *Human gene therapy*, 23: 128-137
- Ćirić E. in Serša G. 2010. Radiotherapy in combination with vascular-targeted therapies. *Radiology and Oncology*, 44, 2: 66-78
- Dallas N.A., Samuel S., Xia L., Fan F., Gray M.J., Lim S.J., Ellis L.M. 2008. Endoglin (CD105): A Marker of Tumor Vasculature and Potential Target for Therapy. *Clinical Cancer Research*, 14, 7: 1931-1937

- Daud A.I., DeConti R.C., Andrews S., Urbas P., Riker A.I., Sondak V.K., Munster P.N., Sullivan D.M., Ugen K.E., Messina J.L., Heller R. 2008. Phase I Trial of Interleukin-12 Plasmid Electroporation in Patients With Metastatic Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 26, 36: 5896-5903
- Davis D.W., Herbst R.S., Abbruzzese J.L. 2008. *Antiangiogenic Cancer Therapy. V: Strategies to Prolong the Nonangiogenic Dormant State of Human Cancer.* Folkman J., Naumov G.N. Florida, Taylor & Francis Group: 3-21
- Davis D.W., Herbst R.S., Abbruzzese J.L. 2008. *Antiangiogenic Cancer Therapy. V: Angiogenesis in Solid Tumors.* Jain R.K., Duda D.G. Florida, Taylor & Francis Group: 43-90
- Davis D.W., Herbst R.S., Abbruzzese J.L. 2008. *Antiangiogenic Cancer Therapy. V: Vascular Disrupting Agents.* Chaplin D.J., Dougherty G.J., Siemann D.W. Florida, Taylor & Francis Group: 329-375
- DeVita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A. 2011. *Cancer - Principles & Practice. V: The Cancer Genome.* Samuels Y., Bardelli A., Lopez-Otin C. 9. izd. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 2-22
- Dolinšek T., Markelc B., Serša G., Čoer A., Štimac M., Lavrenčak J., Brožič A., Kranjc S., Čemažar M. 2013. Multiple Delivery of siRNA against Endoglin into Murine Mammary Adenocarcinoma Prevents Angiogenesis and Delays Tumor Growth. *PLoS ONE*, 8, 3: e58723. doi:10.1371/journal.pone.0058723
- Dolinšek T., Markelc B., Bošnjak M., Blaguš T., Prosen L., Kranjc S., Štimac M., Lamprecht U., Serša G., Čemažar M. 2015. Endoglin Silencing has Significant Antitumor Effect on Murine Mammary Adenocarcinoma Mediated by Vascular Targeted Effect. *Current Gene Therapy*, 15, 3: 228-244
- Faurie C., Reberšek M., Golzio M., Kandušer M., Escoffre J., Pavlin M., Teissie J., Miklavčič D., Rols M. 2010. Electro-mediated gene transfer and expression are controlled by the life-time of DNA/membrane complex formation. *The Journal of Gene Medicine*, 12: 117-125
- Folkman J., Long D.M., Becker F.F. 1963. Growth and metastasis of tumor in organ culture. *Cancer*, 16: 453-467
- Folkman J., Merler E., Abernathy C., Williams G. 1971. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *The Journal of Experimental Medicine*, 133, 2: 275-288
- Folkman J. in Shing Y. 1992. Angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 16: 10931-10934
- Fonsatti E., Nicolay H.J.M., Altomonte M., Covre A., Maio M. 2010. Targeting cancer vasculature via endoglin/CD105: a novel antibody-based diagnostic and therapeutic strategy in solid tumours. *Cardiovascular Research*, 86: 12-19

- Friedl P. in Alexander S. 2011. Cancer Invasion and the Microenvironment: Plasticity and Reciprocity. *Cell*, 147: 992-1009
- Gligorijevic B., Wyckoff J., Yamaguchi H., Wang Y., Roussos E.T., Condeelis J. 2012. N-WASP-mediated invadopodium formation is involved in intravasation and lung metastasis of mammary tumors. *Journal of Cell Science*, 125: 724–734
- Haberl S., Miklavčič D., Serša G., Frey W., Rubinsky B. 2013. *IEEE Electrical Insulation Magazine*, 29, 1: 29-37
- Hanahan D. in Weinberg R.A. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144, 5: 646-674
- Harris Adrian L. 1997. Antiangiogenesis for cancer therapy. *Lancet*, 349 (suppl II): 13-15
- Hayes A.J., Li L.Y., Lippman M.E. 2000. Antivascular therapy: a new approach to cancer treatment. *The Western Journal of Medicine*, 172: 39-42
- Heller L., Todorović V., Čemažar M. 2013. Electrotransfer of single-stranded or double-stranded DNA induces complete regression of palpable B16F10 mouse melanomas. *Cancer Gene Therapy*, 20, 12: 695-700
- Holland J.F., Frei E. 2003. *Cancer Medicine. V: Cardinal Manifestations of Cancer.* Holland J.F. 6. izd. London, B.C. Decker Inc.: 3-5
- Holland J.F., Frei E. 2003. *Cancer Medicine. V: Invasion and Metastases.* Kohn E.C, Liotta L.A. 6. izd. London, B.C. Decker Inc.: 151-159
- Holland J.F., Frei E. 2003. *Cancer Medicine. V: Chemical Carcinogenesis.* Weston A., Harris C.C. 6. izd. London, B.C. Decker Inc.: 267-278
- Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D. 2011. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61: 69-90
- Kamenšek U. in Serša G. 2008. Targeted gene therapy in radiotherapy. *Radiology and Oncology*, 42, 3: 115-35.
- Kotnik T., Kramar P., Pucihar G., Miklavčič D., Tarek M. 2012. Cell Membrane Electroporation - Part 1: The Phenomenon. *IEEE Electrical Insulation Magazine*, 28, 5: 14-23
- Lage H. 2005. Potential applications of RNA interference technology in the treatment of cancer. *Future Oncology*, 1, 1: 103-113
- Lebrin F., Goumans M., Jonker L., Carvalho R.L.C., Valdimarsdottir G., Thorikay M., Mummery C., Arthur H.M., ten Dijke P. 2004. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF- β /ALK1 signal transduction. *The EMBO Journal*, 23: 4018-4028

- Li D.Y., Sorensen L.K., Brooke B.S., Urness L.D., Davis E.C., Taylor D.G., Boak B.B., Wendel D.P. 1999. Defective Angiogenesis in Mice Lacking Endoglin. *Science*, 284, 5419: 1534-1537
- Li F. in Mahato R.I. 2011. RNA Interference for improving the Outcome of Islet Transplantation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 1-2: 47-68
- Nanni P., de Giovanni C., Lollini P.L., Nicoletti G., Prodi G. 1983. TS/A: a new metastasizing cell line from a BALB/c spontaneous mammary adenocarcinoma. *Clinical & Experimental Metastasis*, 1, 4: 373-80
- Nassiri F., Cusimano M.D., Scheithauer B.W., Rotondo F., Fazio A., Yousef G.M., Syro L.V., Kovacs K., Lloyd R.V. 2011. Endoglin (CD105): A Review of its Role in Angiogenesis and Tumor Diagnosis, Progression and Therapy. *Anticancer Research*, 31: 2283-2290
- Neri D., Ahlskog J., Paganelli G. 2006. Vascular tumor targeting. *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 50: 296-309
- Nishida N., Yano H., Nishida T., Kamura T., Kojiro M. 2006. Angiogenesis in cancer. *Vascular Health and Risk Management*, 2, 3: 213-219
- Novaković S. in sod (53 avtorjev). 2009. Onkologija: raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka. V: Molekularni mehanizmi nastanka raka-karcinogeneza. Novaković S. 1. izd. Ljubljana, Mladinska knjiga: 24-35
- Novaković S. in sod (53 avtorjev). 2009. Onkologija: raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka. V: Onkološka epidemiologija. Zadnik V., Primic Žakelj M. 1. izd. Ljubljana, Mladinska knjiga: 42-49
- Onkološki inštitut Ljubljana (2015), Vrste raka.
http://www.onko-i.si/za_javnost_in_bolnike/vrste_raka/ (19.11.2015)
- Paganin-Gioanni A., Bellard E., Escoffre J.M., Rols M.P., Teissie J., Golzio M. 2011. Direct visualization at the single-cell level of siRNA electrotransfer into cancer cells. *PNAS*, 108, 26: 10443-10447
- Perez-Gomez E., del Castillo G., Santibáñez J.F., López-Novoa J.M., Bernabéu C., Quintanilla M. 2010. The Role of the TGF- β Coreceptor Endoglin in Cancer. *The Scientific World Journal*, 10: 2367-2384
- Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije. 2013. Rak v Sloveniji 2010. Onkološki inštitut, Ljubljana: 96 str.
http://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/dokumenti/RRS/LP_2010.pdf
(3.4.2015)
- Rols M.P. in Teissie J. 1998. Electroporation of Mammalian Cells to Macromolecules: Control by Pulse Duration. *Biophysical Journal*, 75: 1415-423

- Rosazza C., Escoffre J., Zumbusch A., Rols M. 2011. The Actin Cytoskeleton Has an Active Role in the Electrotransfer of Plasmid DNA in Mammalian Cells. *Molecular Therapy*, 19, 5: 913-921
- Rosazza C., Buntz A., Rieß T., Wöll D., Zumbusch A., Rols M. 2013. Intracellular Tracking of Single-plasmid DNA Particles After Delivery by Electroporation. *Molecular Therapy*, 21, 12: 2217-2226
- Rosen L.S., Hurwitz H.I., Wong M.K., Goldman J., Mendelson D.S., Figg W.D., Spencer S., Adams B.J., Alvarez D., Seon B.K., Theuer C.P., Leigh B.R., Gordon M.S. 2012. A Phase I First-in-Human Study of TRC105 (Anti Endoglin Antibody) in Patients with Advanced Cancer. *Clinical Cancer Research*, 18: 4820-9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0098
- Rosen L.S., Gordon M.S., Robert F., Matei D.E. 2014. Endoglin for Targeted Cancer Treatment. *Current Oncology Reports*, 16: 365. doi: 10.1007/s11912-013-0365-x
- Serša G. 2013. *Terapevtski pristopi v onkologiji*. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 36 str.
- Sherman H., Pardo P., Upton T. 2008. Cell Migration, Chemotaxis and Invasion Assay Protocol. Corning Life Sciences, Lowell: 10 str.
https://www.corning.com/media/worldwide/cls/documents/an_Chemotaxis_protocol.pdf (7.6.2015)
- Sung K.E., Su X., Berthier E., Pehlke C., Friedl A., Beebe D.J. 2013. Understanding the Impact of 2D and 3D Fibroblast Cultures on In Vitro Breast Cancer Models. *PLoS ONE*, 8, 10: e76373. doi:10.1371/journal.pone.0076373
- Sutherland R.M., McCredie J.A., Inch W.R. 1971. Growth of Multicell Spheroids in Tissue Culture as a Model of Nodular Carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*, 46, 1: 113-120
- Štimac M., Dolinšek T., Lampreht U., Čemažar M., Serša G. 2015. Gene Electrotransfer of Plasmid with Tissue Specific Promoter Encoding shRNA against Endoglin Exerts Antitumor Efficacy against Murine TS/A Tumors by Vascular Targeted Effects. *PLoS ONE*, 10, 4: e0124913. doi: 10.1371/journal.pone.0124913
- Tamzali Y., Couderc B., Rols M.P., Golzio M., Teissie J. 2007. Equine Cutaneous Tumors Treatment by Electro-chemo-immuno-geno-therapy. 11th Mediterranean Conference on Medical and Biomedical Engineering and Computing, Ljubljana, 26. - 30. junij 2007. Jarm T., Kramar P., Županič A. (ur.). IFMBE Proceedings, Volume 16/1: 630
- ten Dijke P., Goumans M., Pardali E. 2008. Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis*, 11: 79-89
- Tesič N., Kamenšek U., Serša G., Kranjc S., Štimac M., Lampreht U., Preat V., Vandermeulen G., Butinar M., Turk B., Čemažar M. 2015. Endoglin (CD105) Silencing Mediated by shRNA Under the Control of Endothelin-1 Promoter for

Targeted Gene Therapy of Melanoma. *Molecular Therapy – Nucleic Acids*, 4: e239.
doi:10.1038/mtna.2015.12

Titomirov A.V., Sukharev S., Kistanova E. 1991. In vivo electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA. *Biochimica et Biophysica Acta – Gene Structure and Expression*, 1008, 1: 131-134

Vinci M., Gowan S., Boxall F., Patterson L., Zimmermann M., Court W., Lomas C., Mendiola M., Hardisson D., Eccles S.A. 2012. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biology*, 10: 29 str.

Wong T. in Neumann E. 1982. Electric field mediated gene transfer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 107, 2: 584-587

Yarmush M.L., Golberg A., Serša G., Kotnik T., Miklavčič D. 2014. Electroporation-Based Technologies for Medicine: Principles, Applications, and Challenges. *The Annual Review of Biomedical Engineering*, 16: 295-320

ZAHVALA

Hvala mentorici prof. dr. Maji Čemažar, da mi je omogočila izvedbo magistrske naloge na področju, ki me je vedno zanimalo. Hvala za vse koristne nasvete pri izvedbi poskusov in sledečemu pisanju naloge, skratka za vso pomoč tekom celotnega procesa.

Hvala predsedniku komisije prof. dr. Urošu Petroviču in recenzentu prof. dr. Gregorju Serši, da sta bila po zamenjavi prejšnjih članov komisije, pripravljena prevzeti to funkcijo in sta hitro in kakovostno opravila svoje delo.

Zahvala gre tudi delovnim mentoricama dr. Tanji Dolinšek in dr. Lari Prosen, za vso pozitivnost, pomoč in uporabne nasvete pri laboratorijskem delu, prav tako pa tudi celotnemu kolektivu Oddelka za eksperimentalno onkologijo na Onkološkem inštitutu Ljubljana za prijaznost in prijetno delovno okolje.

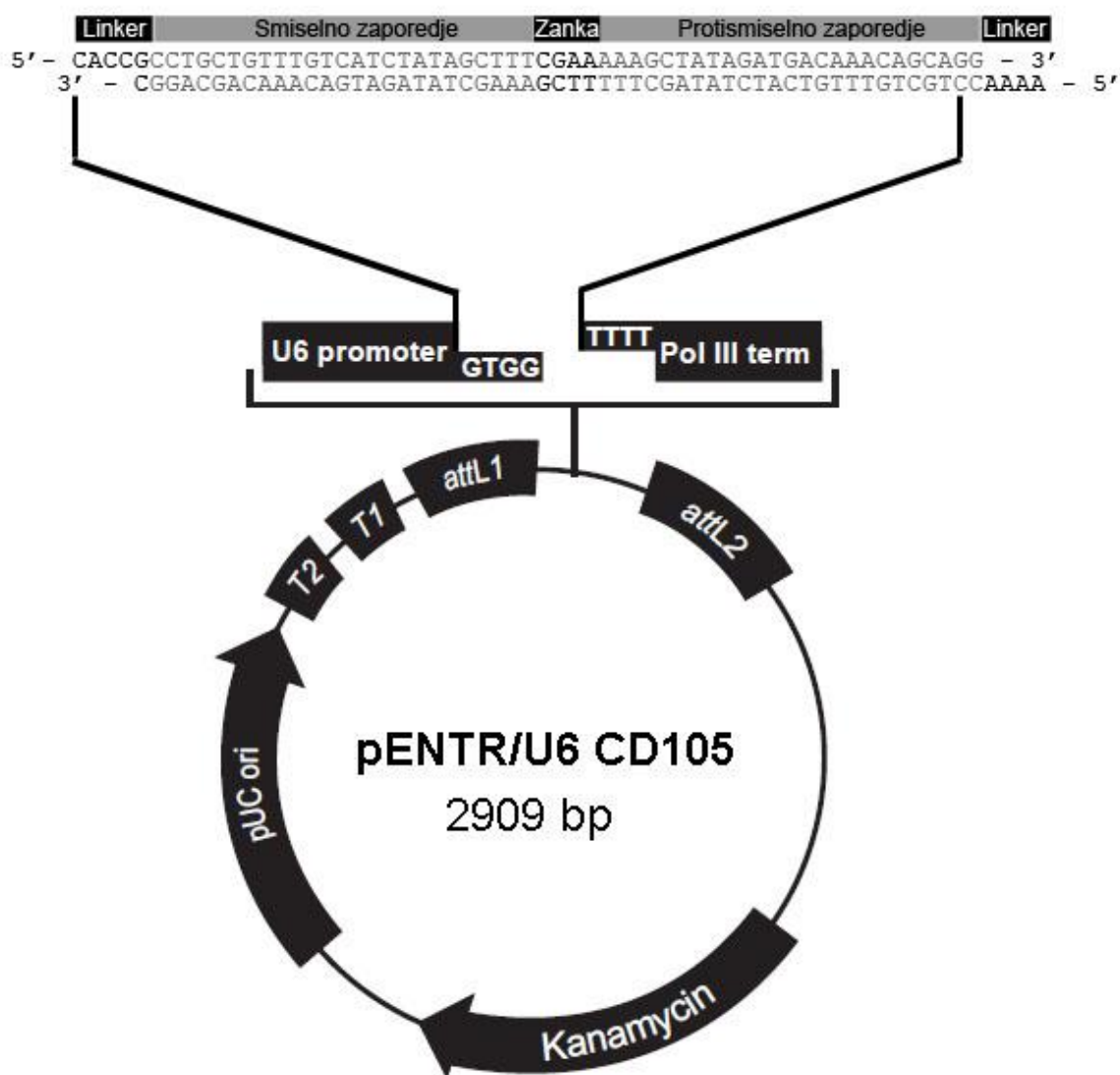
Hvala kolegicam in kolegom biologom za vse lepe trenutke tekom celega študija. Poleg odkrivanja skrivnosti, ki jih s seboj nosi znanost o življenju, mi je študij omogočil tudi križanje poti z mnogimi ljudmi, ki so že pomemben del mojega življenja in verjamem, da bodo ostali tudi v prihodnosti.

Nenazadnje hvala tudi mojim ožjim družinskim članom, predvsem mami, očetu in sestri za kakršno koli podporo skozi celoten študij, čeprav ni bilo vedno lahko. Hvala za vse vzpodbudne besede in da v meni vidite tisto nekaj, kar morda sama včasih težko najdem.

PRILOGE

Priloga A

Shematski prikaz plazmidne DNA, ki kodira shRNA proti endoglinu (pU6-antiCD105). Okrajšave: U6 promotor (U6 promotor za humano polimerazo III), Pol III term (terminator RNA polimeraze III), T1 in T2 (rrnB T1 in T2 terminatorja transkripcije), attL1 in attL2 (rekombinacijske sekvence pridobljene iz bakteriofaga λ), pUC ori (mesto začetka podvojevanja pUC), Kanamycin (gen za odpornost proti kanamicinu).



Priloga B

Shematski prikaz plazmidne DNA, ki je predstavljala negativno kontrolo (pU6-SCR). Okrajšave: U6 promotor (U6 promotor za humano polimerazo III), Pol III term (terminator RNA polimeraze III), T1 in T2 (rrnB T1 in T2 terminatorja transkripcije), attL1 in attL2 (rekombinacijske sekvence pridobljene iz bakteriofaga λ), pUC ori (mesto začetka podvojevanja pUC), Kanamycin (gen za odpornost proti kanamicinu).

