

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Tina STEPIŠNIK

**PRIMERJAVA IZRAŽANJA RAZLIČNIH OBLIK
ERITROPOETINSKEGA RECEPTORJA PRI TUMORSKI IN
NORMALNI CELIČNI LINIJI DOJKE MED AKUTNO IN KRONIČNO
IZPOSTAVITVIJO ERITROPOETINU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij Biologije

**COMPARISON OF EXPRESSION OF DIFFERENT
ERYTHROPOIETIN RECEPTOR FORMS IN TUMOR AND NORMAL
BREAST CELL LINES AFTER ACUTE AND CHRONIC
ERYTHROPOIETIN TREATMENT**

GRADUATION THESIS
University studies of Biology

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo v celičnem laboratoriju raziskovalnega odseka za Molekularne in biomedicinske znanosti na Inštitutu Jožef Stefan ter v laboratorijih Medicinskega centra za molekularno biologijo in Centra za funkcionalno genomiko in biočipe na Medicinski fakulteti v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je potrdila temo in naslov diplomskega dela ter za mentorico imenovala prof. dr. Kristino Sepčić, za somentorico asist. dr. Sabino Berne in za recenzenta prof. dr. Gregorja Anderluha.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Gregor ZUPANČIČ

Član: prof. dr. Gregor ANDERLUH

Članica: prof. dr. Kristina SEPČIĆ

Članica asist. dr. Sabina BERNE

Datum zagovora: 29. maj 2012

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Tina STEPIŠNIK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	618.19-006:6:616.155.194(043.2)=163.6
KG	rak dojke/anemija/eritropoetin/rekombinantni humani eritropoetin/eritropoetinski receptor/proliferacija/izražanje genov/tumorska celična linija/normalna celična linija
AV	STEPIŠNIK, Tina
SA	SEPČIĆ, Kristina (mentorica)/BERNE, Sabina (somentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2012
IN	PRIMERJAVA IZRAŽANJA RAZLIČNIH OBLIK ERITROPOETINSKEGA RECEPTORJA PRI TUMORSKI IN NORMALNI CELIČNI LINIJI DOJKE MED AKUTNO IN KRONIČNO IZPOSTAVITVJO ERITROPOETINU
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij biologije)
OP	XV, 56 str., 21 pregl., 29 sl., 3 pril., 100 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	<p>Eritropoetin (Epo) je glikoprotein iz skupine citokinov. Kot odgovor na hipoksijo tkiva nastaja predvsem v ledvicah in tudi v jetrih. V kostnem mozgu deluje na prednike eritroidne celice in na prekurzorje eritrocitov (Erc) ter nadzira njihovo proliferacijo, diferenciacijo in zorenje. Ob vezavi Epo na eritropoetinski receptor (EpoR) na površini celic se sproži natančno uravnavan sistem signalnih poti. Epo in EpoR se izražata tudi v mnogih nekrvotvornih tkivih in pri mnogih tipih raka ter rakavih celičnih obolenjih, kjer njuna funkcija še vedno ni pojasnjena.</p> <p>Rekombinantni humani Epo (rHuEpo) se uporablja za dvig ravni hemoglobina pri bolnikih z anemijo. Anemije je lahko med drugim tudi posledica rasti tumorja v kostnem mozgu in zdravljenja raka s kemoterapijo oziroma obsevanjem. Zdravljenje z rHuEpo odpravi anemijo, zmanjša potrebo po transfuziji in izboljša bolnikovo počutje. Poleg tega rHuEpo izboljša uspešnost kemo- in radioterapije zaradi boljše prekravljjenosti in preskrbe tumorja s kisikom. Toda po drugi strani prisotnost Epo in njegovega receptorja (EpoR) pri mnogih tipih raka in rakastih celičnih linijah postavlja pod vprašaj terapevtske učinke rHuEpo pri bolnikih z rakom. Nakazuje se namreč možnost, da rHuEpo vpliva na hitrejšo rast tumorja, pospešuje njegovo angiogenezo in varuje rakaste celice pred apoptozo. Nekatere nedavne klinične študije sto pokazali slabše preživetje bolnikov, pri katerih je bila kemo- in radioterapija kombinirana z rHuEpo, v primerjavi z bolniki, ki so prejemali samo transfuzije krv. Nasprotijoče si ugotovitve o učinkih rHuEpo v prekliničnih in kliničnih študijah vsekakor terjajo razjasnitve mehanizma delovanja rHuEpo za odgovorno ravnanje med zdravljenjem.</p> <p>Naš namen je bil preučiti vpliv rekombinantnega humanega eritropoetina na izražanje eritropoetinskega receptorja in proliferacijo v tumorski in normalni celični liniji dojke. Pri obeh celičnih linijah, tumorski MCF-7 in normalni MCF-10A smo dokazali vpliv rHuEpo, tako na proliferacijo celic kot na izražanje tarčnih genov za eritropoetinske receptorje EPOR1, EPOR2 in EPOR.</p> <p>Naša temeljna hipoteza je predvidevala, da deluje eritropoetin različno na proliferacijo tumorskih in normalnih celic dojke. Vendar pa lahko na podlagi dobljenih rezultov testov MTT sklepamo, da je proliferativni učinek po akutni izpostavitvi rHuEpo pri obeh celičnih linijah podoben, medtem ko se celice po kroničnem tretiranju z rHuEpo odzivajo drugače kot po akutnem. S polimerazno reakcijo v realnem času smo dokazali tudi našo hipotezo, da je izražanje gena za eritropoetinski receptor različno pri tumorski in normalni celični liniji dojke. Po kronični in akutni izpostavitvi celic MCF-7 hormonu rHuEpo se izražanje eritropoetinskega receptorja zniža, medtem ko pri akutno tretiranih celicah MCF-10A ni statistično značilnih razlik v izražanju tarčnih genov. Razlike v izražanju tarčnih genov so prisotne tudi po kroničnem tretiranju normalnih oz. tumorskih celic po tednih.</p> <p>Vsekakor bi bilo potrebno naše teste zaradi velike variabilnosti (predvsem napake pri številu nasajenih celic, napake pri pipetiranju, pasaže v kateri so bile celice) večkrat ponoviti.</p> <p>Rekombinantni humani eritropoetin ostaja molekula stoletja, ki še vedno čaka, da jo razkrijemo.</p>

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC 618.19-006:6:616.155.194(043.2)=163.6
CX Breast cancer/anemia/erythropoietin/recombinant human erythropoietin/erythropoietin receptor/proliferation/gene expression/tumor cell line/normal cell line
AU STEPIŠNIK, Tina
AA SEPCIĆ, Kristina (supervisor)/BERNE, Sabina (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology
PY 2012
TI COMPARISON OF EXPRESSION OF DIFFERENT ERYTHROPOIETIN RECEPTOR FORMS IN TUMOR AND NORMAL BREAST CELL LINES AFTER ACUTE AND CHRONIC ERYTHROPOIETIN TREATMENT
DT Graduation Thesis (University studies of Biology)
NO XV, 56 p., 21 tab., 29 fig., 3 ann., 100 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Erythropoietin (Epo) is a glycoprotein from the group of cytokines. In response to tissue hypoxia it is produced primarily in the kidneys and in the liver. The glycoprotein erythropoietin is essential for the survival, proliferation and differentiation of the erythrocytic progenitors in the bone marrow. By binding of Epo to the erythropoietin receptor (EpoR) on the cell surface it initiates a carefully-regulated system of signaling pathways. Epo and EpoR are expressed in many nonhematopoietic tissues as well as in many types of cancer and cancer cell diseases, where their function is still unknown.
Recombinant human Epo (rHuEpo) is used to raise the level of hemoglobin in anemic patients. Anemia may also be a result of the growth of tumor in bone marrow and cancer treatment with chemotherapy or radiotherapy. Treatment with rHuEpo eliminates anemia, reduces the need for transfusion and improves patient well-being. In addition, rHuEpo improves performance of chemo- and radiotherapy due to better blood circulation and oxygen supply to the tumor. But on the other hand, in many types of cancer and cancer cell lines, the presence of Epo and its receptor (EpoR) calls into question the therapeutic effects of rHuEpo in patients with cancer. In fact it suggests the possibility that rHuEpo effects on rapid tumor growth, angiogenesis, and protects cancer cells from apoptosis. Some recent clinical studies have shown worse survival in patients who had chemo- and radiotherapy combined with rHuEpo, compared with patients who received blood transfusions only. Contrasting findings on the effects of rHuEpo in preclinical and clinical studies certainly require clarification of the mechanism of rHuEpo for responsible treatment.
Our aim was to examine the effect of recombinant human erythropoietin on expression of erythropoietin receptor and proliferation in tumor and normal breast cell line. In both cell lines, tumor MCF-7 and normal MCF-10A, we demonstrated the impact of rHuEpo on the proliferation as well as on expression of target gene for erythropoietin receptor: EPOR1, EPOR2 and EPOR3. Our basic hypothesis assumed that erythropoietin acts differently on the proliferation of tumor and normal breast cells. However, on the basis of obtained results of MTT tests we suggest that the proliferative effect of rHuEpo is similar in both acute treated cell lines, tumor and normal, but has different effect on chronically treated tumor cell line. With the real time polymerase chain reaction we proved our hypothesis that the gene for erythropoietin receptor expresses differently in tumor and normal breast cell line. The acute and chronic exposure of tumor cells to rHuEpo changes their responsiveness in the level of erythropoietin receptor expression, yet it has no effect on acute treated normal cell line. Differences in level of expression of target genes are present also in chronically treated tumor and normal cell line after weeks of exposure to rHuEpo.
It would be necessary to repeat our tests several times due to high variability (in particular, errors in the number of cells seeded, pipetting errors, passages of the cells).
Recombinant human erythropoietin remains a molecule of the century, still waiting to be disclosed.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XI

1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 RAK	3
2.1.1 <i>Razširjenost raka</i>	3
2.1.2 <i>Nastanek raka – kancerogeneza</i>	3
2.1.3 <i>Vrste tumorjev</i>	4
2.2 ERITROPOEZA IN ANEMIJA	6
2.3 ² ₃ ERITROPOETIN	7
2.3.2 <i>Opis in fiziološka vloga</i>	7
<i>Rekombinantni humani eritropoetin</i>	8
2.5 ² ₄ ERITROPOETINSKI RECEPTOR	9
2.5 ² ₅ MEHANIZEM DELOVANJA EPO-EPOR	11
<i>Aktivacija signalizacije Epo-EpoR</i>	11
<i>Deaktivacija signalizacije Epo-EpoR</i>	13
3.1.1 MATERIAL IN METODE	14
3.1.2	
3.1.3 GOJENJE CELIČNIH KULTUR	14
3.1.4 <i>Kemikalije</i>	14
3.1.5 <i>Celične kulture</i>	14
<i>Odtaljevanje in gojenje celic</i>	15
<i>Tretiranje celic z rekombinantnim humanim eritropoetinom (rHuEpo)</i>	15
<i>Test MTT</i>	16
3.2 MOLEKULARNO BIOLOŠKE METODE	17

Izolacija celokupne RNA	17
Analiza celokupne RNA na Bioanalizatorju 2100	17
Sinteza cDNA	18
3.2.1 Verižna reakcija s polimerazo	18
3.2.2 Agarozna gelska elektroforeza	19
3.2.4 Merjenje izražanja genov s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času	19
3.2.5	
3.2.6 BIOKEMIJSKE METODE	22
3.3.1 Priprava proteinskih lizatov	23
Določanje koncentracije proteinov po Bradfordu	23
3.3.2 REZULTATI	24
4.1 TEST MTT	24
4.2 IZOLACIJA IN ANALIZA CELOKUPNE RNA	26
4.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR)	27
4.4 MERJENJE IZRAŽANJA GENOV S KVANTITATIVNO VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO V REALNEM ČASU	27
4.4.1 Iskanje primernih referenčnih genov za normalizacijo izražanja genov s programom geNorm	27
4.4.2 Učinkovitost pomnoževanja tarčnih genov v celični liniji MCF-7, MCF-10A in kontrolni celokupni RNA	28
4.4.3 Analiza izražanja genov s programom REST 2009	31
4.5 PRIPRAVA PROTEINSKIH VZORCEV ZA ANALIZO NA ČIPIH	38
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	39
5.1.1 RAZPRAVA	39
5.1.2 Test MTT	39
5.1.3 Izolacija in analiza celokupne RNA	40
5.1.4 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	41
5.1.4.1 Iskanje primernih referenčnih genov za normalizacijo izražanja genov s programom geNorm	41
5.1.4.2 Učinkovitost pomnoževanja tarčnih genov v celični liniji MCF-7, MCF-10A in kontrolni celokupni RNA	41
5.1.4.3 Analiza izražanja genov s programom REST 2009	41
5.2 SKLEPI	45
6 POVZETEK	47
7 VIRI	49
7.1 TISKANI VIRI	49

7.2	ELEKTRONSKI VIRI	56
8	ZAHVALA	
9	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Pogoji reakcije PCR za sintezo cDNA	19
Preglednica 2: Začetni oligonukleotidi in, njihove lastnosti	21
Preglednica 3: Pogoji reakcijCR	22
Preglednica 4: Vrednosti povprečnega Ct za posamezne gene pri celični liniji MCF-7 in izračun učinkovitosti izražanja	29
Preglednica 5: Vrednosti povprečnega Ct za posamezne gene pri celični liniji MCF-10A in izračun učinkovitosti izražanja	29
Preglednica 6: Vrednosti povprečnega Ct za posamezne gene pri kontrolni celokupni RNA in izračun učinkovitosti izražanja	30
Preglednica 7: Vrednosti učinkovitosti pomnoževanja tarčnih in referenčnih genov za izračun povprečne vrednosti, ki predstavlja učinkovitost (E)	30
Preglednica 8: Primerjava izražanja tarčnih genov v netretiranih celicah MCF-10A (vzorčna skupina) in celicah MCF-10A, ki so bile šest tednov izpostavljene 5 oz. 50 U rHuEpo/ml (kontrolna skupina)	33
Preglednica 9: Primerjava izražanja tarčnih genov v netretiranih celicah MCF-7 (vzorčna skupina) in celicah, ki so bile šest tednov izpostavljene 5 oz. 50 U rHuEpo/ml (kontrolna skupina)	34
Preglednica 10: Primerjava izražanja tarčnih genov v celicah MCF-10A, ki so bile šest tednov izpostavljene 5 U rHuEpo/ml (kontrolna skupina), in tarčnih genov v kronično tretiranih celicah MCF-10A, ki smo jih vsaka dva tedna izpostavili 50 U rHuEpo/ml (vzorčna skupina)	35
Preglednica 11: Primerjava izražanja tarčnih genov pri celicah MCF-7 po kronični izpostavitvi 5 U rHuEpo za šest tednov in kronično tretiranih celic MCF-7 (kontrolna sk.), ki smo jih vsak teden izpostavili 50 U rHuEpo/ml (vzorčna sk.)	35
Preglednica 12: Razmerje izražanja tarčnih genov kronično izpostavljenih celic MCF-7 za devet tednov 5 U rHuEpo/ml in nato tretiranih s 50 U rHuEpo/ml (vzorčna sk.) za različne čase v primerjavi z akutno tretiranimi celicami MCF-7 (kontrolna sk.)	36
Preglednica 13: Razmerje izražanja tarčnih genov akutno izpostavljenih celic MCF-7 (vzorčna skupina) v primerjavi z akutno tretiranimi celicami MCF-10A (kontrolna skupina) za različne čase	36
Preglednica 14: Razmerje izražanja tarčnih genov kronično izpostavljenih celic MCF-7 po tednih (vzorčna skupina) v primerjavi s kronično tretiranimi celicami MCF-10A po tednih (kontrolna skupina)	37
Preglednica 15: Koncentracija proteinov v proteinskih lizatih celic MCF-7 in MCF-10A akutno tretiranih s 50 U rHuEpo/ml za različne čase	38
Preglednica 16: Koncentracija proteinov v proteinskih lizatih celic MCF-7 kronično tretiranih s 5 U rHuEpo in nato vsak teden 1 paralelka 1-urno tretiranje s 50 U rHuEpo/ml	38
Preglednica 17: Koncentracija proteinov v proteinskih lizatih celic MCF-10A kronično tretiranih s 5 U rHuEpo in nato drugi teden 1 paralelka 1-urno tretiranje s 50 U rHuEpo/ml	38

Preglednica 18: Statistična obdelava rezultatov testa MTT s programom GraphPad Prism
(vpliv rHuEpo na proliferacijo celic MCF-7 in MCF-10A po akutni in kronični
izpostaviti)

Preglednica 19: Celice MCF-7 in MCF-10A: število nacepljenih celic, koncentracija,
čistost (28S/18S) in kakovost (RIN) celokupne RNA v vzorcih

Preglednica 20: Celice MCF-7: število nacepljenih celic, koncentracija, čistost (28S/18S)
in kakovost (RIN) celokupne RNA v vzorcih po tednih tretiranja z rHuEpo

Preglednica 21: Celice MCF-10A: število nacepljenih celic, koncentracija, čistost
(28S/18S) in kakovost (RIN) celokupne RNA v vzorcih po tednih tretiranja z
rHuEpo

KAZALO SLIK

Slika 1: Tarčna tkiva eritropoetina	2
Slika 2: Epigenetski dejavniki	4
Slika 3: Prikaz razvoja benignega in malignega tumorja	5
Slika 4: Prikaz nastanka raka dojke	6
Slika 5: Eritropoeza pod vplivom hormona eritropoetin	6
Slika 6: Kemijska struktura človeškega eritropoetina	8
Slika 7: Biokemična in biološka struktura rHuEpo in nekaterih analogov rHuEpo	8
Slika 8: Shematski prikaz eritropoetinskega receptorja	9
Slika 9: Ilustracija gena za eritropoetinski receptor (EPOR) in alternativne kopije EpoR	10
Slika 10: Hormonsko ter avtokrino in parakrino delovanje Epo	11
Slika 11: Vezava, aktivacija in deaktivacija EPO-EPOR signalne poti	12
Slika 12: 20x povečava celic MCF-10A celic (a) in celic MCF-7 (b)	14
Slika 13: Shematski prikaz tretiranja celic MCF-7 in MCF-10A z rekombinantnim humanim eritropoetinom za izolacijo celokupne RNA in proteinov	16
Slika 14: Pomnoževanje DNA z uporabo fluorescentnega označevalca SYBR Green	20
Slika 15: Shematski prikaz vezavnih mest začetnih oligonukleotidov na mRNA EpoR	21
Slika 16: Absorbanca pri 570 nm v odvisnosti od števila nasajenih celic MCF-7 in inkubacijskega časa	24
Slika 17: Grafični prikaz, za kolikokrat se spremeni število celic v odvisnosti od akutne izpostavitve celic MCF-7 različnim koncentracijam rHuEpo za 24 h, 48 h in 72h	24
Slika 18: Grafični prikaz, za kolikokrat se spremeni število celic v odvisnosti od akutne izpostavitve celic MCF-10A različnim koncentracijam rHuEpo za 24 h in 48 h	25
Slika 19: Grafični prikaz, za kolikokrat se spremeni število celic v odvisnosti od kronične izpostavitve celic MCF-7 5 U rHuEpo/ml za deset tednov in nadaljnjega tretiranja z različnimi koncentracijami rHuEpo za 24 h, 48 h in 72 h	25
Slika 20: Primer elektroferograma kapilarne elektroforeze (Bioanalizator 2100) celokupne RNA	26
Slika 21: Analiza prisotnosti tarčnih in referenčnih genov	27
Slika 22: Povprečna stabilnost izražanja (M) kontrolnih genov v enem od vzorcev	28
Slika 23: Umeritvene krivulje za posamezne gene pri celični liniji MCF-7	28
Slika 24: Umeritvene krivulje za posamezne gene pri celični liniji MCF-10A	29
Slika 25: Umeritvene krivulje za posamezne gene pri kontrolni celokupni RNA	30
Slika 26: Razmerje izražanja genov EPOR1, EPOR2 in EPORT pri celični liniji MCF-10A po akutni izpostavitvi rHuEpo za različne čase	31
Slika 27: Razmerje izražanja genov EPOR1, EPOR2 in EPORT pri celični liniji MCF-7 po akutni izpostavitvi rHuEpo za različne čase	32
Slika 28: Razmerje izražanja genov EPOR1, EPOR2 in EPORT pri celični liniji MCF-7 po kronični izpostavitvi rHuEpo za različne čase	32
Slika 29: Umeritvena krivulja BSA za določanje koncentracije proteinov po Bradfordu	

KAZALO PRILOG

Priloga A: Two-way ANOVA, Bonferroni posttests

Priloga B: Agilent – koncentracija celokupne RNA

Priloga C: Koncentracija proteinov – Bradford

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

%	Odstotek
°C	Stopinj Celzija
18S rRNA	18S podenota ribosomalne RNA
AA	Antibiotik, antimikotik
AK	Aminokislina
A _λ	Absorbanca pri valovni dolžini λ nm
B2M	Beta-2-mikroglobulin
BAD	Bcl-2 antagonist celične smrti
Bcl _{XL}	Transmembranske molekule mitohondrija (ang. B-cell lymphoma – extra large)
β-CR	β-podobni receptorji (ang. β-common receptor)
BFU E	Primitivne matične celice, usmerjene v eritropoezo (ang. burst forming unit erythroid)
BSA	Goveji serumski albumin (ang. bovine serum albumin)
c	Koncentracija
cDNA	Komplementarna DNA, ki nastane z obratno transkripcijo iz mRNA (ang. complementary DNA)
CFU E	male kolonije eritroidnih celic (ang. colony forming units)
C _t	Mejni cikel qPCR, kjer fluorescensa preseže nastavljeni prag
Da	Dalton, enota molekulske mase
DMSO	Dimetilsulfoksid
D-MEM	Dulbeccova modifikacija Eaglovega medija (ang. Dulbecco's modification of Eagle's medium)
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
E	Učinkovitost (ang. efficiency)
EDTA	Etilendiaminotetraocetna kislina
EGF	Epidermalni rastni faktor
EIF4A2	Evkariontski translacijski iniciacijski faktor 4 A, podenota 2 alfa
Epo	Eritropoetin
EpoR	Eritropoetinski receptor
EPOR	Genski zapis za eritropoetinski receptor
Erc	Eritrocit (rdeča krvna celica)
ESAs	Stimulatorji eritropoeze (ang. erythropoiesis-stimulating agents)
F12	Hamov medij za celične kulture
FBS	Fetalni goveji serum (ang. fetal bovin serum)
GADPH	Gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza
G-CSF	Granulocitne kolonije stimulirajoči faktor
GM-CSF	Granulocitne kolonije makrofagov stimulirajoči faktor
Hb	Hemoglobin
HBSS	Hanksova ozmolarna raztopina soli
HC	Hidrokortizon
HEPES	N-2-hidroksietilpirazin-N'-2-etansulfonska kislina
HIF-1 α	S hipoksijo povzročen faktor 1 α
Ht	Hematokrit
IU	Mednarodna enota (ang. international units)
JAK2	Janus tirozinska protein kinaza 2
Log X	Naravni logaritem števila X z osnovo 10
M	Molarna koncentracija (mol/l)
mg	Miligram

min	Minuta
MMC-M	Multipotentna matična celica mieloične vrste
mRNA	Informacijska ribonukleinska kislina
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid formazan
n	Velikost vzorca
N	Dušik
NF-κB	Jedrni faktor κB (kappaB)
NTC	Negativna kontrola (ang. non template control)
O	Kisik
PI3	Fosfoinozitid 3-kinaza (ang. phosphoinositide 3-kinases)
PBS	Izotonični fosfatni pufer za spiranje celic (ang. phosphate buffered saline)
PCR	Verižna reakcija s polimerazo
P (H1)	Verjetnost alternativne hipoteze, da je razlika med vzorcem in kontrolno skupino naključna
PMC	Pluripotentna matična celica
PRCA	Čista aplazija rdečih krvničk (ang. pure red cell aplasia)
qRT-PCR	Kvantitativna analiza izražanja genov z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času
RBC	Rdeče krvničke – eritrociti (ang. red blood cells)
rHuEpo	Rekombinantni humani eritropoetin
RPMI	Ang. Roswell Park Memorial Institute medium
RT-PCR	Obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (ang. reverse transcription and polymerase chain reaction)
SD	Standardna deviacija ali standardni odklon
SDS	Natrijev dodecil sulfat – anionski pufer (ang. Sodium Dodecyl Sulfate)
s	Sekunda
STAT5	Signalni spremjevalec in aktivator transkripcije 5 (ang. signal transducer and activator of transcription 5)
Stratagene	Kontrolna celokupna RNA sestavljena iz celokupnih RNA desetih humanih celičnih linij
TNM	Ang. Primary tumor (T), lymph node (N), distant metastasis (M)
Trc	Trombocit (krvna ploščica)
U	Encimska enota (ang. unit)
UBC	Ubikvitin C
UMC	Usmerjena matična celica
UV	Ultravijolično sevanje
VHL	Von Hippel–Lindau-jev sindrom
WSXWS	Motiv zaporedja Trp-Ser-X-Trp-Ser blizu transmembranske domene EpoR
YWHAZ	Tirozin 3-monooksigenaza/ triptofan 5-monooksigenaza aktivacijski protein, polipeptidna veriga zeta

SLOVARČEK

Avtokrino	Nanašajoč se na povratno regulatorno delovanje hormona na isto endokrino žlezo, ki ga izloča.
CIN-gen	Gen, ki kodira protein, potreben za ohranitev stabilne zgradbe kromosoma, ki je porušena v začetnih fazah karcinogeneze in vodi do nastanka mutacij (ang. chromosome instability gene).
Citokini	Proteini z majhno molekulsko maso, ki delujejo kot posredniki med elementi imunskega sistema.
Diferenciacija celice	Pri delitvi matičnih celic je ena od nastalih celic hčerinska ali predniška celica, ki je bolj specifična ozziroma dozorela v svoji funkciji (bolj diferenciirana). Končno diferenciirana je celica, ki je odgovorna za opravljanje neke naloge v delovanju določenega organa.
Endokrino	Nanašajoč se na izločanje hormonov v krvožilni sistem, po katerem krožijo in vplivajo na delovanje oddaljenih organov.
Epigenetski dejavniki	Okoljski dejavniki.
Encimska enota (U)	Enota, znana tudi kot mednarodna enota za aktivnost encimov.
Epigenetske spremembe	Poškodbe DNA, ki niso ne posledica mutacij ne sprememb zgradbe molekule DNA, kljub temu pa se kažejo v spremenjenem proteinu. Med drugim sem spadajo določene vrste kemijskih reakcij z molekulami DNA in/ali drugimi strukturami v jedru, ki vplivajo na prepisovanje genov v delajoče proteine.
Eritropoetin (Epo)	Glikoproteinski hormon proizveden v jetrih, odgovoren za dozorevanje predniških celic do funkcionalnih eritrocitov.
Eritropoetinski receptor (EpoR)	Receptor na površini predniških eritroidnih celic v kostnem mozgu, ki ob vezavi eritropoetina stimulira predniške eritroidne celice, da se transformirajo v eritrocite.
Imunohistokemija	Uporaba interakcije antiga in protitelesa za histokemične tehnike.
Incidenca	Število vseh na novo ugotovljenih primerov raka v točno določeni populaciji v enem koledarskem letu.
Klon	Skupina enakih celic, ki izvirajo iz iste materinske celice.
Konfluentna kultura	Kultura, v kateri celice prarastejo celotno gojilno površino in so v stiku druga z drugo.
Mednarodna enota (IU)	V farmakologije je mednarodna enota merska enota za količino snovi, ki temelji na biološki aktivnosti ali učinku.
Metastaza	Zasevek rakavega tkiva, ki se je iz primarnega tumorja razširil v druge dele telesa preko krvi ali limfe.
Mikrokapsula	Mikronski delec, zgrajen iz izjemno tanke ene ali več ovojnici in tekočega, plinastega ali trdnega jedra.
Mutacija	Prvotna sprememba ene od aminokislín v zgradbi proteina, ki je posledica spremenjenega gena v molekuli DNA. Širše pa se izraz uporablja za vse prvotne poškodbe DNA, ki so lahko vzrok za nastanek raka.
Neoplazija	Novotvorba, skupek izrojenih celic nekega tkiva, ki se ne ravna po običajnem omejevanju normalne rasti.
Onkogen	Gen, ki je specifično aktiviran ozziroma močno izražen v rakavih celicah in nosi zapis za nastanek proteina, ki povzroča hitrejše deljenje celic in druge značilne lastnosti rakavih celic.
Parakrino	Nanašajoč se na hormone, s katerimi celica vpliva na sosednje celice.
PEGilacija	Kovalentno pripenjanje polietilen glikola (PEG) na lizinske molekule na površini proteina.

Pleiotropizem	Pojav, da en gen vpliva na več vidikov fiziologije ali anatomije.
Pluripotentnost	Sposobnost, da se embrionalne zarodne celice razvijejo v katerokoli diferenciirano celico.
Policitemija	Nenormalno povečanje števila eritrocitov.
Prevalenca	Delež ljudi z določenim znakom ali boleznijo v določeni populaciji ob določenem času.
Promotor	Promotor (spodbujevalec) je nukleotidno zaporedje na 5'-koncu določenega gena, na katerega se vežejo RNA-polimeraza in transkripcijski faktorji, ki vplivajo na proces genskega prepisovanja.
Protoonkogen	Normalen gen iz katerega lahko pod vplivom mutacije ali povišane ekspresije nastane onkogen.
Rak	Bolezen, pri kateri celica ali skupina celic nekontrolirano raste, je invazivna in včasih metastazira.
Supresor	Gen, ki zavre fenotipsko ekspresijo drugega gena, ponavadi mutiranega gena.
Tumor	Izraz za neoplazijo ali trdno lezijo, ki jo tvori nenormalna razrast celic in izgleda kot oteklini.
Tumor-supresorski gen	Gen, ki zdrave celice varuje pred rakavimi spremembami. Zaščita je zaradi znižane aktivnosti tega gena ozziroma proteina v rakavih celicah značilno zmanjšana.

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

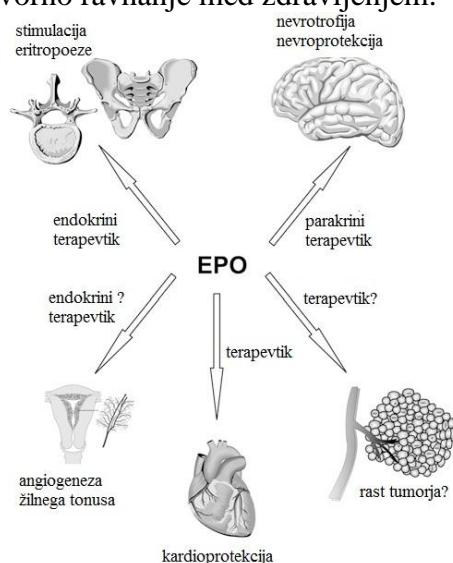
Eritropoetin (Epo) je glikoprotein, ki ga uvrščamo v skupino citokinov (Krantz, 1991; Lin et al., 1996; Wu et al., 1995). Nastaja predvsem v ledvicah kot odgovor na hipoksijo tkiva in v manjši meri tudi v jetrih. Deluje na prednje eritroidne celice in na prekurzorje eritrocitov (Erc) v kostnem mozgu ter nadzira njihovo proliferacijo, diferenciacijo in zorenje. Ob vezavi Epo na eritropoetinski receptor (EpoR) na površini celic, se sproži natančno uravnavan sistem signalnih poti, ki vključujejo fosforilacijo/aktivacijo številnih kinaz in transkripcijskih faktorjev (Ras/MAP in JAK2-STAT kinazno pot, fosfoinozitid 3-kinaza (PI3) in protein kinazo C), ki omogočijo eritropoezo (Konstantinopoulos et al., 2007). Epo deluje avtokrino, parakrino in endokrino. Epo in EpoR sta prisotna tudi v mnogih nekrvotvornih tkivih. Dokazano je, da ima Epo zaščitno vlogo v centralnem živčnem sistemu, celicah srca, prebavnega trakta, reprodukcijskih organov in endotelija (Grasso, 2004; Um et al., 2007; Ehrenreich et al., 2002; Hanlon et al., 2005; Vesey et al., 2004; Bagnis et al., 2001). Kot kaže, je Epo bolj pomemben pleiotropični dejavnik za rast in preživetje celic, kot so sprva mislili (Slika 1). Epo in EpoR se izražata tudi pri mnogih tipih raka (Westenfelder in Baranowski, 2000; Juul et al., 1999; Juul et al., 2000; Yasuda et al., 1998) in pri rakavih celičnih obolenjih, kjer njuna funkcija še vedno ni pojasnjena.

Konec 80. Let prejšnjega stoletja so z izražanjem Epo v ovarijskih celicah kitajskega hrčka (CHO) oziroma ledvičnih celicah mladiča hrčka (BHK) pripravili rekombinantni humani eritropoetin (rHuEpo). Danes je poznanih več tipov rekombinantnih eritropoetinov (Glaspy et al., 1997; Demetri et al., 1998; Gabrilove et al., 2001; Vensteenkiste et al., 2002), ki se razlikujejo po zgradbi sladkornih verig, načinu priprave ter farmakokinetičnih in farmakodinamičnih lastnostih. Rekombinantni humani Epo (rHuEpo) se uporablja za dvig ravni hemoglobina (Hb) pri bolnikih z anemijo (Hodges et al., 2007). Posledica anemije je povečana utrujenost, zmanjšana aktivnost in splošna slabša kakovost življenja. Med vzroki, ki botrujejo nastanku anemije, so nekateri še posebej v ospredju. Tako je bilo ugotovljeno, da lahko anemija (slabokrvnost) nastane zaradi vnetnega odgovora, krvavitve, hemolize, odpovedi ledvic, rasti tumorja v kostnem mozgu in tudi kot posledica zdravljenja raka s kemoterapijo oziroma z obsevanjem. Nekatere raziskave kažejo, da je anemija napovedni dejavnik slabšega preživetja bolnikov z rakom. Zdravljenje z rHuEpo odpravi anemijo, zmanjša potrebo po transfuziji in izboljša bolnikovo počutje. Poleg tega rHuEpo izboljša uspešnost kemo- in radioterapije zaradi boljše prekravljjenosti in preskrbe tumorja s kisikom (Cella et al., 2003; Glaspy et al., 1997). Toda po drugi strani prisotnost Epo in njegovega receptorja (EpoR) pri mnogih tipih raka in rakastih celičnih linijah postavlja pod vprašaj terapevtske učinke rHuEpo pri bolnikih z rakom. Nakazuje se namreč možnost, da rHuEpo vpliva na hitrejšo rast tumorja, pospešuje njegovo ožiljenje in ščiti rakaste celice pred apoptozo. Dve klinični študiji (Leyland-Jones, 2003; Henke et al., 2003) sta leta 2003 pokazali slabše preživetje bolnikov, pri katerih je bila kemo- in radioterapija kombinirana z rHuEpo, v primerjavi z bolniki, ki so prejemali samo transfuzijo krvi. V letu 2007 so dodatne analize bolnikov iz študije, ki so jo izvajali Henke et al. (2003) pokazale, da zdravljenje z rHuEpo prizadene bolnike, ki imajo izražen eritropoetinski receptor (EpoR) (Henke et al., 2006). Naknadne raziskave so dokazale pomanjkanje specifičnosti protiteles za EpoR, ki so bila uporabljena za odkrivanje izražanja proteina EpoR (Elliott et al., 2006).

S temi raziskavami se široka klinična uporaba Epo postavlja pod vprašanje in mora biti ocenjena ponovno.

Od leta 2003 je bilo objavljenih osem kliničnih študij v katerih je bilo po tretiranju tumorja z rHuEpo dokazano bodisi povečano napredovanje tumorja, povečana smrtnost ali trend slabšega preživetja (Leyland-Jones, 2003; Henke et al., 2003; Leyland-Jones et al., 2005; Temkin et al., 2006; Overgaard et al., 2007; Wright et al., 2007; Smith et al., 2008; Thomas et al., 2008, Amgen Announces, 2010). Številne reprezentativne študije pa so po drugi strani pokazale koristen učinek stimulatorjev eritropoeze oz. njihov učinek ni imel neželenih posledic.

Nasprotujoče si ugotovitve o učinkih rHuEpo (Slika 1) v predkliničnih in kliničnih študijah ter njegove ugotovljene pleiotropične lastnosti vsekakor terjajo razjasnitev mehanizma delovanja rHuEpo za odgovorno ravnanje med zdravljenjem.



Slika 1: Tarčna tkiva eritropoetina

Epo, ki kroži po telesu, primarno vpliva na eritroidne celične linije. Poleg tega hormon sproži angiogenezo. V možganih ima Epo parakrin vpliv. Opažen je bil nevroprotekcijski in kardioprotekcijski vpliv farmakološko pripravljenega rHuEpo. Vprašanje o vplivu Epo na rast tumorja ostaja odprto (povzeto po Jelkmann, 2004).

1.2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Naš namen je bil preučiti vpliv rekombinantnega humanega eritropoetina (rHuEpo) na izražanje eritropoetinskega receptorja v tumorski in normalni celični liniji dojke.

Naša temeljna hipoteza je, da deluje eritropoetin različno na proliferacijo tumorskih in normalnih celic dojke. Poleg tega smo predvidevali, da je izražanje gena za eritropoetinski receptor različno pri tumorski in normalni celični liniji dojke. Domnevali smo tudi, da kronična izpostavljenost celic eritropoetinu spremeni njihovo odzivnost.

Zato smo se odločili, da bomo v okviru diplomskega dela:

- s pomočjo MTT testov spremljali vpliv rekombinantnega humanega eritropoetina na proliferacijo pri tumorski in normalni celični liniji dojke,
- s polimerazno reakcijo v realnem času raziskali izražanje eritropoetinskega receptorja v tumorski in normalni celični liniji dojke,
- preverili, ali se po kronični izpostavljenosti celic rHuEpo spremeni odzivnost celic na nivoju proliferacije in izražanja eritropoetinskega receptorja.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RAK

Razširjenost raka

Onkološka epidemiologija preučuje razširjenost raka pri prebivalstvu v raznih časovnih obdobjih in na različnih zemljepisnih območjih. Išče dejavnike, ki povečujejo ali zmanjšujejo ogroženost z rakom in preverja povezave med izpostavljenostjo in bolezni. Najpomembnejši kazalniki pri ocenjevanju bremena raka so incidenca, prevalenca, umrljivost in preživetje. Natančni in zanesljivi podatki o zbolelih za rakom na nekem območju se zbirajo v registrih raka; v Sloveniji že od leta 1950 deluje Register raka Republike Slovenije. Obolevnost v razvitejšem svetu je večja, in sicer iz več razlogov:

- podaljšana življenjska doba,
- demografski dejavniki (spol, starost, zemljepisna lega),
- dejavniki materinstva (zgodnja menarha, pozna mena, starost več kot 30 let ob prvem porodu, nerodnost, nizko število otrok, opustitev dojenja),
- eksogeni hormoni (oralna kontracepcija, hormonsko nadomestno zdravljenje),
- življenjski slog (alkohol, prehrana z nasičenimi maščobnimi kislinami, debelost),
- ionizirajoče sevanje,
- mamografska nepreglednost dojk,
- višja telesna višina,
- dednost.

V svetu zboli za rakom letno več kot 12 milijonov ljudi, 7,6 milijona pa jih zaradi raka umre. V Sloveniji letno zboli za rakom več kot 10.000 prebivalcev, umre pa jih okrog 6.000. Rak postaja v razvitem svetu glavni vzrok smrti in podobno kot v drugih evropskih državah je tudi pri nas na drugem mestu med vzroki smrti (Novaković, 2009).

V razvitejšem svetu je pri moških najpogosteji rak pljuč, pri ženskah pa rak dojke. To velja tudi za Slovenijo. Po podatkih Registra raka za Slovenijo se obolevnost z rakom dojke povečuje od leta 1950. Vsak peti novi primer raka je rak na dojki. Z obolevnostjo okrog 100/100.000 žensk (1073 novih bolnic leta 2003) se Slovenija uvršča v sredino svetovne lestvice (Teden boja..., 2010).

Nastanek raka – kancerogeneza

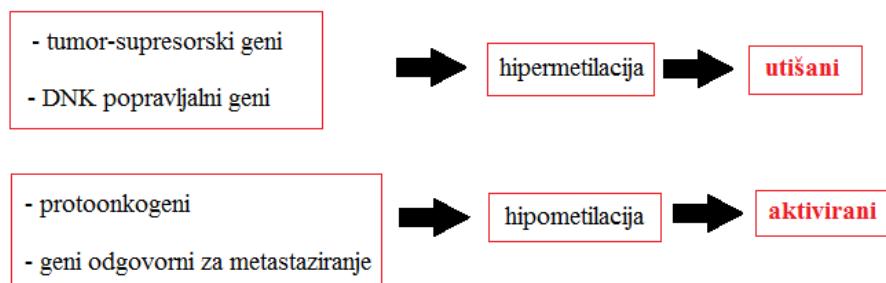
Proces kancerogeneze je dolgotrajen in zapleten. Na splošno govorimo o treh osnovnih stopnjah, ki vključujejo vrsto različnih podstopenj: i) iniciacija, ii) promocija in iii) progresija. Osnovne lastnosti rakaste celice so: samozadostnost za lastno proliferacijo, neodzivnost na signale, ki uravnavajo število celičnih delitev, neodzivnost na signale, ki sprožajo apoptozo, genomska nestabilnost, preureditev tvorbe citokinov in izražanja celičnih antigenov, zmožnost prehoda v limfni in krvni obtok ter zmožnost pritrditve v drugih organih in ponovna klonalna rast (Novaković, 2009).

Obstaja več teorij o nastanku raka. Hipoteza o klonalni evoluciji tumorskih populacij, ki se je pojavila v 80. Letih prejšnjega stoletja pravi, da tumor nastane iz enake vrste celic. Ta hipoteza velja še danes. Hipoteza o monoklonalnem razvoju tumorjev pa trdi, da nastane tumor iz ene same poškodovane (mutirane) celice. Začetnim mutacijam sledijo nove, ki

destabilizirajo celice tako, da postajajo doveztenejše za nove mutacije in tako pridobijo večjo evolucijsko prednost, kar pomeni, da lažje preživijo v spreminjačem se tkivu, v katerem nastaja nova tumorska masa. Gre torej za pravo darvinistično teorijo evolucije, ki v tem primeru velja za rast novega, sistemu tujega organa – tumorja (Lah, 2011).

Pri tumorski celici gre za zaporedje sprememb v jedru oziroma genskem zapisu v tako imenovanih onkogenih (odgovorni za celično delitev ter podvojevanje DNA) in tumor-supresorskih genih (odgovorni za preverjanje podvojene DNA ter nadzor celičnega cikla) ter v določenih genih (CIN-genih), ki so odgovorni za dodatno destabilizacijo novo nastajajoče tumorske celice. Onkogeni so med procesom kancerogeneze spodbujeni k čim večji ekspresiji, medtem ko so tumor-supresorski geni spremenjeni tako, da je njihova ekspresija zmanjšana oz. da je njihov produkt funkcionalno neaktivен. Na proces kancerogeneze vplivajo tudi drugi dejavniki, ki neposredno ne povzročajo sprememb v nukleotidnem zaporedju DNA in jih imenujemo epigenetski dejavniki (Slika 2). Prav tako, kot mutageni dejavniki, tudi epigenetski dejavniki najpogosteje prizadenejo regulatorne gene – protoonkogene, tumor-supresorske gene in ostale gene, ki so vključeni v nadzor podvojevanja celične DNA oz. celice same.

EPIGENETSKI DEJAVNIKI



Slika 2: Epigenetski dejavniki

Epigenetski dejavniki spreminjajo predvsem metilacijo DNA. Preveč metilirani geni se ne prepisujejo, medtem ko se premalo metilirani geni prepisujejo prekomerno. Poleg metilacije same DNA lahko delovanje epigenetskih dejavnikov spremeni strukturo kromatina – acetilacija, fosforilacija, metilacija histonov 2.1. (povzeto po Novaković, 2009).

Vrste tumorjev

Da bi celica »zaživila« kot rakasta celica, mora torej nakopičiti celo vrsto sprememb in si pridobiti lastnosti, ki jo naredijo razmeroma neodvisno od ustaljenih mehanizmov v normalnih celicah. Ker so ti mehanizmi odvisni od vrste celice oz. tkiva, iz katerega celica izhaja, so kombinacije sprememb oz. lastnosti, ki jih mora rakasta celica pridobiti, različne za različne vrste raka. Pri osnovnem razvrščanju upoštevamo mesto oziroma organ, kjer se je rak pojavil (govorimo npr. o raku dojke, raku pljuč, kostnem raku), natančneje pa določimo z mikroskopskim pregledom rakastega tkiva.

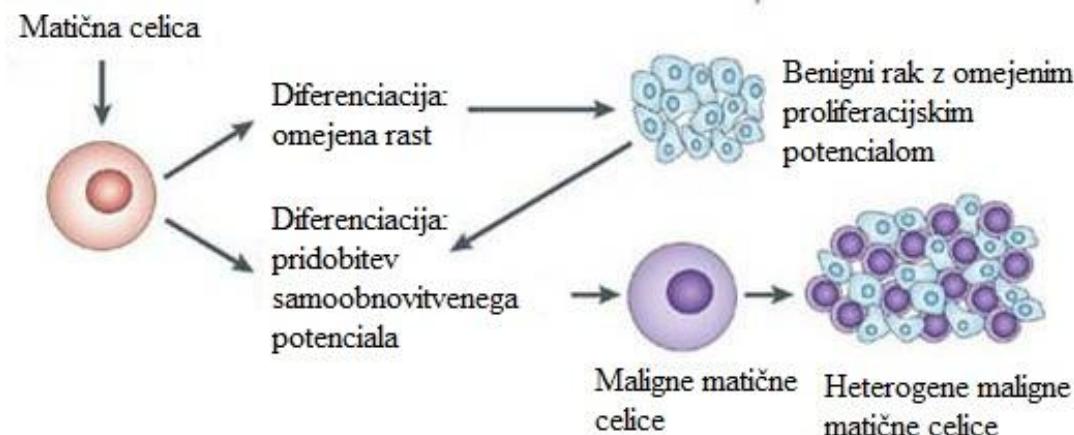
Ločimo štiri kategorije raka:

- Karcinomi so maligni tumorji, ki zrastejo iz epitelnih celic (celic vrhnjice), 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 mezgovnic in bezgavk. Limfatični sistem deluje kot nekakšen filter, ki preprečuje, da bi telesu nevarne snovi (npr. mikroorganizmi) vdrle v krvni obtok (Osnovna dejstva o raku, 2010).

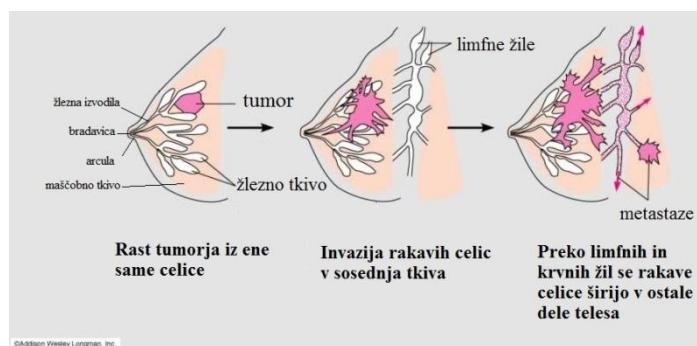
Glede na vrsto tumorja (Slika 3) pa ločimo:

- Benigni tumorji so tumorji, grajeni iz celic, ki so podobne normalnim in imajo le omejeno sposobnost rasti. Če jih odstranimo z operacijo, se praviloma ne ponovijo. Benigni tumorji se ne razširijo v druge dele telesa in ne ogrožajo življenja, zato jih ne štejemo med rakaste tvorbe.
- Maligni tumorji so rakaste tvorbe, grajene iz nenormalnih celic, ki se neurejeno in nenadzorovano delijo in razraščajo. Tumorske celice se vraščajo v sosednja tkiva in jih okvarjajo. Pogosto prodrejo tudi v mezgovnice in žile, limfnini in krvni obtok pa jih razneseta v oddaljene organe, kjer se tvorijo novi tumorji, t. i. zasevki ali metastaze.



Slika 3: Prikaz razvoja benignega in malignega tumorja

Med karcinome spada tudi rak dojke. Najpogosteje se začne v epitelnih celicah duktusov in lobulov (Fras, 1994; Mutschler, Derendorf, 1995). V najzgodnejšem obdobju se rakave celice širijo le po duktusih oziroma lobulih. Od veziva (strome) jih loči bazalna membrana. To obliko imenujemo neinvazivni karcinom ali karcinom *in situ*. Če je bolezen odkrita v tem stadiju, je skoraj vedno ozdravljiva, ker se celice pri tej obliki ne raznašajo po telesu. O invazivnem karcinomu govorimo takrat, ko so rakave celice že prešle skozi bazalno membrano in se vraščajo v stromo dojke (Slika 4).



Slika 4: Priček na nastanek raka dojke

2.2 ERITROPOEZA IN ANEMIJA

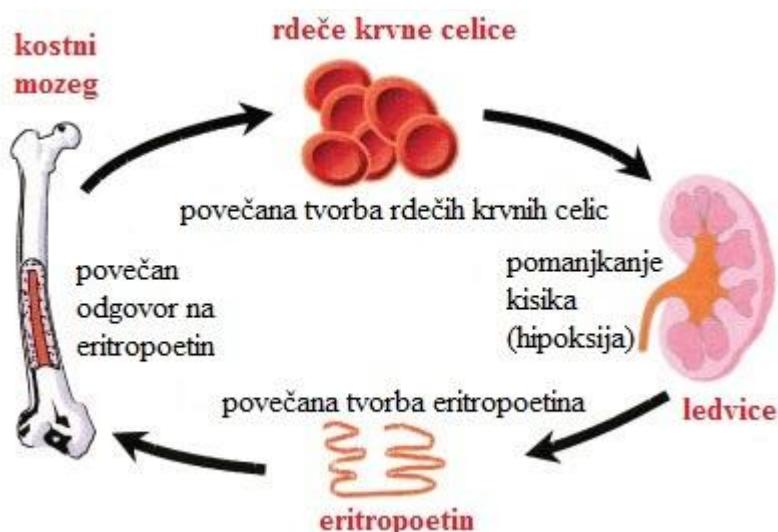
Nastajanje rdečih krvničk oz. eritrocitov imenujemo eritropoeza ali eritrocitopoeza. Gre za dva procesa, ki pa potekata hkrati; to sta proliferacija (delitev) in diferenciacija (dozorevanje).

Eritrociti se v prvi vrsti kot vse druge krvne celice razvijejo iz pluripotentnih matičnih celic (PMC), ki se po enem obdobju razvijejo v multipotentne matične celice mieloične vrste (MMC-M), slednje pa v usmerjene matične celice (UMC) eritroblastne vrste.

Šele iz matičnih celic, usmerjenih v rdečo vrsto (UMC), se lahko prepozna značilne predhodnike, ki jih je morfološko mogoče razlikovati od drugih celic. S skupnim imenom jih imenujemo eritroblasti. Nadaljnji razvoj poteka po naslednjih stopnjah:

Pronormoblast → bazofilni normoblast → polikromatični normoblast → ortokromatični normoblast → retikulocit → eritrocit.

Eritropoeza pred rojstvom poteka v jetrih, vranici in kostnem mozgu, po rojstvu pa le še v kostnem mozgu, nadzorovana pa je preko zaspletenega sistema humornih rastnih dejavnikov in citokinov. Stimulira jo hormon eritropoetin, ki ga ob pomanjkanju kisika v tkivih (hipoksiji) izločajo ledvice (Slika 5). Motnje eritropoeze se kažejo v obliki anemije.



Slika 5: Eritropoeza pod vplivom hormona eritropoetin

Prijejeno po <http://www.empowerthepatient.com/red-blood-cells.htm>.

Anemija ali slabokrvnost je bolezensko stanje, kjer je zmanjšana celotna količina hemoglobina (Hb), kar je posledica bodisi primanjkljaja eritrocitov bodisi manjše količine hemoglobina v eritrocitih. Zaradi zmanjšane količine hemoglobina se zmanjša sposobnost krvi, da prenaša kisik po krvnem obtoku do posameznih tkiv, ki ga nujno potrebujejo za normalno delovanje.

Hb je sestavljen iz proteinskega dela – globina in hema, ki je obarvan in vsebuje železo. Molekula hemoglobina je tetramer, sestavljen iz dveh podenot α in dveh podenot β . V enem litru krvi se lahko prenaša okoli 190-200 ml kisika. Anemijo ocenimo iz koncentracije hemoglobina v krvni sliki. Normalne vrednosti Hb so za ženske od 120 g/l do 160 g/l in za moške od 140 g/l do 180 g/l. Nižje vrednosti so lahko znak anemije.

Vzroki za nastanek anemije so v splošnem slaba absorpcija ali pomanjkanje železa, vitamina B12 ali folne kislina, izguba krvi, bolezni kostnega mozga, rak ali kemoterapija.

Anemija se pojavi pri več kot 50 % rakavih bolnikov. Pogostost je sorazmerna s starostjo in časom diagnosticiranja raka (anemija se pogosteje pojavi pri starejših bolnikih) (Krantz, 1994). Anemija pri rakavih bolnikih je lahko bodisi rezultat razvoja bolezni same ali pa kot posledica zdravljenja in predvsem kemoterapije ter radioterapije. Pri tem lahko:

- ledvice postanejo nezmožne tvorbe zadostne količine eritropoetina za začetek nastajanja eritrocitov,
- kostni mozeg se lahko začne pomanjkljivo odzivati na eritropoetinski signal,
- nekateri raki povzročajo krvavitve, kar vodi v izgubo rdečih krvnih celic.

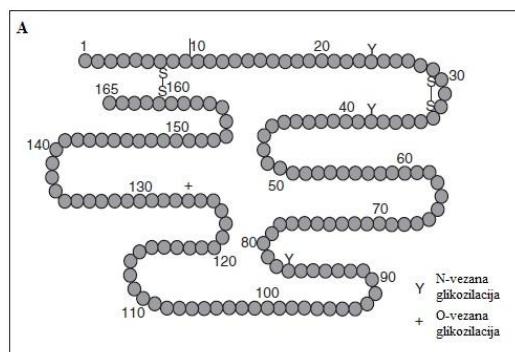
2.3 ERITROPOETIN

2.3.1 *Opis in fiziološka vloga*

Eritropoetin (Epo) je glikoproteinski hormon iz skupine citokinov, ki služi primarni regulaciji eritropoeze (s stimulacijo rasti, preprečevanjem apoptoze in proženjem diferenciacije predhodnikov eritrocitov) (Mannello in Tonti, 2008) in so ga prvič izolirali iz urina leta 1977 (Miyake, Kung in Goldwasser, 1977). Nastaja v ledvicah (90 %) ter jetrih (10 %) in se kot odgovor na tkivno hipoksijo izloča iz peritubularnih celic (Kocjančič et al., 2005). Posledično se dvigne koncentracija Epo v plazmi, nastaja več eritrocitov (Erc), kar omogoči normalno tkivno oksigenacijo. To preko povratne zanke vpliva na manjše nastajanje Epo in posledično Erc (Ferrario, 2004).

Gen za Epo je bil prvič kloniran in izražen leta 1985 (Jacobs, 1985; Lin, 1985). Lociran je na kromosому 7 na mestu 7q22 kot enojna kopija v 5,4 kb fragmentu DNA, ki vsebuje 4 introne in 5 eksonov. Gen kodira 193 AK (aminokislin) dolgo zaporedje, od katerega se odcepi 27 AK dolg signalni peptid. Po cepitvi signalnega peptida in posttranslacijskih spremembah je zrel protein zgrajen iz 165 AK in ima molekulsko maso 18.398 Da (Slika 6) (Breymann, 2000). Molekulska masa Epo določena z elektroforezo znaša 34 kDa. Epo ima dve intramolekularni disulfidni vezi (C7-C161 in C29- C33) in 4 neodvisne sladkorne verige pripete na asparaginske ali serinske aminokislinske ostanke. Polisaharidi predstavljajo kar 40 % molske mase proteina. Sladkorne komponente niso pomembne za *in vitro* aktivnost eritropoetina, saj se na eritropoetinski receptor veže s proteinskim delom. Tri N-glikozidno vezane sladkorne verige na asparaginih (N24, N38 and N83) so pomembne pri biološki vlogi hormona *in vivo*, kot so biosinteza, sekrecija ter stabilizacija

v obtoku in tako zmanjšujejo eliminacijo eritropoetina. O-glikozidno vezana veriga na serinu (S126) nima znane vloge (Romanowski, 1994; Jelkmann, 2004).



Slika 6: Kemijska struktura človeškega eritropoetina

Prirejeno po Mulcahy 2001.

Glikozilacija je nujno potrebna za biološko aktivnost eritropoetina *in vivo* za vzdrževanje zadostne količine Epo v krvnem obtoku. Deglikoziliran Epo je sicer tisti, ki izraža polno biološko aktivnost, vendar pa se kot tak tudi zelo hitro izloča iz organizma preko jeter (Ferrario, 2004).

2.3.2 Rekombinantni humani eritropoetin

V primerih nezadostne eritropoeze lahko kot eno od oblik terapije uporabljamo tudi Epo, pridobljen s tehnologijo rekombinantne DNA – rHuEpo (rekombinantni humani eritropoetin). RhuEpo pridobivamo iz celične kulture ovarija kitajskega hrčka (CHO) s tehnologijo rekombinantne DNA. V kliniki se uporabljajo več oblik rHuEpo, med katerimi so najpogosteje: epoetin alfa in epoetin beta (zaporedje 165 AK z različnim glikozilacijskim vzorcem) ter darbepoetin alfa (hiperglikoziliran derivat z daljšim razpolovnim časom) (Waller et al., 2005).

Razlika v glikozilaciji med epoetinom alfa, epoetinom beta in darbepoetinom alfa je vidna na sliki 7 (prirejeno po Kreft, 2005).



Slika 7: Biokemična in biološka struktura rHuEpo in nekaterih analogov rHuEpo

Biokemična in biološka struktura rHuEpo in analogov rHuEpo, ki vsebujejo 4 in 5-vezano verigo ogljikovih hidratov (Egrie, 1997).

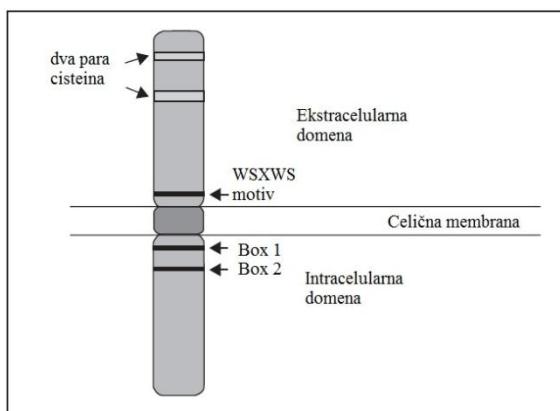
RHuEpo se uporablja za zdravljenje slabokrvnosti, in sicer za:

- zdravljenje anemije, povezane s kronično odpovedjo ledvic pri dializnih bolnikih,
- zdravljenje simptomatične anemije pri bolnikih, ki se še ne zdravijo z dializo,
- preprečevanje anemije pri nedonošenčkih,
- preprečevanje in zdravljenje anemije pri odraslih bolnikih s solidnimi tumorji, multiplim melanomi, ne-Hodkinovimi limfomi, malignimi limfomi,
- povečanje količine avtologne krvi pri bolnikih v programu avtolognega darovanja krvi in
- zmanjšanje izpostavljenosti alogenim transfuzijam krvi pred večjimi ortopedskimi kirurškimi posegi.

Od leta 2008 se vsi stimulatorji eritropoeze (tudi rHuEpo), uporabljajo le za tiste rakave bolnike z anemijo kot posledico kemoterapije, pri katerih nivo hemoglobina v krvi pada med 9 in 11 g/dl (Rizzo et al., 2008; Greil et al., 2008).

2.4 ERITROPOETINSKI RECEPTOR

Eritropoetinski receptor (EpoR) je transmembranski protein tipa-1 in pripada citokinski družini receptorjev (Bazan, 1990; D'Andrea et al., 1989; Klingmuller, 1997; Wojchowski et al., 1999; Farrel, 2004). V to družino uvrščamo tudi receptorje drugih krvotvornih rastnih faktorjev, vključno z rastnimi hormoni, prolaktin, G-CSF, GM-CSF, trombopoetin, onkostatin M in nekaterimi interlevkini. Receptorji iz te družine imajo nekatere skupne značilnosti kot je ekstracelularna domena za vezavo liganda z dvema ohranjenima paroma cisteinskih ostankov in ohranjenim motivom WSXWS, ki je lociran blizu transmembranski domeni. Skupna značilnost je tudi enojna transmembranska domena in intracelularna domena (z motivoma Box1 in Box2) brez katalitske aktivnosti. (Slika 8).

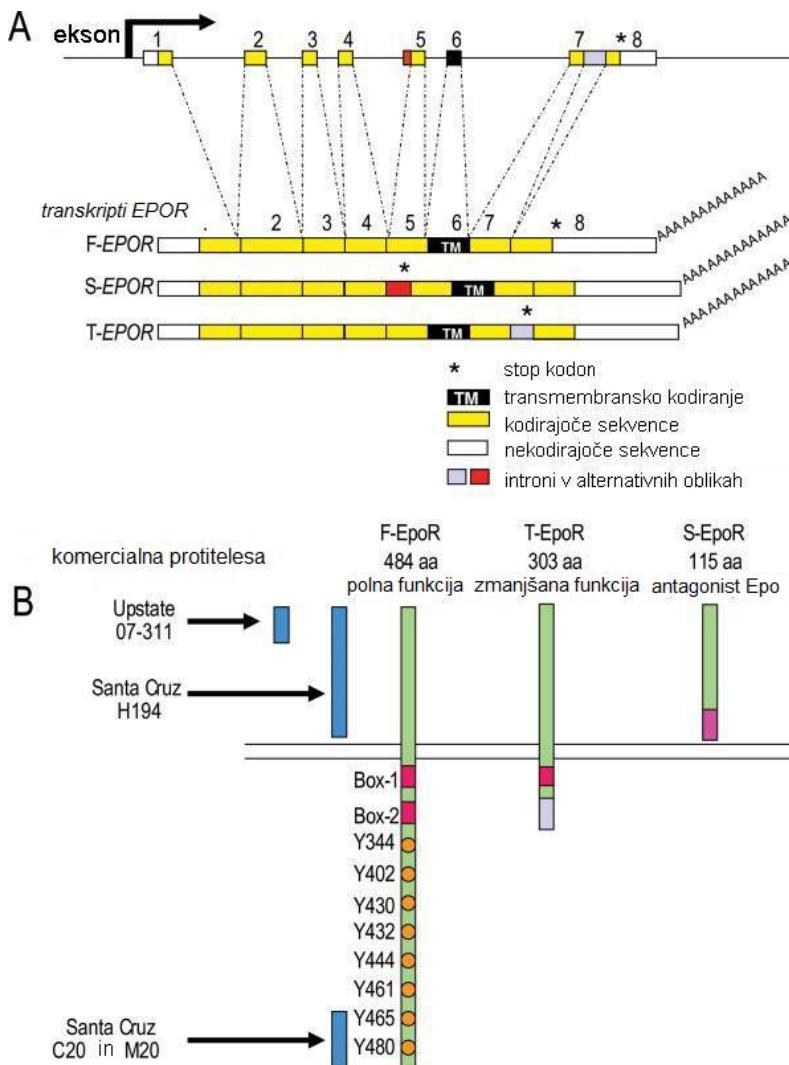


Slika 8: Shematski prikaz eritropoetinskega receptorja

Ekstracelularna in intracelularna domena EpoR sta zasidrani v membrano (prirejeno po Mulcahy 2001).

Eritropoetinski receptor se v eritropoetskih matičnih celicah pojavlja v treh različnih oblikah: v normalni funkcionalni F-EpoR s 484 aminokislinami (ang. full-length form), okrnjeni T-EpoR s 303 aminokislinami (ang. truncated form) in topni obliki S-EpoR s 115 aminokislinami (ang. soluble form) (Nakamura, 1992) (Slika 9). T-EpoR se pojavlja v treh izoformah, ki so vezane na membrano, a imajo v intracelularni domeni skrajšan C-terminalni del, ki je odgovoren za prenos signala. S-EpoR pa se pojavlja v dveh izoformah, ki imata le ekstracelularno domeno.

Tako na membrano vezan T-EpoR kot topen S-EpoR lahko vežeta Epo, vendar se pri tem nadaljnja signalna tansdukcija Epo ne sproži. Tako z divjim tipom EpoR tekmujeta za vezavo eritropoetina (Sakanaka, 1998). Vendar pa fiziološke vloge posameznih oblik EpoR še niso znane (Sinclair, 2007).



Slika 9: Ilustracija gena za eritropoetinski receptor (EPOR) in alternativne kopije EpoR

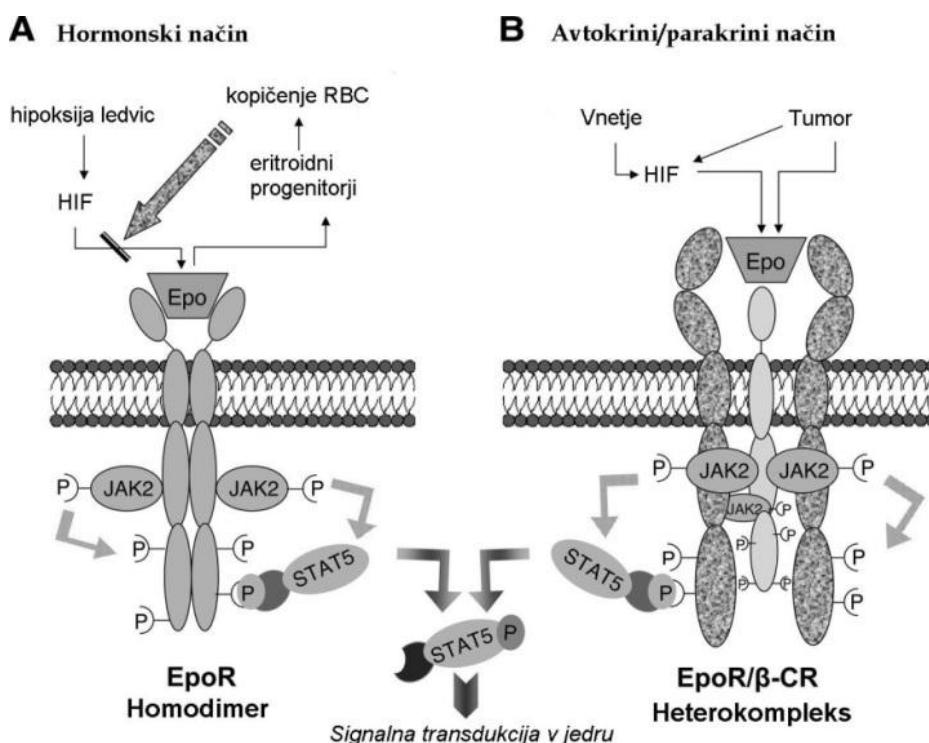
Gen EPOR z alternativnimi transkripti: prikazano je število eksonov. * prikazuje stop kodon. B) EpoR proteinske oblike z določeno vlogo. Mesto vezave komercialnih protiteles na peptid EpoR (modri kvadratki). Oranžni kvadratki so tirozini (Y) v citoplazmski domeni, potrebni za signalizacijo. Prikazani so tudi nehomologni deli okrnjene oblike EpoR (T-EpoR) (siva) in topne oblike EpoR (S-EpoR) (vijolična) v primerjavi z normalno obliko EpoR (F-EpoR); aa – aminokislina (prirejeno po Sinclair, 2007).

2.5 MEHANIZEM DELOVANJA EPO-EPOR

Aktivacija signalizacije Epo-EpoR

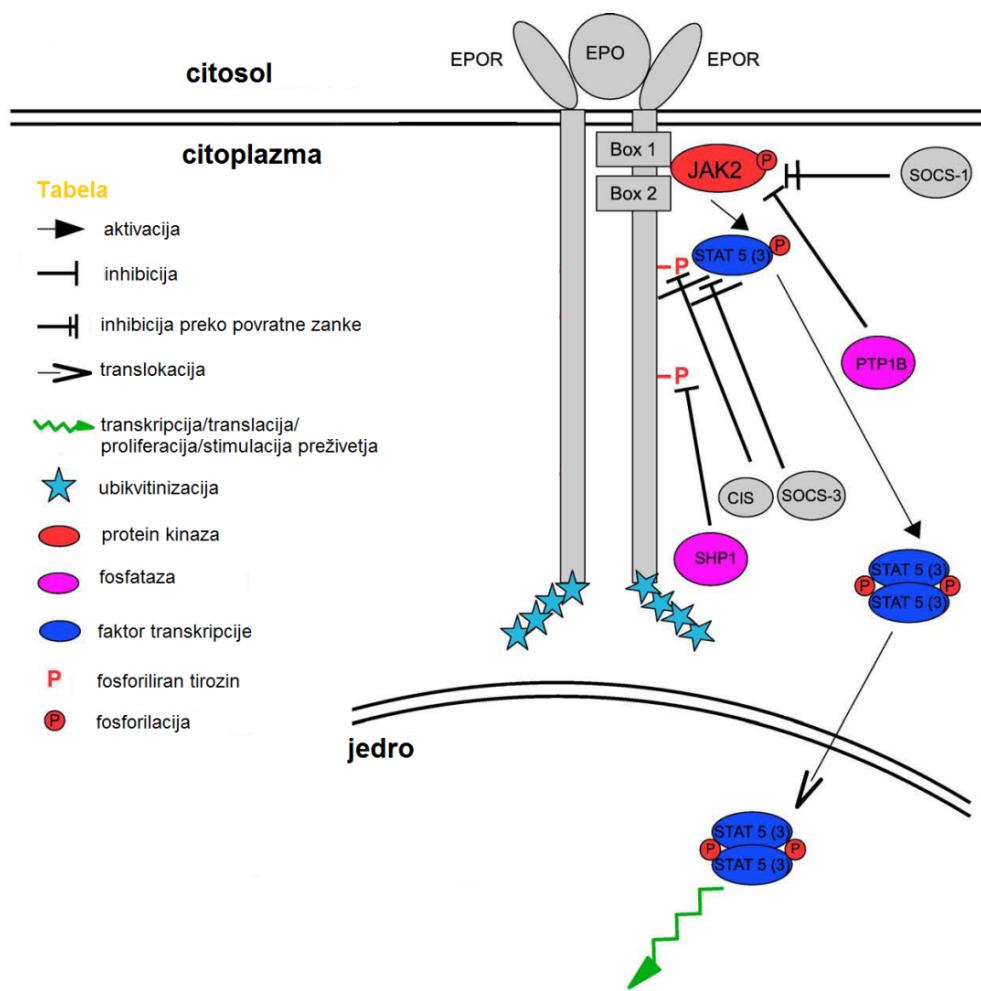
Epo deluje na hormonski in avtokrini/parakrini način preko različnih receptorjev, katerih delovanje se ne prekriva (Manello, 2008).

2.5.1



Slika 10: Hormonsko ter avtokrino in parakrino delovanje Epo

Epo uravnava število eritrocitov v krvi preko negativne povratne zanke, ki je značilna za endokrini hormon. Eritropoetski odziv na Epo poteka preko aktivacije EpoR in signalnih poti (Slika 11). Ker EpoR nima endogene tirozin kinazne aktivnosti, se fosforilacijska kaskada, ki jo inducira Epo, začne s proteinom Janus tirozin kinazo 2 (JAK2), ki je povezana z motivom Box1–Box2 v intracelularni domeni EpoR. Kot je prikazano na sliki 11, ob vezavi na predhodno formirani homodimer EpoR (Constantinescu, 1999) Epo povzroči aktivacijo JAK2 preko avtofosforilacije. Aktivirana JAK2 inducira fosforilacijo osmih tirozinskih mest na distalnem delu intracelularne domene EpoR (Frank, 2002), ki po fosforilaciji predstavljam vezavna mesta za številne intracelularne signalne proteine, ki pozneje aktivirajo štiri glavne signalne poti za hematopoetski odziv na Epo: signalna pot JAK2/STAT5 (transduktor in aktivator signala 5), signalna pot MAPK (protein kinaza aktivirana z mitogenom), signalna pot PI3K/AKT (kinaza fosfatidilinozitol 3) in signalna pot PKC (protein kinaza C) (Boudot, 1999). Prvi od signalnih proteinov, ki se aktivirajo in disociirajo od EpoR, so STAT5, ki se translocirajo v jedro in aktivirajo tarčne gene, ključne za preživetje predniskih eritroidnih celic, njihovo proliferacijo, diferenciacijo (Wojchowski, 1999) in sintezo hemoglobina. Te signalne poti, ki so bile odkrite v krvotvornih celicah, lahko prav tako prispevajo k razumevanju dogajanja v nekrvotvornih in rakavih celicah.



Slika 11: Vezava, aktivacija in deaktivacija EPO-EPOR signalne poti

Vezava Epo na homodimer EpoR, aktivacija preko signalne poti JAK2/STAT5 in njena deaktivacija preko več mehanizmov (prirejeno po Szenajch, 2010).

Za razliko od eritropoeze, Epo v nekrvotvornih in rakavih tkivih deluje na avtokrini/parakrini način. Poškodba tkiva, lokalno vnetje, hipoksija in metabolni stres sprožijo sintezo faktorjev, ki inducira hipoksijo (HIF), odgovorno za lokalno povišanje koncentracije Epo. Tkivno avtokrino/parakrino delovanje Epo ni odvisno od aktivacije homodimera EpoR, ampak od drugega receptorskega kompleksa, ki vključuje EpoR in dimer β-CR (β -podobni receptor, znan tudi kot CD131) (Brines, 2004; Rossert, 2005; Sinclair, 2007; Konstantinopoulos, 2007). Za aktivacijo tkivnega heterokompleksa EpoR je kratkotrajno potrebna visoka koncentracija Epo, ker je vezavna afiniteta bistveno nižja od koncentracije Epo v krvi. Interakcija med intracelularno domeno EpoR in podenoto β-CR vodi do aktivacije večih signalnih poti in posledično transkripcijske aktivacije številnih genov. Signalna kaskada JAK2/STAT5/MAPK/PI3/AKT, vključena v eritropoezo, je prisotna tudi pri delovanju tkivnega Epo preko kompleksa EpoR/β-CR, vendar nadaljnje signalne poti, ki se aktivirajo (NFκB, IAP, HSP70) niso raziskane v celoti.

Deaktivacija signalizacije Epo-EpoR

Medtem ko fosforilacija aktivira signalizacijo Epo-EpoR, jo defosforilacija zavira (Slika 11). Proteinsko tirozinsko fosfatazo SHP-1 uvrščamo v poddružino citosolnih proteinskih tirozin fosfataz, ki imajo v svojem zaporedju dve domeni SH2 (SCR homology 2). SHP-1 se preko SH2 domene veže na fosfotirozin (na mestu Y429) na EpoR, povzroči defosforilacijo in s tem inaktivacijo JAK2, kar zmanjša aktivacijo signalne kaskade.

2.5.2. Tudi proteini SOCS (Cytokine inducible SH2-containing protein) imajo pomembno vlogo pri prekinitvi signala Epo-EpoR. Sestavljeni so iz N-terminalne domene, osrednje SH2 domene in C-terminalne SOCS domene. SOCS so vključeni v negativni povratni zanki. Poleg SOCS sodeluje pri negativni povratni zanki še protein Cis (ang. Cytokine inducible Src homology-2 containing protein). Oba se vežeta na tirozinske ostanke (na mestu Y401). S tem preprečita vezavo proteinom STAT in SHP2. Poleg tega SOCS sodelujejo še pri ubikvitinaciji JAK2.

Tretji mehanizem deaktivacije predstavlja internalizacija in razgradnja EpoR (Walrafen, 2005). Po vezavi Epo na EpoR se receptorski kompleks takoj poliubikvitinira (Beckman, 1999), za kar je potrebna aktivna JAK2 kinaza. Ubikvitinacija je signal za vezavo na proteasome, kjer pride do razgradnje večjega dela citoplazemske domene EpoR s fosfotirozini. S tem se prepreči nadaljnja signalna transdukcija. Razcepljen receptor EpoR z vezanim Epo se potem internalizira in razgradi v lizosomih. Nekaj kompleksov EpoR se razstavi in reciklira nazaj na membrano, kjer se kot topni fragmenti Epo in EpoR izločajo v ekstracelularni prostor za nadaljnjo aktivnost.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 GOJENJE CELIČNIH KULTUR

Kemikalije

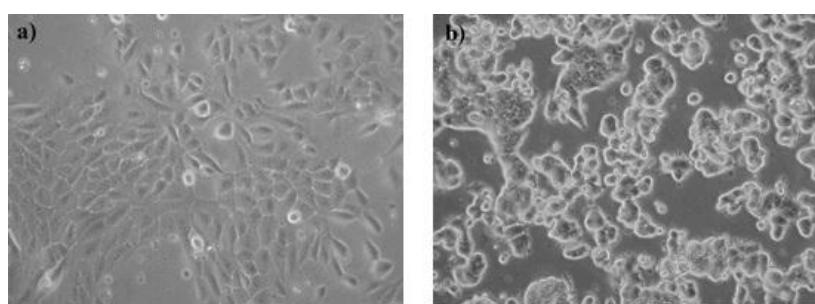
- Gojišče »Roswell Park Memorial Institute« (RPMI 1640), liquid (GIBCO)
- Gojišče: Dulbeccova modifikacija Eaglovega medija /Hamov medij (D-MEM/F12), liquid (GIBCO, ZDA)
- 3.1.1 Fetalni goveji serum (FBS) (GIBCO, ZDA)
- Antibiotik/antimikotik AA (100x) (GIBCO, ZDA, 100 mL)
- Insulin (Sigma, ZDA); stock=10 mg/ mL; 0,5 mL/ 500mL
- Hydrocortisone HC (Sigma, ZDA); zatehtali, raztopili v dH₂O/EtOH = 1:1, sterilno filtrirali, stock=1 mg/mL
- EGF (Sigma, ZDA); stock = 10 ng/mL; 1 mL/ 500 mL medija
- Slani fosfatni pufer (PBS) (pH = 7,4 ±0,2) ?
- 10 x PBS (GIBCO, Invitrogen, ZDA)
- Tripsin/ Etildiaminotetraocetna kislina (EDTA): 0,5 g tripsina, 0,2 g EDTA, 0,85 g NaCl / 1 (Sigma, ZDA)
- Dimetilsulfoksid (DMSO) (Sigma, ZDA)
- Hanksova ozmolarna raztopina soli (HBSS) (Gibco, ZDA)
- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid formazan (MTT)
- Natrijev dodecil sulfat (SDS)
- Eritropoetin (Roche, Švica), koncentracija standarda= 1,96 mg/mL, merjeno pri 280 nm, aktivnost pripravka= 204.100 IU/mg, navidezna molekulska masa= 70 kDa

3.1.2

Celične kulture

- MCF-10A (ATCC številka CRL-10317); človeške epitelne celice iz tkiva dojke
Celična linija MCF-10A (Slika 12/a) je človeška netumorigena epitelijska celična linija iz tkiva dojke. Linija je bila izdelana v trajni kulturi v serumu brez medija z nizko koncentracijo Ca²⁺. MCF-10A izhajajo iz adherentnih celic v populaciji
- MCF-7 (ATCC številka HTB-22); človeške epitelne celic adenokarcinoma dojke v fazi metastaze

Celična linija MCF-7 (Slika 12/b) je človeška epitelna celična linija adenokarcinoma dojke v fazi metastaze. Ohranja nekatere značilnosti diferenciranega epitelija mlečnih žlez vključno s sposobnostjo izgradnje estradiola preko citoplazemskega receptorja za estrogen in zmožnostjo izoblikovanja kupole (ang. »domes«). Vsebuje Tx-onkogen.



Slika 12: 20x povečava celič MCF-10A (a) in celič MCF-7 (b)

Odtaljevanje in gojenje celic

Celice MCF-7 in MCF-10A so bile shranjene v tekočem dušiku pri -196 °C. Vialo s celicami smo odtalili pri sobni temperaturi in vsebino prenesli v 25 cm²-posodo za gojenje 3.1.1. Celic ter dodali ustrezni medij za gojenje. Pred prvim precepljanjem po odmrzovanju smo za zaščito proti okužbi v gojišče dodali tudi 1 x raztopino antibiotika, antimikotika (AA) (100 x). Po 24 urah smo medij zamenjali s svežim, da smo odstranili dimetilsulfoksid (DMSO, krioprotектант med zamrznitvijo) in AA.

Celice MCF-10A smo gojili v gojišču D-MEM (ang. Dulbecco/Vogt Modified Eagle's Minimal Essential Medium) s 5-odstotnim FBS (ang. Fetal bowin serum), 10 mg/mL insulina, 20 ng/mL EGF in 0,5 µg/mL HC, celice MCF-7 pa so rastle v gojišču RPMI 1640 (ang. Roswell Park Memorial Institute medium) z 10-odstotnim FBS.

Celični liniji smo gojili v plastičnih posodah 25 cm² in 75 cm² v inkubatorju na 37 °C v atmosferi s 5-odstotnim CO₂. V logaritemski fazi rasti oz. ko so celice dosegle vsaj 85-odstotno konfluentnost, smo celice tripsinizirali. Najprej smo odstranili gojišče, celice previdno sprali s HBSS (Hanksova ozmolarna raztopina soli) in ga odstranili, nato pa dodali encim Trypsin-EDTA triple-select (Sigma, ZDA). Po 10-15 minutah inkubacije na 37 °C smo pod mikroskopom preverili, če so se celice že odlepile od podlage. Delovanje tripsina smo ustavili z dodatkom že prej omenjenega gojišča. Število celic v pripravljeni suspenziji smo določili s štetjem v hemocitometru in ustrezno število celic nasadili v nove posode – v naslednjo pasažo.

3.1.4 *Tretiranje celic z rekombinantnim humanim eritropoetinom (rHuEpo)*

Najprej smo ustrezno redčili standardni pripravek eritropoetina (v nadaljevanju rHuEpo). Koncentracija standardnega pripravka je bila 1,96 mg/ml z aktivnostjo 204.100 IU/mg, kar pomeni, da je standard rHuEpo vseboval 400.000 U rHuEpo/ml, ki smo ga redčili s sterilno vodo do ustreznih koncentracij.

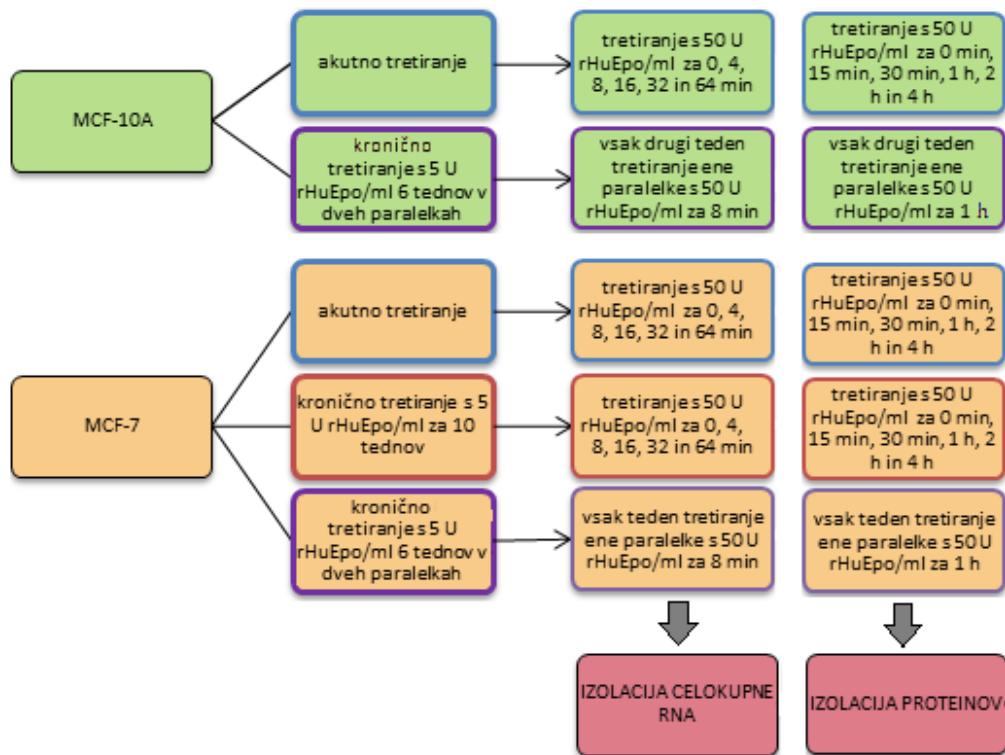
Nato smo s pomočjo testa MTT preučevali proliferativni vpliv rHuEpo po predhodnem tretiranju z rHuEpo:

- a) pri akutnem izpostavljanju celic rHuEpo smo po 5.000 celic/luknjico prenesli na ploščice s 96 luknjicami in jih gojili 24 h v ustremnem mediju, da so se pritrstile na podlago. Po 24 h smo odstranili medij in celice za 0 h, 24 h, 48 h in 72 h tretirali z različnimi koncentracijami rHuEpo (0, 5, 10, 20, 40, 80 U rHuEpo/ml gojišča) v šestih paralelkah.
- b) pri kroničnem izpostavljanju smo celice do 10 tednov tretirali s 5 U rHuEpo/ml gojišča, zatem pa je bil postopek povsem identičen kot pri akutnem izpostavljanju.

Glede na rezultate testov MTT smo se odločili, da:

- a) celice za izolacijo RNA tretiramo s 50 U rHuEpo/ml (Slika 13), in sicer:
 - akutno tretiranje celične linije MCF-10A in MCF-7 z rHuEpo za različne čase: 0, 4, 8, 16, 32 in 64 minut,
 - kronično tretiranje celične linije MCF-7 s 5 U rHuEpo/ml devet tednov in nato tretiranje s 50 U rHuEpo/ml za različne čase: 0, 4, 8, 16, 32 in 64 minut,
 - kronično tretiranje celične linije MCF-7 s 5 U rHuEpo/ml šest tednov v dveh paralelkah. Vsak teden smo eno od paralelk tretirali s 50 U rHuEpo/ml za 8 minut, drugo pa precepili za nadaljnje tretiranje z rHuEpo.

- kronično tretiranje celične linije MCF-10A s 5 U rHuEpo/ml šest tednov v dveh paralekah. Vsak drugi tenen smo eno od paralelk tretirali s 50 U rHuEpo/m za 8 minut, drugo pa precepili za nadaljnje tretiranje z rHuEpo.
- b) celice za izolacijo proteinov pa tretiramo s 50 U rHuEpo/ml (Slika 13), in sicer:
 - akutno tretiranje celične linije MCF-10A in MCF-7 z rHuEpo za različne čase: 0 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h in 4 h,
 - kronično tretiranje celične linije MCF-7 s 5 U rHuEpo/ml devet tednov in nato tretiranje s 50 U rHuEpo/ml za različne čase: 0 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h in 4 h,
 - kronično tretiranje celične linije MCF-7 s 5 U rHuEpo/ml šest tednov v dveh paralekah. Vsak tenen smo eno od paralelk tretirali s 50 U rHuEpo/ml za 1 uro, drugo pa precepili za nadaljnje tretiranje z rHuEpo,
 - kronično tretiranje celične linije MCF-10A s 5 U rHuEpo/ml šest tednov v dveh paralekah. Vsak drugi tenen smo eno od paralelk tretirali s 50 U rHuEpo/m za 1 uro, drugo pa precepili za nadaljnje tretiranje z rHuEpo.



3.1 Šlika 13: Shematski prikaz tretiranja celic MCF-7 in MCF-10A z rekombinantnim humanim eritropoetinom za izolacijo celokupne RNA in proteinov

Test MTT

Test temelji na spektrofotometričnem določanju celične rasti kot funkcije mitohondrijske aktivnosti v živih celicah. Z njim merimo sposobnost živih celic, da z mitohondrijsko sukcinat dehidrogenazo reducirajo topno rumeno tetrazolijev sol (3-[4,5-dimetiltiaol-2-il]-2,5-difenil tetrazolijev bromid), v netopne škrlatne formazanske kristale. Te kristale nato raztopimo v ustreznem topilu in izmerimo absorbancijo pri 570 nm. Iz absorbkcije lahko direktno sklepamo na preživetje celic, saj je absorpcija v linearni odvisnosti od

mitochondrijske encimske aktivnosti, ta pa v linearni odvisnosti od števila preživetih celic. Test smo izvedli po modificiranih navodilih Hensen, 1989. Uporabili smo naslednje reagente:

- MTT raztopina: 5 mg/ml v PBS (s filtrom sterilizirani in na -20 °C shranjeni alikvoti, alikvoti v uporabi pa shranjeni na 4 °C, v temi, uporabni do enega meseca)
- 20-odstotnim SDS v 0,01 M HCl (shranjeno na sobni temperaturi)

K 100 µl celične kulture v ploščicah s 96 luknjicami smo dodali 15 µl MTT raztopine in inkubirali na 37 °C za 2 uri. Po tem smo v vsako luknjico dodali 100 µl raztopine SDS, zavili v folijo in položili čez noč na stresalnik. Po 24 urah smo izmerili absorbanco pri 570 nm in 690 nm s čitalcem mikrotitrskih plošč Tecan (Tecan infinite M200, Tecan Austria GmbH). Z absorbanco 690 nm smo izmerili vrednost absorpcije ozadja, ki smo jo nato odšteli od absorpcije pri 570 nm in tako dobili končno vrednost. Na podlagi dobljenih rezultatov smo izračunali delež preživelih celic glede na kontrolo (netretirane celice) za vsako koncentracijo rHuEpo posebej po enačbi 1:

$$\text{delež preživelih celic} = (\text{absorbcija tretiranih celic}/\text{absorbcija kontrole}) \times 100 [\%] \dots (1)$$

Končno vrednost deleža preživelih celic pri določeni koncentraciji rHuEpo predstavlja povprečna vrednost deležev preživelih celic vseh 6 paralelk ± standardna napaka (SE).

3.2 MOLEKULARNO BIOLOŠKE METODE

3.2.1 Izolacija celokupne RNA

Iz netretiranih celic in celic tretiranih z rHuEpo smo po navodilih proizvajalca s kompletom High Pure Total RNA Isolation Kit (Roche, ZDA) izolirali celokupno RNA. Raztopini WASH I in WASH II sta del kompleta.

Celicam smo odstranili medij, jih sprali s 3 ml toplega HBSS ter postrgali v 400 µl pufra za lizo celic. Po vorteksiranju (15 s) smo celični lizat prenesli na filtrirno enoto in centrifugirali 15 s na 8.000 obr./min. Eluat smo odlili, dodali 100 µl mešanice DNase (10 µl DNase + 90 µl pufra) in inkubirali na sobni temperaturi 15 min. Nato smo dodali 500 µl WASH I, centrifugirali 15 s na 8.000 obr./min in odlili eluat. Dodali smo 500 µl WASH II, centrifugirali 15 s na 8.000 obr./min in odlili eluat. Ponovno smo dodali 200 µl WASH II, centrifugirali 2 min na 13.000 obr./min in odlili eluat. Vse skupaj smo prenesli v sterilno epico, dodali 50 µl elucijske raztopine in centrifugirali 1 min na 8.000 obr./min. Na Bioanalizatorju 2100 smo določili koncentracijo izolirane celokupne RNA in preverili njeno kvaliteto, preostalo celokupno RNA pa smo shranili na -80 °C do nadaljnjih raziskav (Agilent in qRT-PCR).

Analiza celokupne RNA na Bioanalizatorju 2100

Metoda se uporablja za merjenje integritete in koncentracije RNA v vzorcu. Kronično in akutno izpostavljenim celicam (glej poglavje 3.1.5) smo odstranili medij in jih s 50 U rHuEpo/ml inkubirali 8 min na 37 °C. Po zgoraj opisanem postopku smo izvedli izolacijo celokupne RNA, nato pa smo sledili navodilom proizvajalca (Agilent Technologies, ZDA). Za ugotavljanje kakovosti celokupne RNA smo uporabili komplet Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, ZDA) in aparaturo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, ZDA). Aparatura omogoča avtomatizirano ločevanje molekul RNA na

osnovi njihovih velikosti s kapilarno elektroforezo, izmeri fluorescenco in poda rezultat v obliki elektroferograma in faktorja RIN (angl. »RNA Integrity Number«), ki opiše kakovost RNA.

Po navodilih proizvajalca smo ustrezno redčene vzorce celokupne RNA in standard velikosti Agilent RNA 6000 Ladder (Agilent Technologies, ZDA) denaturirali 2 min pri 70 °C, kratko centrifugirali in shranili na ledu. Nato smo pripravili mešanico gela (Agilent RNA 6000 Nano Gel Matrix) in barvila (RNA Nano Dye Concentrate) in jo nanesli po 9 µl v predpisane vdolbine na čipu (RNA 6000 Nano Chip). V vdolbine za standard velikosti in vzorce na čipu smo najprej nanesli po 5 µl reagenta Agilent RNA 6000 Nano Marker in nato v iste vdolbine po 1 µl standarda velikosti oziroma vzorcev. Čip smo z vorteksiranjem premešali in vstavili v aparaturo Agilent 2100 Bioanalyzer. Podatke smo analizirali s programom 2100 Expert Software.

Sinteza cDNA

3.2.3 Po izolaciji smo celokupno RNA prepisali v komplementarno DNA (cDNA), ki predstavlja matrico za pomnoževanje med kvantitativnim PCR v realnem času (qPCR). Sintezo smo izvedli z oligonukleotidnimi začetniki oligo-dT, ki se vežejo na poli-A rep mRNA, kar predstavlja začetek reverzne transkripcije.

Za sintezo cDNA smo uporabili komplet Transcriptor First Strand cDNA synthesis kit (Roche, ZDA): mešanico iz celokupne RNA, oligo(dT)₁₂ in dH₂O smo inkubirali v termobloku za 10 min na 65 °C, nato pa dodali pripravljeno mešanico za RT-PCR: 4 µl RT-PCR pufra (5X; končna conc. 8 mM MgCl₂), 0,5 µl Protector RNA inhibitorja (40 U/µl; končna conc. 20 U), 2 µl mešanice deoksiribonukleotidov (10 mM; končna conc. 1 mM) in 0,5 µl Transcriptor RNA transkriptaze (20 U/µl; končna conc. 10 U). Po kratkem centrifugiranju smo mešanico prenesli v GeneAmp PCR system 9600 (Perkin Elmer, ZDA) in jo inkubirali 60 min na 50 °C. Reakcijo smo zaustavili z inkubacijo v termobloku na 85 °C za 5 min, sintetizirano cDNA smo shranili na -20 °C do uporabe.

3.2.4

Verižna reakcija s polimerazo

Z verižno reakcijo s polimerazo smo v cDNA celične kulture MCF-7 pri času 0 min preverili prisotnost tarčnih genov EPO, EPOR, EPORT ter EPORS in kontrolnih genov TOP1, UBC, YWHAZ; SDH1, 18S, SF3A1.

Za tarčne gene smo uporabili 25 ng cDNA vzorca, 12,5 µl 2 x PCR Master Mix (Promega), 2 µl 5 µM oligonukleotidni začetnik F, 2 µl 5 µM oligonukleotidni začetnik R, 0,5 µl cDNA in 8 µl dH₂O.

Reakcijska mešanica za 25 ng cDNA vzorca za referenčne gene pa je vsebovala 1 µl PCR Master Mix (Promega), 1 µl Primer Mix (geNorm), 1 µl cDNA in 11 µl dH₂O.

Verižno reakcijo s polimerazo smo izvedli pri pogojih navedenih v preglednici 1.

Preglednica 1: Pogoji reakcije PCR za sintezo cDNA

1. denaturacija:
○ 94 °C, 3 min
2. amplifikacija:
○ 94 °C, 30 s
○ 60 °C, 30 s,
○ 72 °C, 1 min
3. elongacija:
○ 72 °C, 7 min
4. ohlajanje:
○ 4 °C

Po končani reakciji smo vzorec shranili na -20 °C do nadaljnje uporabe (za agarozno gelsko elektroforezo).

Agarozna gelska elektroforeza

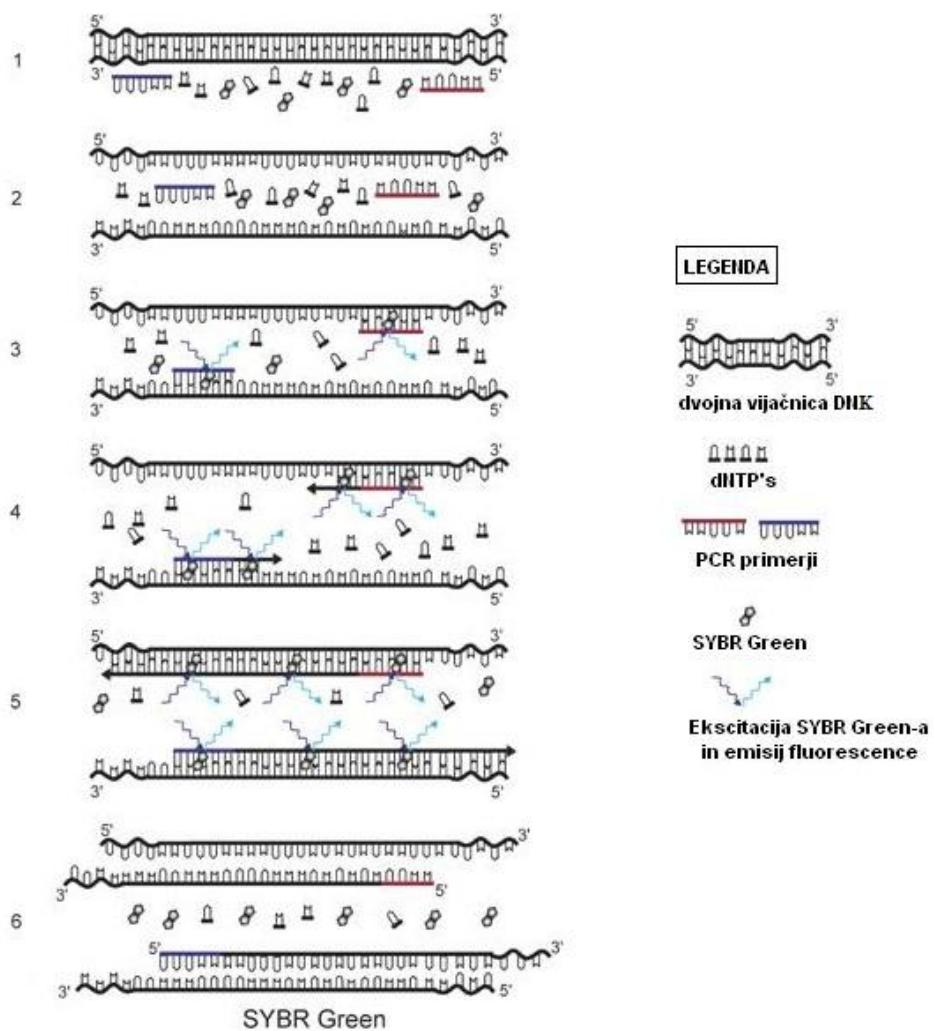
3.2.5 Agarozno gelsko elektroforezo smo uporabili za analizo produktov verižne reakcije s polimerazo. Gel smo pripravili s segrevanjem raztopine agaroze v 1× TAE pufru. Fragmente DNA (produkti PCR) smo ločevali na 2,0-odstotnem agaroznem gelu pri 85 W (45 min). Vzorcem DNA smo pred nanosom na gel dodali DNA nanašalni pufer (6×) v razmerju 1:5 (v/v). Po končani elektroforezi smo gel namakali v raztopini EtBr (0,5 µg/ml) in DNA opazovali na UV transiluminatorju. Za arhiviranje gelov smo uporabljali sistem UVItec (UVItec Limited, V.B.).

3.2.6 *Merjenje izražanja genov s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času*

S poskusi kvantitativnega PCR v realnem času (qPCR) smo primerjali izražanje izbranih genov eritropoetinskega receptorja v tumorskih in normalnih celicah, akutno in kronično tretiranih z rekombinantnim humanim eritropoetinom (rHuEpo) ter v humani referenčni celokupni RNA (Stratagene, Agilent Technologies, ZDA).

Princip metode kvantitativne verižne reakcije s polimerazo temelji na detekciji pomnoženega zaporedja DNA med samo reakcijo PCR (Slika 14). Od začetnega števila kopij tarčnega zaporedja nukleinske kisline je odvisno, koliko ciklov bo potrebnih, da zaznamo fluorescenco poročevalske molekule (Bustin, 2005), v našem primeru barvila SYBR Green I, ki se vrne v dvovijačno DNA in močno fluorescira. V tej fazи fluorescensa produkta preseže fluorescenco ozadja. Tu določimo linijo prazne vrednosti, ki predstavlja intenziteto fluorescence, ki je značilno različna od fluorescence ozadja. Nato za vsak vzorec določimo cikel, ko krivulja preseže nastavljen prag, ang. »threshold cycle« (Ct vrednost). To je točka prehoda (Cp, ang. »crossing point«) reakcije PCR, kjer doseže fluorescensa reakcije maksimum drugega odvoda amplifikacijske krivulje, ki ustreza točki, ko je fluorescentni signal največji.

Vezava je nespecifična, zato lahko zaznamo tudi nespecifične produkte in dimere oligonukleotidnih začetnikov, kar preverimo z analizo disociacijske krivulje po zadnjem ciklu PCR (Wong, 2005).



Slika 14: Pomnoževanje DNA z uporabo fluorescentnega označevalca SYBR Green

Pomnoževanje DNA z uporabo fluorescentnega označevalca SYBR Green (SG) (prikaz pomnoževanja ene verige DNA): stopnja 1 – prileganje začetnih oligonukleotidov na denaturirano DNA, SYBR Green prost v raztopini; stopnji 2 in 3 – podaljševanje in postopna vezava SYBR Green-a v dvojno vijačnico (prirejeno po Silva, 2003).

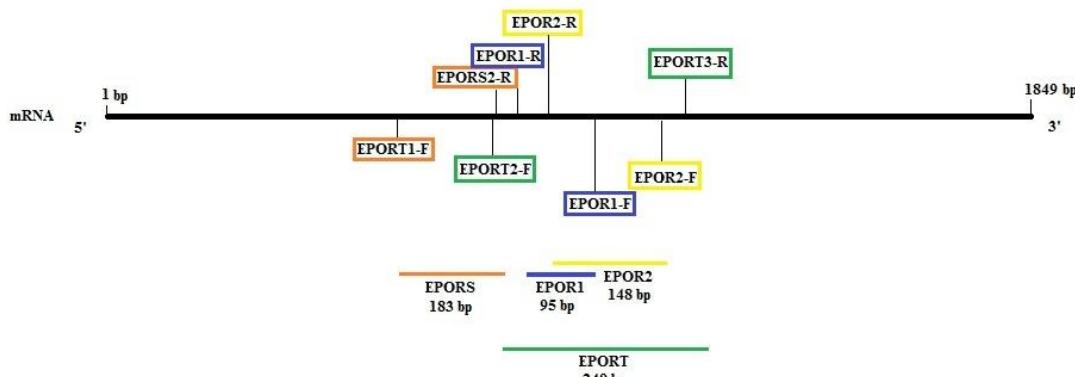
Za merjenje izražanja genov EPOR smo metodo predhodno optimizirali: uporabili smo smerne in protismerne oligonukleotidne začetnike (Preglednica 2) za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij tarčnih in referenčnih genov; določili smo ustrezne koncentracije oligonukleotidnih začetnikov in cDNA, temperaturo naleganja oligonukleotidnih začetnikov ter čas pomnoževanja pri 50 °C. Reakcije qPCR smo izvajali v cikličnem termostatu LightCycler 480 II in meritve spremljali s programom LightCycler 480 SW, Ver. 1.5 (Roche Applied Science, ZDA).

Za pripravo reakcijskih mešanic smo uporabili komplet LightCycler 480 SYBR Green I Master, 2x conc. (Roche Applied Science, ZDA). Ta je vseboval DNA-polimerazo FastStart Taq DNA Polymerase, reakcijski pufer, 2'-deoksinukleozid trifostate, barvilo SYBR Green I in MgCl₂. Pripravo reakcijskih mešanic in reakcije qPCR smo izvajali v skladu z navodili proizvajalca kompleta in aparature.

Preglednica 2: Začetni oligonukleotidi in, njihove lastnosti

Oligonukleotidni začetnik	Nukleotidno zaporedje	Dolžina pomnoženega zaporedja cDNA[bp]
EPOR1 F	CAGGCCAGATCTTCTGCTTC	95
EPOR1 R	GACGCTCTCCCTCATCCTC	
EPOR2 F	GCTGGAAGTTACCCTTGTGG	148
EPOR2 R	CTCATCCTCGTGGTCATCCT	
EPORT F	GGTCCAGGTCGCTAGGCGTCAG	249
EPORT R	TGCTTCTTGCAAGCAAATGCG	
EPORS-F	CTCCACCCCTCTGTACGCTCCCTGC	183
EPORS-R	ACGCCTAGCGGGCTCTGAAGC	

Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje zaporedja genov EPOR1, EPOR2, EPORT in EPORS: ime oligonukleotidnega začetnika, nukleotidno zaporedje za smerni (F) in protismerni ® oligonukleotidni začetnik ter dolžina pomnoženega zaporedja (bp).



Slika 15: Shematski prikaz vezavnih mest začetnih oligonukleotidov na mRNA EpoR

Oligonukleotidne začetnike za kontrolne gene TOP1, UBC, YWHAZ, SDH1, 18S in SF3A1 smo uporabili iz kompleta Human geNorm-kit 6 SYBR Green gene detection (PrimerDesign, VB). Proizvajalec ne navaja zaporedja oligonukleotidnih začetnikov in mesta njihove vezave.

Reakcijska mešanica je vsebovala avtoklavirano ultračisto vodo, reagent SYBR Green I Master ter smerni (F) in protismerni (R) oligonukleotidni začetnik (Preglednica 2). Pripravljeno reakcijsko mešanico smo premešali z vorteksiranjem in kratko centrifugirali. Po 17 ul reakcijske mešanice najprej nanesli v vdolbinice na mikrotitrski ploščici s 96 luknjicami (LightCycler480 Multiwell Plate 348, Roche Applied Science, ZDA) in dodali po 3 ul vzorca cDNA različnih koncentracij (0,016 ng/µl, 0,08 ng/µl, 0,4 ng/µl, 2 ng/µl, 10 ng/µl). Vse skupaj smo pokrili s folijo, ploščico vorteksirali na vibracijskem mešalniku in 0,5 min centrifugirali na 1200 obr./min. Nato smo po 5 µl reakcijske mešanice v treh paralelkah odpipetirali na mikrotitrsko ploščico s 384 vdolbinicami. Za vsako reakcijsko mešanico na ploščici smo izvedli tudi slepo reakcijo, pri kateri smo namesto cDNA k reakcijski mešanici dodali avtoklavirano ultračisto vodo. Ploščico smo pokrili s prozorno samolepljivo folijo (LightCycler 480 Sealing Foil, Roche Applied Science, ZDA), jo centrifugirali 1 min pri 1.800 obr./min in dali v ciklični termostat ter določili pogoje reakcije qPCR za pomnoženo zaporedje (Preglednica 3). Po reakciji smo vzorce shranili na -20 °C.

Preglednica 3: Pogoji reakcij qPCR

1. Predinkubacija
<ul style="list-style-type: none"> • 95 °C, 5 min, 4,8 °C/s
2. Amplifikacija 40 ciklov, kvantifikacija:
<ul style="list-style-type: none"> • denaturacija – razklenitev verig DNA: 95 °C, 10 s, 4,8 °C/s • vezava oligonukleotidnega začetnika - prileganje: 64 °C, 10 s, 2,5 °C/s • elongacija - podaljševanje: 72 °C, 10 s, 4,8 °C/s
3. Talilna krivulja
<ul style="list-style-type: none"> • 95 °C, 5 s, 4,8 °C/s • 65 °C, 1 min, 2,5 °C/s • 97 °C, 0,11 °C/s
4. Ohlajanje
<ul style="list-style-type: none"> • 40 °C, 30 s, 2,5 °C/s

Pogoji reakcij qPCR za določanje pomnoženih zaporedij genov.

Z metodo absolutne kvantifikacije (Absolute Quantification Analysis), ki jo ponuja program LightCyclerR 480 SW, Ver. 1.5 (Roche Applied Science, ZDA), smo določili posamezne vrednosti Ct treh paralelnih vzorcev cDNA ter izračunali povprečno vrednost Ct za vsak tarčni in referenčni gen.

Za relativno kvantifikacijo izražanja genov smo morali zadostiti pogoju, da je učinkovitost izražanja tarčnih in referenčnih genov primerljiva.

Netretiran vzorec cDNA celičnih linij MCF-7, MCF-10A in kontrolne celokupne RNA Stratagene smo serijsko redčili z avtoklavirano ultračisto vodo in pripravili pet redčitev cDNA (10 ng/µl, 2 ng/µl, 0,4 ng/µl, 0,08 ng/µl in 0,016 ng/µl). Vzorce smo nanesli na mikrotitrsko ploščico v trojnikih (po 3 µl) in v vsako vdolbino dodali po 17 µl reakcijske mešanice. Reakcijo qPCR za določitev umeritvene krivulje smo izvajali pri enakih pogojih kot optimizirano reakcijo qPCR (Preglednica 3).

Izračunali smo povprečne vrednosti Ct za vsako koncentracijo cDNA ter s programom GraphPad Prism narisali umeritvene krivulje za tarčne in referenčne gene pri celičnih linijah MCF-7, MCF-10A in kontrolni celokupni RNA Stratagene. Umeritvene krivulje so linearne regresijske premice, ki prikazujejo povprečne vrednosti Ct v odvisnosti od logaritma koncentracije cDNA (log c). Iz naklona umeritvene krivulje (k) smo izračunali učinkovitost (E) izražanja po enačbah:

$$e = 10^{-1/k} \quad \dots (2)$$

$$E = e - 1 \quad \dots (3)$$

Za statistično vrednotenje vrednosti Ct in učinkovitosti pomnoževanja tarčnih in referenčnih genov smo uporabili program Rest2009 (Pfaffl et al., 2002), ki analizira podatke o izražanju genov, dobljenih s poskusi kvantitativne verižne reakcije v realnem času. Program nam pove, ali se je izražanje genov različnih oblik eritropoetinskega receptorja povišalo ali znižalo ter nam to poda z grafičnim prikazom (Whiskers-box plot). Program Rest2009 uporabi matematični model, ki upošteva različne učinkovitosti tarčnih in referenčnih genov. Razmerje izračuna po enačbi 4:

$$\text{razmerje izražanja} = \frac{E(\text{tarčni gen})^{\Delta Ct(\text{tarčni gen})}}{E(\text{referenčni gen})^{\Delta Ct(\text{referenčni gen})}} \quad \dots(4)$$

Pri čemer je:

$\Delta Ct(\text{tarčni gen})$ = povprečna vrednost kontrole – povprečna vrednost vzorca tar. gena

$\Delta Ct(\text{referenčni gen})$ = povprečna vrednost kontrole – povprečna vrednost vzorca ref. gena

V primerjavi z uporabo enega samega referenčnega gena, dobimo z uporabo večjega števila referenčnih genov (v našem primeru treh) zanesljivejše rezultate.

Med seboj smo primerjali različne vzorčne in kontrolne skupine ter po vnosu podatkov v Rest2009 dobili vrednosti za razmerje izražanja - vrednosti, ki nam povedo, za kolikokrat se je izražanje posameznega gena za posamezen čas vzorčne skupine spremenilo glede na kontrolno skupino.

3.3 BIOKEMIJSKE METODE

Priprava proteinских lizatov

3.3.1 Kronično in akutno izpostavljenim celicam rHuEpo (glej poglavje 3.1.5) smo odstranili medij in jih s 50 U rHuEpo/ml inkubirali 0 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h in 4 h na 37 °C.

Po tretiranju smo pripravili proteinske lizate. Uporabili smo naslednje reagente: MOPS/EGTA pufer (20 mM/2 mM) (pH = 7.0), proteazni inhibitor Complete (Roche) 25 x stock v MOPS/EGTA, fosfatazni inhibitor PhosStop (Roche) 10 x stock v MOPS/EGTA, 1 mM DTT (20 mM), 5 mM pepstatin A, 1-odstotni Triton X-100.

Celicam smo najprej odstranili medij in jih 2x sprali s HBSS. Dodali smo pufer za lizo celic in celice spraskali v pufer za lizo celic ter jih s pipeto prenesli v sterilne epice. Za tem smo celice sonificirali na ledu 4 x po 10 s z vmesnimi 10 s odmori. Sledilo je centrifugiranje na Kontron centrifugi na 35.000 obr./min, 30 min na 4 °C.

Supernatant smo prenesli v 1,5 ml sterilne krioviale, jih zalepili s parafilmom in shranili na -80 °C za nadaljnje raziskave na proteinских čipih.

3.3.2

Določanje koncentracije proteinov po Bradfordu

Vsebnost proteinov v proteinских lizatih smo določali s pomočjo metode po Bradfordu (Bradford, 1976).

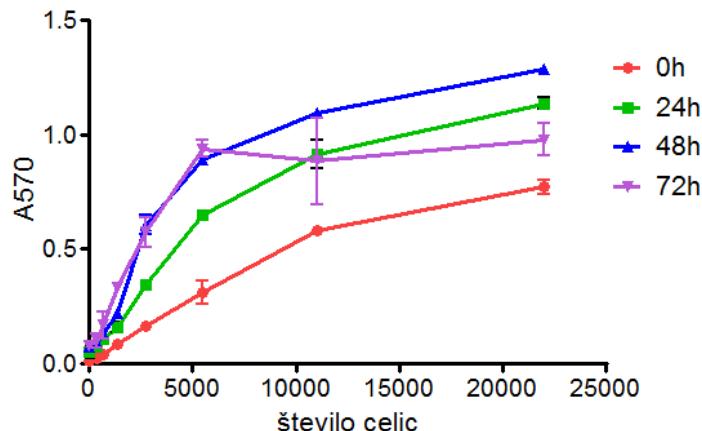
K 50 µl ustrezno razredčenega vzorca smo dodali 1500 µl Coomassie Plus (Bradford) Protein Assay reagenta (Thermo Scientific, ZDA). Po 10 min smo odčitali absorbanco s spektrofotometrom (UV1101 Biotech Photometer) pri valovni dolžini 595 nm proti slepemu vzorcu, ki je vseboval le vodo. Uporabljali smo plastične kivete (1=1 cm).

Koncentracijo proteinov smo določili s pomočjo umeritvene krivulje, ki smo jo naredili z BSA (goveji serumski albumin, Pierce) v območju koncentracije 0 – 2.000 µg/ml BSA.

4 REZULTATI

4.1 TEST MTT

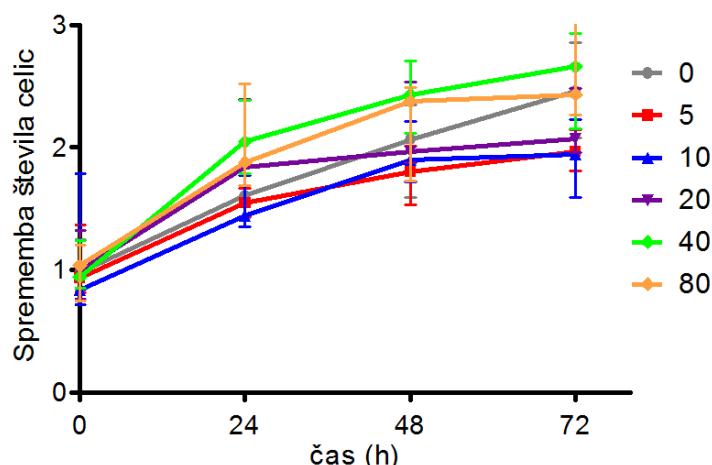
Pri ugotavljanju optimalnega števila celic za poskuse smo uporabili naslednje število celic: 344, 688, 1.375, 2.750, 5.500, 11.000 in 22.000 celic/luknjico v šestih paralelkah. Na sliki 16 prikazujemo vrednosti absorbance pri 570 nm v odvisnosti od števila nasajenih celic MCF-7. Število celic na luknjico smo preverjali po 24 h, 48 h in 72 h.



Slika 16: Absorbanca pri 570 nm v odvisnosti od števila nasajenih celic MCF-7 in inkubacijskega časa

Vsaka točka predstavlja povprečje 6 paralelek \pm SE.

S testom MTT smo v nadaljevanju preverili akutni in kronični vpliv rHuEpo na proliferacijo celic MCF-7 in MCF-10A po 24 h, 48 h oz. 72 h (Slika 17, 18 in 19). Testirali smo naslednje koncentracije rHuEpo: 0, 5, 10, 20, 40 in 80 U rHuEpo/ml. Rezultate smo obdelali s programom GraphPad Prism in jih ovrednotili s statističnim testom Two-way ANOVA, Bonferroni posttests (statistična obdelava za obe celični liniji je prikazana v preglednici 18 v prilogi A).

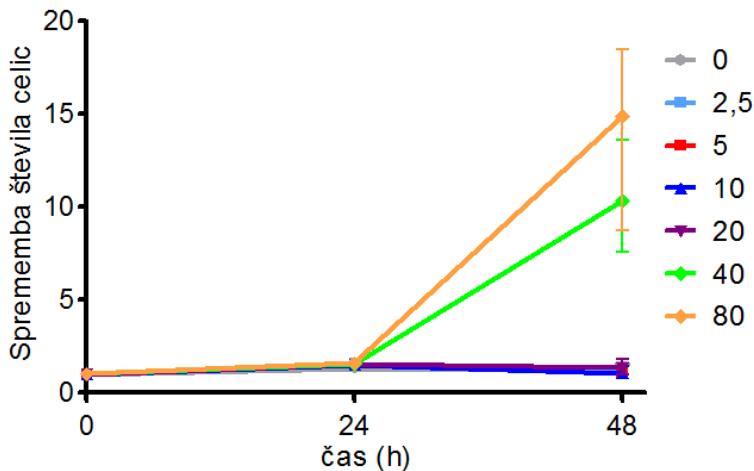


Slika 17: Grafični prikaz, za kolikokrat se spremeni število celic v odvisnosti od akutne izpostavitve celic MCF-7 različnim koncentracijam rHuEpo za 24 h, 48 h in 72 h

Sprememba števila celic je podana relativno glede na kontrolo (netretirana celična linija MCF-7). Vsaka točka predstavlja povprečje 6 paralelek \pm SE.

Pri akutni izpostavitvi celične linije MCF-7 različnim koncentracijam rHuEpo lahko po primerjavi s kontrolo (netretirane celice) pri vzorcih 5 U rHuEpo/ml ($P<0,01$), 10 U rHuEpo/ml ($P<0,001$) in 20 U rHuEpo/ml ($P<0,05$) opazimo upad števila celic, ki je statistično značilen pri 72 h.

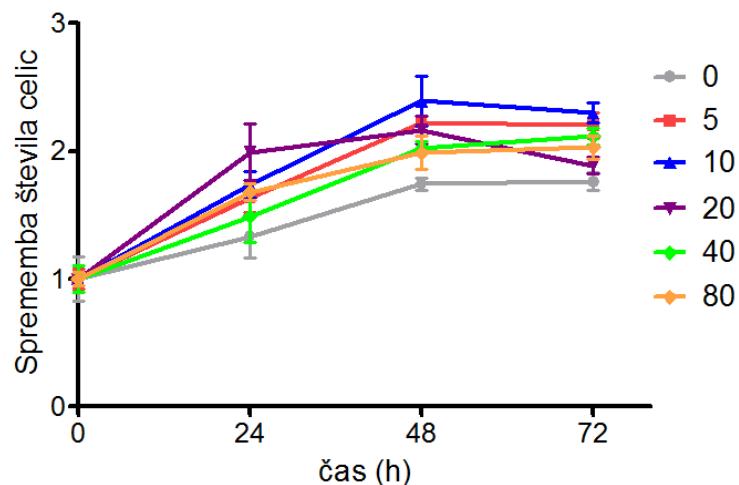
Pri višjih koncentracijah, 40 U rHuEpo/ml ($P<0,01$) in 80 U rHuEpo/ml ($P<0,05$) se v primerjavi z netretiranimi celicami po 24 h statistično poveča število celic, prav tako po 48 h pri koncentraciji 40 U rHuEpo/ml ($P<0,05$).



Slika 18: Grafični prikaz, za kolikokrat se spremeni število celic v odvisnosti od akutne izpostavitve celic MCF-10A različnim koncentracijam rHuEpo za 24 h in 48 h

Sprememba števila celic je podana relativno glede na kontrolo (netretirana celična linija MCF-10A). Vsaka točka predstavlja povprečje 6 paralelk \pm SE.

Tudi celično linijo MCF-10A smo akutno izpostavili različnim koncentracijam rHuEpo in po 48 h opazili statistično značilno močno povečano število celic pri višjih koncentracijah 40 U rHuEpo/ml ($P<0,001$) in 80 U rHuEpo/ml ($P<0,001$) v primerjavi z netretiranimi celicami, tudi do 10-krat oz. 15-krat.



Slika 19: Grafični prikaz, za kolikokrat se spremeni število celic v odvisnosti od kronične izpostavitve celic MCF-7 5 U rHuEpo/ml za deset tednov in nadaljnjega tretiranja z različnimi koncentracijami rHuEpo za 24 h, 48 h in 72 h

Sprememba števila celic je podana relativno glede na kontrolo (netretirana celična linija MCF-7). Vsaka točka predstavlja povprečje 6 paralelk \pm SE.

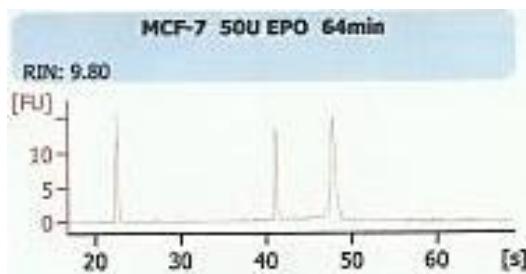
Pri celični liniji MCF-7, ki smo jo kronično tretirali z rHuEpo, se statistično značilno poveča število celic pri nižjih koncentracijah rHuEpo (za cca. 2-krat), medtem ko je pri višjih koncentracijah učinek na rast celic sicer prisoten, a ta ni statistično značilen.

4.2 IZOLACIJA IN ANALIZA CELOKUPNE RNA

Celični liniji MCF-7 in MCF-10A smo kronično izpostavili 5 U rHuEpo/ml za 6 tednov. Izolacijo celokupne RNA iz MCF-7 celic smo opravili vsak teden, izolacijo RNA iz celic MCF-10A pa zaradi počasne rasti celic vsaka dva tedna.

Da bi preveriti odzivnost celic po daljši izpostavitvi nizkim koncentracijam rHuEpo, smo kronično tretirane celic (5 U rHuEpo/ml) MCF-7 oz. MCF-10A za 8-minut izpostavili 50 U rHuEpo/ml in iz njih izolirali celokupno RNA.

S pomočjo Bioanalizatorja 2100 (Agilent, ZDA) smo določili koncentracijo celokupne RNA ter preverili njeno integriteto in kvaliteto. Rezultati analize so zbrani v prilogi B. Primer analize celokupne RNA izolirane iz celic MCF-7 po 64-minutnem tretiranju s 50 U rHuEpo/ml je prikazan na sliki 20.



Slika 20: Primer elektroferograma kapilarne elektroforeze (Bioanalizer 2100) celokupne RNA

Primer elektroferograma kapilarne elektroforeze (BioAnalyzer) celokupne RNA, izolirane iz vzorca celic MCF-7, izpostavljenih 50 U rHuEpo za 64 min.

4.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR)

Celokupno RNA, izolirano iz celic MCF-7 oz. MCF-10A, smo uporabili za sintezo cDNA s kompletom Transcriptor First Strand cDNA Synthesis in oligonukleotidnimi začetniki oligo-dT. cDNA smo nato uporabili kot matrico v verižni reakciji s polimerazo, da bi potrdili prisotnost tarčnih genov EPO, EPOR, EPORT ter EPORS in kontrolnih genov TOP1, UBC, YWHAZ; SDH1 in SF3A1.

Produkte verižne reakcije s polimerazo smo analizirali z agarozno gelsko elektroforezo (Slika 21)



Slika 21: Analiza prisotnosti tarčnih in referenčnih genov

Agarozna gelska elektroforeza za potrditev prisotnosti tarčnih in referenčnih genov v cDNA (25 ng) izolirani iz netretirane celične linije MCF-7. Označbe EPO1 in EPO2 oz. EPOR1 in EPOR2 smo uporabili za vzorce, pomnožene z različnimi oligonukleotidnimi začetniki (glej sliko 14).

4.4 MERJENJE IZRAŽANJA GENOV S KVANTITATIVNO VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO V REALNEM ČASU

Za določanje izražanja genov za eritropoetinski receptor smo celice MCF-7 in MCF-10A akutno in kronično izpostavili rHuEpo (glej poglavje 3.1.5).

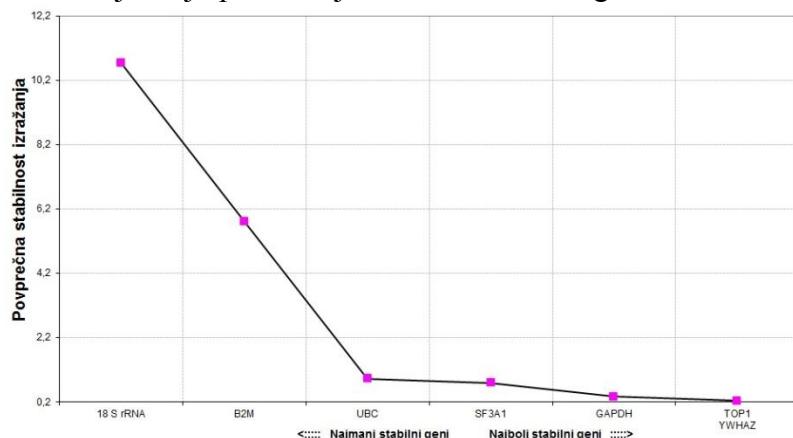
Relativno izražanje genov smo spremljali z metodo qPCR. Za natančno relativno kvantifikacijo smo podatke normalizirali glede na izražanje referenčnih genov, ki se izražajo enako ne glede na eksperimentalne pogoje.

Iskanje primernih referenčnih genov za normalizacijo izražanja genov s programom geNorm

Program geNorm (Vandesompele et al., 2002) smo uporabili za določitev najbolj stabilnih genov iz nabora potencialnih referenčnih genov v danem vzorcu. Z njim lahko za vsak

vzorec izračunamo faktor za normalizacijo izražanja genov, ki temelji na geometrični sredini izbranih referenčnih genov.

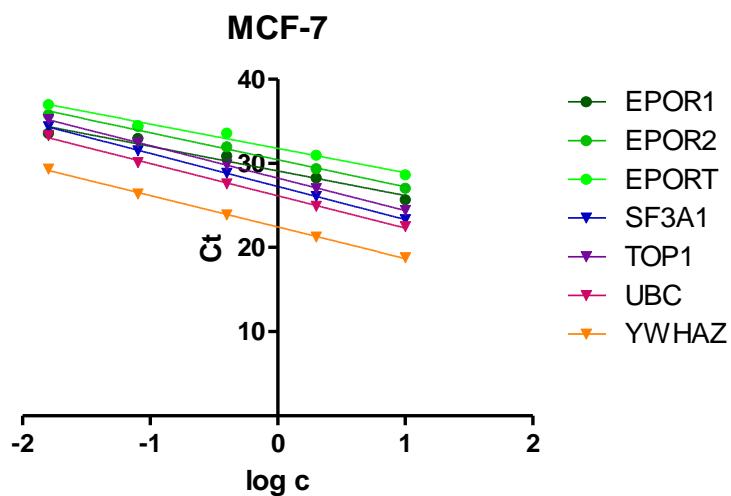
Testirali smo sedem referenčnih genov (GAPDH, SF3A1, TOP1, UBC, YWHAZ, 18S rRNA in B2M), od katerih so se za normalizacijo najbolj stabilni izkazali SF3A1, GAPDH in TOP1. Ti so v nadaljevanju predstavljeni naše referenčne gene.



Slika 22: Povprečna stabilnost izražanja (M) kontrolnih genov v enem od vzorcev

4.4.2 Učinkovitost pomnoževanja tarčnih genov v celični liniji MCF-7, MCF-10A in kontrolni celokupni RNA

Na podlagi vrednosti Ct petih razredčitev cDNA za celično linijo MCF-7, MCF-10A in kontrolno celokupno RNA Stratagene smo v programu GraphPad Prism narisali umeritvene krivulje za tarčne in referenčne gene. Iz naklona linearne regresijske premice smo izračunali učinkovitost (E) izražanja po enačbah 2 in 3 (poglavlje 3.2.6).



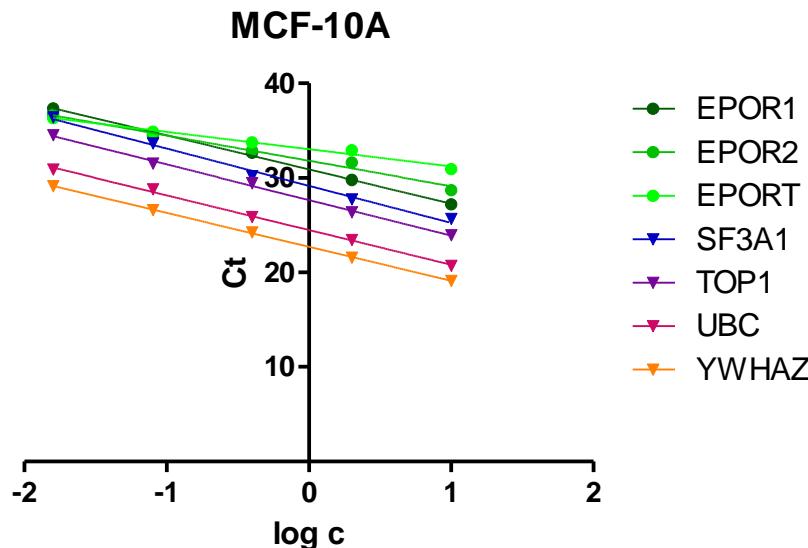
Slika 23: Umeritvene krivulje za posamezne gene pri celični liniji MCF-7

Umeritvene krivulje za posamezne gene pri celični liniji MCF-7, kjer je na x-osi logaritem koncentracije ($\log c$), na y-osi pa povprečje treh vrednosti Ct za vsak gen.

Preglednica 4: Vrednosti povprečnega Ct za posamezne gene pri celični liniji MCF-7 in izračun učinkovitosti izražanja

Koncentracija (ng/µl) log(c)	10	2	0,4	0,08	0,016	Linearna regresijska premica	E-učinkovitost (0 < E < 1)				
	1	0,30103	-0,39794	-1,09691	-1,79588	Naklon	1/naklon	$\epsilon = 10^{-1/k}$	E = $\epsilon - 1$	Vrednost y ko je x=0	r ²
EPOR1	25,68	28,28	30,88	32,99	33,58	-2,93 ± 0,34	-0,34	2,19	1,19	29,11 ± 0,36	0,96
EPOR2	27,06	29,38	31,97	34,42	35,79	-3,22 ± 0,18	-0,31	2,05	1,05	30,44 ± 0,19	0,99
EPORT	28,65	30,99	33,61	34,51	/	-2,89 ± 0,38	-0,35	2,22	1,22	31,80 ± 0,30	0,97
SF3A1	23,33	26,08	28,85	31,52	34,38	-3,94 ± 0,02	-0,25	1,79	0,79	27,26 ± 0,02	1,00
TOP1	24,43	27,02	29,85	32,49	/	-3,86 ± 0,04	-0,26	1,81	0,81	28,26 ± 0,04	1,00
UBC	22,49	24,91	27,57	30,13	33,32	-3,85 ± 0,11	-0,26	1,82	0,82	26,15 ± 0,12	1,00
YWHAZ	18,82	21,24	23,87	26,39	29,34	-3,75 ± 0,07	-0,27	1,85	0,85	22,44 ± 0,08	1,00

Ct v tabeli je povprečje treh Ct vrednosti za vsako posamezno koncentracijo.



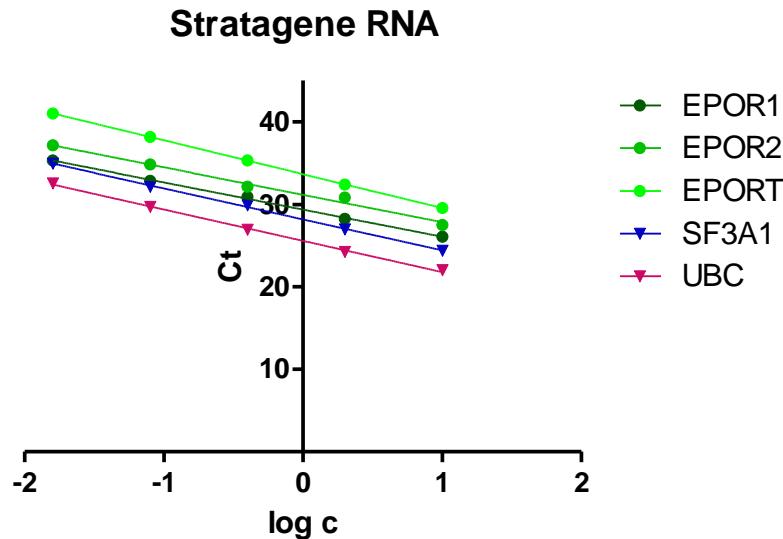
Slika 24: Umeritvene krivulje za posamezne gene pri celični liniji MCF-10A

Umeritvene krivulje za posamezne gene pri celični liniji MCF-10A, kjer je na x-osi logaritem koncentracije (log c), na y-osi pa povprečje treh vrednosti Ct za vsak gen.

Preglednica 5: Vrednosti povprečnega Ct za posamezne gene pri celični liniji MCF-10A in izračun učinkovitosti izražanja

Koncentracija (ng/µl) log(c)	10	2	0,4	0,08	0,016	Linearna regresijska premica	E-učinkovitost (0 < E < 1)				
	1	0,30103	-0,39794	-1,09691	-1,79588	Naklon	1/naklon	$\epsilon = 10^{-1/k}$	E = $\epsilon - 1$	Vrednost y ko je x=0	r ²
EPOR1	27,2	29,77	32,65	34,64		-3,61 ± 0,10	-0,28	1,89	0,89	30,89 ± 0,11	1,00
EPOR2	28,73	31,63		34,43	36,68	-2,68 ± 0,21	-0,37	2,36	1,36	31,80 ± 0,23	0,98
EPORT	30,91	32,91	33,76	34,89		-1,83 ± 0,14	-0,55	3,52	2,52	33,03 ± 0,15	0,98
SF3A1	25,67	27,74	30,19	33,66	36,41	-3,92 ± 0,20	-0,26	1,80	0,80	29,17 ± 0,22	0,99
TOP1	23,95	26,38	29,44	31,5	34,52	-3,76 ± 0,12	-0,27	1,85	0,85	27,66 ± 0,12	1,00
UBC	20,73	23,46	25,88	28,82	30,88	-3,67 ± 0,10	-0,27	1,87	0,87	24,49 ± 0,11	1,00
YWHAZ	19,12	21,59	24,25	26,62	29,15	-3,59 ± 0,03	-0,28	1,90	0,90	22,72 ± 0,03	1,00

Ct v tabeli je povprečje treh Ct vrednosti za vsako posamezno koncentracijo.



Slika 25: Umeritvene krivulje za posamezne gene pri kontrolni celokupni RNA

Umeritvene krivulje za posamezne gene pri kontrolni celokupni RNA Stratagene, kjer je na x-osi logaritem koncentracije ($\log c$), na y-osi pa povprečje treh vrednosti C_t za vsak gen.

Preglednica 6: Vrednosti povprečnega C_t za posamezne gene pri kontrolni celokupni RNA in izračun učinkovitosti izražanja

Koncentracija (ng/ μ l)	10	2	0,4	0,08	0,016	Linearna regresijska premica	E-ucinkovitost (0 < E < 1)					
	log(c)	1	0,30103	-0,39794	-1,09691		Naklon	1/naklon	$\epsilon = 10^{-1/k}$	$E = \epsilon - 1$	Vrednost y ko je $x=0$	r^2
EPOR1	26,08	28,25	30,93	32,87		-3,30 ± 0,08	-0,30	2,01	1,01	29,37 ± 0,08	1,00	
EPOR2	27,51	30,84	32,15			-3,32 ± 0,22	-0,30	2,00	1,00	31,17 ± 0,23	0,99	
EPORT	29,57	32,43				-4,09 ± 0,00	-0,24	1,76	0,76	33,66 ± 0,00	1,00	
SF3A1	24,39	26,99	29,91	32,17		-3,76 ± 0,07	-0,27	1,85	0,85	28,18 ± 0,08	1,00	
TOP1	24,86											
UBC	22,02	24,24	26,93	29,7	32,58	-3,80 ± 0,10	-0,26	1,83	0,83	25,58 ± 0,11	1,00	
YWHAZ	23,86											

C_t v tabeli je povprečje treh C_t vrednosti za vsako posamezno koncentracijo.

Učinkovitosti pomnoževanja zaporedij tarčnih genov EPOR1, EPOR2 in EPORT ter referenčnih genov SF3A1, GAPDH in TOP1 so bile približno enake, zato smo iz umeritvenih krivulj obeh celičnih linij in kontrolne celokupne RNA Stratagene za vsak gen posebej izračunali povprečno učinkovitost (E) (Preglednica 7).

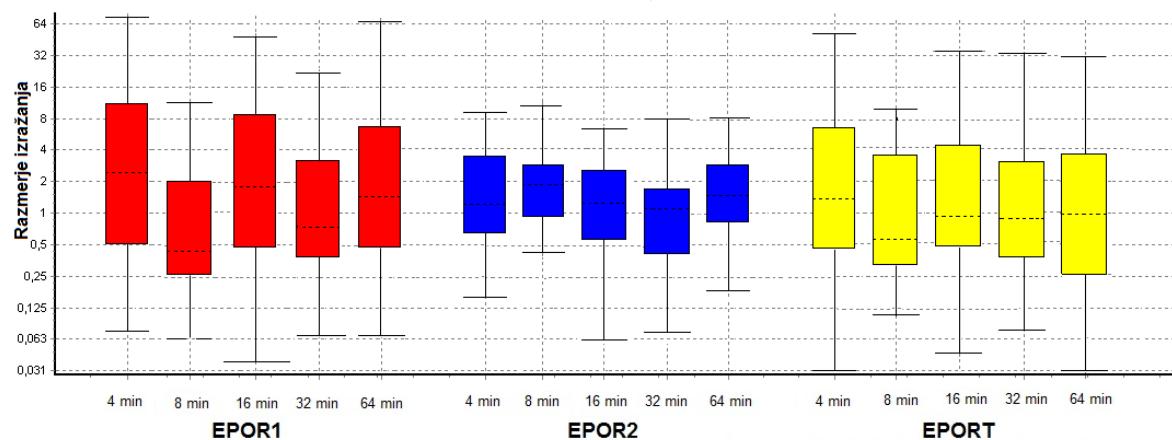
Preglednica 7: Vrednosti učinkovitosti pomnoževanja tarčnih in referenčnih genov za izračun povprečne vrednosti, ki predstavlja učinkovitost (E)

	MCF-7	MCF-10A	Stratagene	Povprečna vrednost	E
EPOR1	1,19	0,89	1,01	1,03	1,00
EPOR2	1,05	1,36	1,00	1,02	1,00
EPORT	1,22	2,52	0,76	0,99	0,99
SF3A1	0,80	0,80	0,85	0,81	0,81
TOP1	0,81	0,85		0,83	0,83
UBC	0,82	0,87	0,83	0,84	0,84
YWHAZ	0,85	0,90		0,87	0,87

Povprečne vrednosti, ki so presegale vrednost 1, pa smo dali na vrednost 1. Vrednosti Ct in učinkovitost pomnoževanja tarčnih in referenčnih genov smo vnesli v program REST 2009 (Pfaffl et al., 2002) in jih statistično ovrednotili (poglavje 4.4.3).

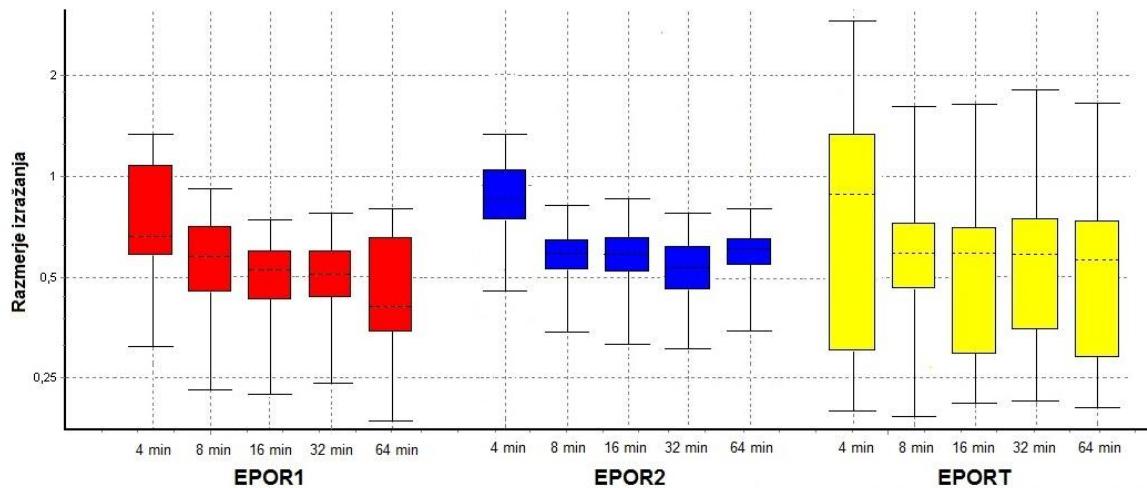
Analiza izražanja genov s programom REST 2009

Program REST 2009 nam je služil pri analizi podatkov o izražanju genov, dobljenih s poskusi kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času. Analizirali smo 4.4. izražanje tarčnih (EPOR1, EPOR2 in EPORT) in referenčnih genov (SF3A1, TOP1 in YWHAZ) v tumorski in normalni celični liniji dojke ter v referenčni celokupni RNA Stratagene. Med seboj smo primerjali tudi izražanje genov po akutnem oz. kroničnem tretiraju s hormonom rHuEpo. Na slikah 26, 27, 28 smo obravnavali celice tretirane z rHuEpo kot vzorčno skupino, medtem ko so netretirane celice predstavljale kontrolno skupino.



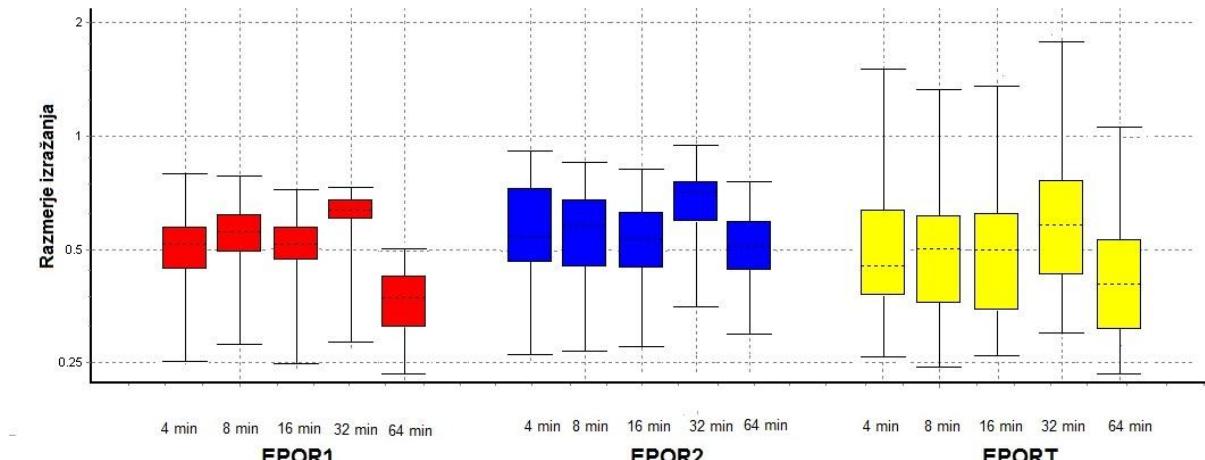
Slika 26: Razmerje izražanja genov EPOR1, EPOR2 in EPORT pri celični liniji MCF-10A po akutni izpostavitvi rHuEpo za različne čase

»Boxes« predstavljajo interkvartilni razpon ali sredino, 50 odstotkov vrednosti. Prekinjena črta predstavlja mediano izražanja genov. »Whiskers« predstavljajo najnižjo in najvišjo vrednost.



Slika 27: Razmerje izražanja genov EPOR1, EPOR2 in EPORT pri celični liniji MCF-7 po akutni izpostavitvi rHuEpo za različne čase

»Boxes« predstavljajo interkvartilni razpon ali sredino, 50 odstotkov vrednosti. Prekinjena črta predstavlja mediano izražanja genov. »Whiskers« predstavljajo najnižjo in najvišjo vrednost.



Slika 28: Razmerje izražanja genov EPOR1, EPOR2 in EPORT pri celični liniji MCF-7 po kronični izpostavitvi rHuEpo za različne čase

»Boxes« predstavljajo interkvartilni razpon ali sredino, 50 odstotkov vrednosti. Prekinjena črta predstavlja mediano izražanja genov. »Whiskers« predstavljajo najnižjo in najvišjo vrednost.

V nadaljevanju smo s pomočjo programa REST 2009 glede na izražanju tarčnih genov EPOR1, EPOR2 in EPORT med seboj primerjali še različne vzorčne in kontrolne skupine (Preglednice 8, 9, 10, 11, 12, 13 in 14). Odebeljene vrednosti nam povedo, za kolikokrat se je izražanje posameznega gena za posamezen čas vzorčne skupine spremenilo glede na kontrolno skupino. Simbol \uparrow oz. \downarrow pomeni, ali se je glede na kontrolno skupino izražanje gena v vzorčni skupini statistično značilno povišalo ali znižalo. V primeru, da statistično značilnih razlik v izražanju gena med obema skupinama ni, je simbol odsoten.

Preglednica 8: Primerjava izražanja tarčnih genov v netretiranih celicah MCF-10A (vzorčna skupina) in celicah MCF-10A, ki so bile šest tednov izpostavljene 5 oz. 50 U rHuEpo/ml (kontrolna skupina)

	EPOR1	EPOR2	EPORT
2 tedna/5U	3,09 S.E. P(H1)	3,90 1,75 - 7,38 0,00 \uparrow	1,01 0,23 - 5,39 0,98
4 tedni/5U	1,69 S.E. P(H1)	2,66 1,14 - 5,17 0,01 \uparrow	1,44 0,29 - 7,56 0,60
6 tednov/5U	2,28 S.E. P(H1)	2,66 1,32 - 5,61 0,02 \uparrow	0,98 0,26 - 5,86 0,98
2 tedna/50U	3,52 S.E. P(H1)	5,48 2,21 - 13,26 0,00 \uparrow	1,76 0,45 - 9,71 0,42
4 tedni/50U	1,48 S.E. P(H1)	3,52 1,64 - 7,60 0,01 \uparrow	0,85 0,20 - 4,77 0,80
6 tednov/50U	0,63 S.E. P(H1)	3,43 1,60 - 6,78 0,00 \uparrow	0,64 0,14 - 3,20 0,48

S.E. = standardna napaka, P(H1)= verjetnost alternativne hipoteze, da je razlika med vzorčno in kontrolno skupino samo posledica naključja.

Preglednica 9: Primerjava izražanja tarčnih genov v netretiranih celicah MCF-7 (vzorčna skupina) in celicah, ki so bile šest tednov izpostavljene 5 oz. 50 U rHuEpo/ml (kontrolna skupina)

	<i>EPOR1</i>	<i>EPOR2</i>	<i>EPORT</i>
1 teden 5 U	0,66 S.E. P(H1)	0,62 0,51 - 0,74 0,00 ↓	1,11 0,86 - 1,58 0,67
2 tedna 5 U	3,55 S.E. P(H1)	2,00 1,65 - 2,36 0,00 ↑	4,29 3,40 - 6,21 0,00 ↑
3 tedni 5 U	0,95 S.E. P(H1)	0,73 0,61 - 0,86 0,00 ↓	1,37 1,06 - 2,02 0,03 ↑
4 tedni 5 U	0,71 S.E. P(H1)	0,69 0,58 - 0,82 0,00 ↓	1,14 0,88 - 1,61 0,53
5 tednov 5 U	1,00 S.E. P(H1)	1,00 0,83 - 1,20 0,98	1,46 1,14 - 2,09 0,00 ↑
6 tednov 5 U	1,01 S.E. P(H1)	0,91 0,76 - 1,08 0,43	1,50 1,19 - 2,18 0,00 ↑
1 teden 50 U	0,62 S.E. P(H1)	0,29 0,23 - 0,34 0,00 ↓	0,87 0,67 - 1,23 0,37
2 tedna 50 U	1,23 S.E. P(H1)	0,91 0,73 - 1,11 0,45	1,42 1,10 - 2,02 0,01 ↑
3 tedni 50 U	0,88 S.E. P(H1)	0,32 0,26 - 0,37 0,00 ↓	1,00 0,78 - 1,42 1,00
4 tedni 50 U	0,68 S.E. P(H1)	0,28 0,23 - 0,35 0,00 ↓	0,55 0,43 - 0,81 0,01 ↓
5 tednov 50 U	0,45 S.E. P(H1)	0,48 0,40 - 0,56 0,00 ↓	0,56 0,41 - 0,78 0,01 ↓
6 tednov 50 U	1,21 S.E. P(H1)	0,39 0,31 - 0,50 0,00 ↓	1,10 0,83 - 1,55 0,72

S.E. = standardna napaka, P(H1)= verjetnost alternativne hipoteze, da je razlika med vzorčno in kontrolno skupino samo posledica naključja.

Preglednica 10: Primerjava izražanja tarčnih genov v celicah MCF-10A, ki so bile šest tednov izpostavljene 5 U rHuEpo/ml (kontrolna skupina), in tarčnih genov v kronično tretiranih celicah MCF-10A, ki smo jih vsaka dva tedna izpostavili 50 U rHuEpo/ml (vzorčna skupina)

	EPOR1	EPOR2	EPORT
2 tedna	1,14	1,40	1,75
S.E.	0,61 - 1,91	0,75 - 2,87	0,60 - 4,65
P(H1)	0,74	0,23	0,20
4 tedne	0,87	1,33	0,60
S.E.	0,46 - 1,65	0,79 - 2,05	0,28 - 1,50
P(H1)	0,64	0,22	0,17
6 tednov	0,28	0,29	0,65
S.E.	0,10 - 0,79	0,86 - 1,84	0,39 - 1,06
P(H1)	0,03 ↓	0,18	0,09

S.E. = standardna napaka, P(H1)= verjetnost alternativne hipoteze, da je razlika med vzorčno in kontrolno skupino samo posledica naključja.

Preglednica 11: Primerjava izražanja tarčnih genov pri celicah MCF-7 po kronični izpostavitvi 5 U rHuEpo za šest tednov (kontrolna skupina) in kronično tretiranih celic MCF-7, ki smo jih vsak teden izpostavili 50 U rHuEpo/ml (vzorčna skupina)

	EPOR1	EPOR2	EPORT
1 teden	0,94	0,46	0,78
S.E.	0,87 - 1,03	0,43 - 0,51	0,72 - 0,85
P(H1)	0,03 ↓	0,00 ↓	0,001 ↓
2 tedna	0,35	0,46	0,33
S.E.	0,30 - 0,40	0,40 - 0,50	0,30 - 0,37
P(H1)	0,00 ↓	0,00 ↓	0,00 ↓
3 tedne	0,93	0,43	0,73
S.E.	0,88 - 0,99	0,42 - 0,44	0,63 - 0,85
P(H1)	0,03 ↓	0,00 ↓	0,00 ↓
4 tedne	0,96	0,41	0,49
S.E.	0,88 - 1,09	0,37 - 0,46	0,43 - 0,55
P(H1)	0,34	0,00 ↓	0,00 ↓
5 tedne	0,45	0,48	0,38
S.E.	0,41 - 0,49	0,45 - 0,50	0,33 - 0,45
P(H1)	0,00 ↓	0,00 ↓	0,00 ↓
6 tednov	1,20	0,42	0,73
S.E.	1,16 - 1,27	0,35 - 0,52	0,65 - 0,83
P(H1)	0,00 ↑	0,00 ↓	0,00 ↓

S.E. = standardna napaka, P(H1)= verjetnost alternativne hipoteze, da je razlika med vzorčno in kontrolno skupino samo posledica naključja.

Preglednica 12: Razmerje izražanja tarčnih genov kronično izpostavljenih celic MCF-7 za devet tednov 5 U rHuEpo/ml in nato tretiranih s 50 U rHuEPo/ml (vzorčna skupina) za različne čase v primerjavi z akutno tretiranimi celicami MCF-7 (kontrolna skupina)

	<i>EPOR1</i>	<i>EPOR2</i>	<i>EPORT</i>
0 min	0,55	0,58	0
S.E.	0,44 - 0,73	0,44 - 0,82	0,21 - 0,66
P(H1)	0,00 ↓	0,00 ↓	0,01 ↓
4 min	0,64	0,63	0,71
S.E.	0,43 - 0,90	0,42 - 0,90	0,27 - 1,81
P(H1)	0,02 ↓	0,01 ↓	0,39
8 min	0,95	0,97	0,87
S.E.	0,72 - 1,23	0,76 - 1,23	0,56 - 1,30
P(H1)	0,66	0,76	0,52
16 min	0,98	0,95	1,00
S.E.	0,80 - 1,25	0,77 - 1,19	0,51 - 1,92
P(H1)	0,85	0,53	0,98
32 min	1,01	1,05	0,88
S.E.	0,85 - 1,18	0,93 - 1,16	0,58 - 1,40
P(H1)	0,86	0,48	0,51
64 min	0,79	0,87	0,865
S.E.	0,48 - 1,32	0,70 - 1,10	0,42 - 1,71
P(H1)	0,24	0,15	0,60

S.E. = standardna napaka, P(H1)= verjetnost alternativne hipoteze, da je razlika med vzorčno in kontrolno skupino samo posledica naključja.

Preglednica 13: Razmerje izražanja tarčnih genov akutno izpostavljenih celic MCF-7 (vzorčna skupina) v primerjavi z akutno tretiranimi celicami MCF-10A (kontrolna skupina) za različne čase

	<i>EPOR1</i>	<i>EPOR2</i>	<i>EPORT</i>
0 min	1,86	14,49	3,03
S.E.	0,51 - 9,38	6,67 - 28,92	0,83 - 14,69
P(H1)	0,32	0,00 ↑	0,13
4 min	0,53	6,36	0,00
S.E.	0,12 - 3,66	2,36 - 16,94	0,14 - 5,82
P(H1)	0,36	0,00 ↑	0,71
8 min	1,42	4,55	2,06
S.E.	0,80 - 2,90	3,20 - 6,62	1,32 - 3,91
P(H1)	0,27	0,00 ↑	0,02 ↑
16 min	0,61	7,44	1,26
S.E.	0,14 - 4,45	3,30 - 23,53	0,34 - 6,18
P(H1)	0,50	0,00 ↑	0,68
32 min	1,03	8,51	1,66
S.E.	0,40 - 3,00	4,56 - 19,31	0,56 - 5,47
P(H1)	0,95	0,00 ↑	0,30
64 min	0,51	5,40	1,60
S.E.	0,13 - 2,87	2,77 - 11,21	0,32 - 12,05
P(H1)	0,29	0,00 ↑	0,48

S.E. = standardna napaka, P(H1)= verjetnost alternativne hipoteze, da je razlika med vzorčno in kontrolno skupino samo posledica naključja.

Preglednica 14: Razmerje izražanja tarčnih genov kronično izpostavljenih celic MCF-7 po tednih (vzorčna skupina) v primeravi s kronično tretiranimi celicami MCF-10A po tednih (kontrolna skupina)

	<i>EPOR1</i>	<i>EPOR2</i>	<i>EPORT</i>
2 tedna 5U	2,14 S.E. P(H1)	7,42 1,59 - 2,85 0,00 ↑	12,93 7,50 - 27,34 0,00 ↑
4 tedne 5 U	0,78 S.E. P(H1)	3,78 0,57 - 1,10 0,15	2,40 1,27 - 5,46 0,01 ↑
6 tednov 5 U	0,83 S.E. P(H1)	4,98 0,36 - 2,89 0,62	4,64 3,72 - 5,47 0,00 ↑
2 tedna 50 U	0,65 S.E. P(H1)	2,42 0,41 - 1,18 0,14	2,44 1,50 - 4,45 0,01 ↑
4 tedne 50 U	0,86 S.E. P(H1)	1,16 0,54 - 1,75 0,53	1,98 1,27 - 3,9 0,001 ↑
6 tednov 50 U	3,59 S.E. P(H1)	1,62 2,35 - 4,96 0,00 ↑	5,22 3,13 - 8,39 0,00 ↑

S.E. = standardna napaka, P(H1)= verjetnost alternativne hipoteze, da je razlika med vzorčno in kontrolno skupino samo posledica naključja.

4.5 PRIPRAVA PROTEINSKIH VZORCEV ZA ANALIZO NA ČIPIH

Iz celic MCF-7 in MCF-10A, ki smo jih kronično in akutno izpostavili delovanju rHuEpo (glej poglavje 3.1.5), smo pripravili proteinske lizate in določili koncentracijo proteinov z metodo po Bradfordu. Umeritvena krivulja za BSA je v prilogi C.

Preglednica 15: Koncentracija proteinov v proteinskih lizatih celic MCF-7 in MCF-10A akutno tretiranih s 50 U rHuEpo/ml za različne čase

Čas tretiranja s 50 U rHuEpo/ml	MCF-7 akutno c (mg/ml)	MCF-10A akutno c (mg/ml)
0 h	0,86	1,15
15 min	1,23	1,30
30 min	1,13	1,01
1 h	1,34	1,21
2 h	1,07	1,14
4 h	0,78	1,52

Pri akutni izpostavitvi celic MCF-7 smo za vsak tretma nacepili po 175.000 celic, pri celicah MCF-10A pa po 200.000 celic.

Preglednica 16: Koncentracija proteinov v proteinskih lizatih celic MCF-7 kronično tretiranih s 5 U rHuEpo in nato vsak teden 1 paralelka 1-urno tretiranje s 50 U rHuEpo/ml

Izpostavljenost 5 U rHuEpo/ml	MCF-7 kronično 5 U c (mg/ml)	MCF-7 kronično 5-50U c (mg/ml)
1 teden	1,04	0,82
2 tedna	1,37	0,91
3 tedne	0,68	0,68
4 tedne	0,71	0,65
5 tednov	1,12	1,13
6 tednov	0,96	0,8

Oznaka 5-50U rHuEpo pomeni, da smo po kroničnem tretiranju 5 U rHuEpo/ml šest tednov vsak teden eno od paralelk tretirali s 50 U rHuEpo/ml za 1 uro. Za vsak teden smo nacepili po 50.000 celic na posodico T-25.

Preglednica 17: Koncentracija proteinov v proteinskih lizatih celic MCF-10A kronično tretiranih s 5 U rHuEpo in nato vsak drugi teden 1 paralelka 1-urno tretiranje s 50 U rHuEpo/ml

Izpostavljenost 5 U rHuEpo/ml	MCF-10A kronično 5 U c (mg/ml)	MCF-10A kronično 5 -50U c (mg/ml)
2 tedna	0,58	0,21
4 tedne	0,94	0,75
6 tednov	2,14	1,57

Oznaka 5-50U rHuEpo pomeni, da smo po kroničnem tretiranju s 5 U rHuEpo/ml šest tednov vsak drugi teden eno od paralelk tretirali s 50 U rHuEpo/m tretirali za 1 uro. Za drugi in četrti teden smo nacepili po 200.000 celic na posodico T-25, za šesti teden pa 150.000 celic na posodico T-25.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Test MTT

S testom MTT smo ugotovili najprimernejše začetno število celic 5.000 celic/luknjico, saj so vrednosti absorbance tudi po 72 h v linearinem območju (pod vrednostjo ena).

5.1.1

Vzrokov za upad števila celic pri nižjih koncentracijah rekombinantnega humanega eritropoetina (rHuEpo) pri akutni izpostaviti celic MCF-7 po 72 h je lahko več: napaka pri izvajanju poskusov (nasajeno manjše število celic), primanjkovanje hrani, lateralna inhibicija celic, čeprav ne moremo izključiti možnosti, da je to posledica delovanja rHuEpo. V višjih koncentracijah (40 in 80 U rHuEpo/ml) pa deluje rHuEpo proliferativno na rast celic MCF-7 (okoli 2-kratna porast celic). Visoke koncentracije rHuEpo imajo velik vpliv tudi na proliferacijo celic MCF-10A po akutni izpostaviti rHuEpo (10-15-kratna porast celic).

Za razliko od akutnega tretiranja z rHuEpo, se pri kronični izpostaviti celic MCF-7 statistično značilno poveča število celic pri nižjih koncentracijah rHuEpo, medtem ko je pri višjih koncentracijah učinek na rast sicer prisoten, a ta ni statistično značilen. Kljub temu, da smo celice MCF-7 za deset tednov izpostavljeni delovanju 5 U rHuEpo/ml, se njihova odzivnost na nivoju proliferacije ni bistveno spremenila. Opazili smo 2-krat večje število celic.

Pri večini raziskav, ki so proučevale vpliv rHuEpo na celično rast, je bila celična proliferacija izmerjena po 1-5 dneh inkubacije z 0,25-100 U rHuEpo/ml. Tako kot v naših poskusih (akutno tretirane celice MCF-7 in MCF-10A), je bila tudi v drugih raziskavah povečana proliferacija celic opažena le pri višjih koncentracijah rHuEpo. Pri poskusih z nižjimi koncentracijami (0,25-10 U rHuEpo/ml) je bilo povečanje proliferacije zanemarljivo – število celic se je povečalo od 1,25-krat do 3-krat (Acs, 2001). Proliferativen učinek rHuEpo je bil v teh raziskavah v glavnem sorazmerno odvisen od koncentracije rHuEpo, vendar je bil odziv tudi pri visokih koncentracijah rHuEpo (100-200 U rHuEpo/ml) zanemarljiv. Kljub temu je lahko tudi relativno skromna (npr. 2-kratna) porast števila celic v daljšem časovnem obdobju zadostna, da dobijo rakave celice proliferativno prednost, ki se na daljši rok za rakave bolnike izkaže za škodljivo. Kljub temu, da so bili transkripti EPOR in proteini EpoR v celični liniji zaznani, se tudi po 1000-kratnem povišanju koncentracije rHuEpo od tiste, ki jo uporabljajo v medicini, pri tumorski celični liniji dojke ni sprožila proliferacija (Westphahl, 2002).

Pri 68 tumorskih celičnih linijah v osmih drugih raziskavah pri meritvah proliferacije in rasti ni bilo opaženega biološkega odziva na rHuEpo. Pri eni raziskavi izražanja površinskega EpoR pri tumorskih celičnih linijah se je izkazalo, da pri celičnih linijah, ki na površini izražajo EpoR, ni mogoče sprožiti proliferacije, kadar jih izpostavimo rHuEpo (Liu, 2004).

Nasprotno je bilo v nekaterih raziskavah pokazano, da se v tumorskih celicah kot odgovor na rHuEpo sproži proliferacija (Acs, 2001; Takeshita, 2000). Vendar pa ti podatki zaradi številnih vzrokov niso zanesljivi. Prvič, povečana proliferacija je bila zaznana znotraj šuma ozadja, ki se običajno pojavi pri vsaki analizi celične proliferacije. Drugič, vzpostavljeni ni

bilo nobene povezave med koncentracijo dodanega rHuEpo in odgovorom celic. Poleg tega v štirih drugih raziskavah (Berdel, 1992; Berdel, 1991; Mundt 1992; Rosti, 1993), kjer so uporabljali enako celično linijo, proliferativni odziv v tumorski celični liniji dojke ni bil zaznan. Dve raziskavi (Westenfelder, 2000; Feldman, 2006), ki sta preučevali povezavo med koncentracijo rHuEpo in proliferacijo tumorske celične linije, sta poročali, da je proliferacija v celični liniji glodalca in v 7 človeških celičnih linijah ledvic in prostate narasla od 1,25 do 4-krat po tretiranju z 0,5 U rHuEpo/ml – 100U rHuEpo/ml tako v mediju brez serum, kot v mediju s serumom. Zaradi odsotnosti kontrole in uporabe izredno visokih koncentracij rHuEpo je pomen teh raziskav vprašljiv. Ti podatki se razlikujejo od raziskav, kjer so ugotovili, da se pri farmakološko običajnih koncentracijah (0,01-0,4 U rHuEpo/ml) poveča proliferacija eritroidne celične linije za kar 650-krat. (Hammerling, 1996).

Kot že omenjeno, je bilo pri eni od raziskav (Acs, 2001) za tumorsko celično linijo dojke MCF-7 ugotovljeno, da se je proliferacija pod vplivom koncentracije 10 U rHuEpo/ml zvišala za 1,25-krat, po drugi strani pa drugi raziskovalci niso zaznali nobenega vpliva rHuEpo na rast iste celične linije (Gewirtz, 2006; Laugsch, 2008; LaMontagne, 2006). Ni pojasnjeno, ali so tako raznoliki rezultati posledica različnega izvora celic, različnih pogojev gojenja celic ali različnih postopkov izvajanja poskusov. Prav zato bi bilo za nadaljnje raziskave na tem področju izrednega pomena, če bi uspeli zagotoviti celične linije podobnega izvora in izvajati poskuse po že v naprej predpisanih merilih. Tudi vprašanje, kako natančno lahko *in vitro* pogoji, v katerih se testi izvajajo, posnemajo fiziološko okolje tumorja, ostaja odprtlo.

Vsekakor pa bi bilo potrebno tudi naše teste zaradi velike variabilnosti (predvsem napake pri številu nasajenih celic, napake pri pipetiranju, pasaže v kateri so bile celice) potrebno večkrat ponoviti.

5.1.2

Izolacija in analiza celokupne RNA

Za natančnost metode qPCR je ključna kakovost izolirane celokupne RNA, saj je učinkovitost reverzne transkripcije iz delno razgrajene celokupne RNA znatno slabša kot iz intaktne RNA (Swift, 2000).

Na elektroferogramih so bili vidni ločeni in visoki vrhovi ribosomskih RNA različnih velikosti (18S in 28S rRNA) v vzorcih celokupne RNA. Vrednost faktorja RIN, številčne vrednosti kakovosti izolirane celokupne RNA, je bila za skoraj vse vzorce blizu maksimalne vrednosti 10, med 9,7 in 10. To pomeni, da je bila kakovost izolirane celokupne RNA dobra in med izolacijo ni prišlo do njenega razpada.

Koncentracije celokupne RNA iz celic MCF-7 pri akutni izpostavitvi rHuEpo so med 20 – 36 ng/µl, za MCF-10A pa v območju 88 – 120 ng/µl. Pri kronično tretiranih celicah po tednih smo pri MCF-7 določili koncentracijo celokupne RNA od 100 – 347 ng/µl, pri celicah MCF-10A pa so bile vrednosti od 33 – 110 ng/µl.

Razlike v koncentraciji celokupne RNA med celicami MCF-7 in MCF-10A pri akutni izpostavitvi se pojavijo zaradi razlik v številu nasajenih celic, saj smo pri gojenju celic za akutno izpostavitev celic MCF-7 uporabljali plošče s po 6 luknjicami, medtem ko smo celice MCF-10A gojili v posodicah T-25.

Pri kronični izpostavitvi celic rHuEpo opazimo, da je koncentracija celokupne RNA celic MCF-7 veliko večja kljub 4-krat nižjemu številu nasajenih celic v primerjavi s celicami MCF-10A. Celice MCF-7 so majhne z velikimi jedri, njihova delitev je hitra in zato

dobimo ob izolaciji celokupne RNA višje koncentracije, medtem ko so celice MCF-10A večje, a imajo manjša jedra, kar sovpada z nižjo koncentracijo celokupne RNA.

Izolacija celokupne RNA je bila uspešna, saj smo dobili čisto in kvalitetno RNA v zadostni količini za nadaljnje poskuse.

Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Za doseganje rezultatov je potrebno zagotoviti specifičnost začetnih oligonukleotidov, optimizirati njihove koncentracije in preveriti ali nastajajo njihovi dimeri.

5.1.3 S pomočjo verižne reakcije s polimerazo smo preverili prisotnost tarčnih genov EPO, EPOR, EPORT ter EPORS, in kontrolnih genov TOP1, UBC, YWHAZ, SDH1, SF3A1 v cDNA izolirani iz netretirane celične linije MCF-7. Produkte PCR smo analizirali na agarozni gelski elektroforezi in potrdili produkte ustrezne velikosti. Ugotovili smo, da so prisotni vsi iskani geni razen EPO in EPORS. Pri genu UBC smo zasledili štiri produkte različnih velikosti. Ker ne poznamo zaporedja nukleotidnih začetnikov za UBC in mesta njihove vezave, žal ne moremo zagotovo trditi, da je to zaradi alternativnega izrezovanje intronov iz mRNA za UBC. Zato tega kontrolnega gena nismo uporabili za normalizacijo pri kvantitativnem PCR v realnem času.

5.1.4 *Merjenje izražanja genov s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času*

5.1.4.1 Iskanje primernih referenčnih genov za normalizacijo izražanja genov s programom geNorm

Metoda, s katero smo preverili izražanje genov, je bila verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR). Eden od osnovnih korakov pri analizi podatkov je normalizacija na ustrezni referenčni gen. Če v tem koraku izberemo napačen pristop, so lahko rezultati zavajajoči.

V ta namen smo raziskovali stabilnost več referenčnih genov (GAPDH, SF3A1, TOP1, UBC, YWHAZ, 18S rRNA in B2M), med katerimi so se z analizo z geNorm za normalizacijo najbolj stabilni izkazali SF3A1, GAPDH in TOP1. Ti so v nadaljevanju predstavljeni naše referenčne gene.

5.1.4.2 Učinkovitost pomnoževanja tarčnih genov v celični liniji MCF-7, MCF-10A in kontrolni celokupni RNA

Učinkovitosti pomnoževanja zaporedij tarčnih genov EPOR1, EPOR2 in EPORT ter referenčnih genov SF3A1, GAPDH in TOP1 so bile približno enake, zato smo iz umeritvenih krivulj obeh celičnih linij in Stratagene za vsak gen izračunali povprečno vrednost, ki predstavlja učinkovitost (E). Te vrednosti smo uporabili za statistično obdelavo v programu REST 2009. Povprečne vrednosti, ki so presegale vrednost 1, smo dali na vrednost 1, ta pa je tudi predstavljala vrednosti, ki smo jih uporabili za nadaljnjo obdelavo v programu REST 2009.

5.1.4.3 Analiza izražanja genov s programom REST 2009

S programom REST 2009 smo nato analizirali izražanje genov.

Pri akutni izpostavitvi celic MCF-10A hormonu rHuEpo se izražanje tarčnih genov vzorčne skupine ne razlikujejo od kontrolne skupine (netretirane celice). Pri celični liniji

MCF-7 tretirani 4 minute z rHuEpo se izražanje tarčnih genov EPOR1, EPOR2 in EPORT vzorčne skupine ne razlikuje od kontrolne skupine (netretirane celice), medtem ko imajo v preostalih časovnih točkah vsi geni znižano raven izražanja v primerjavi s kontrolno skupino.

Pri kronični izpostavitvi rHuEpo celic MCF-7 imajo geni EPOR1, EPOR2 in EPORT v vseh časovnih točkah znižano raven izražanja v primerjavi s kontrolno skupino.

Pri primerjavi izražanja tarčnih genov v netretiranih celicah MCF-10A in celicah MCF-10A, ki so bile šest tednov kronično izpostavljene 5 oz. 50 U rHuEpo/ml, ima tarčni gen EPOR2 zvišano raven izražanja v vzorčni skupini (v primerjavi s kontrolno skupino) v vseh točkah inkubacije. Izražanje je povišano zlasti v prvih dveh tednih, tako pri kronični izpostavitvi 5 U rHuEpo/ml (za faktor 3,9), kot pri celicah, ki so bile v nadaljevanju za 8 minut tretirane s 50 U rHuEpo/ml (povišano izražanje za faktor 5,5).

Izražanje ostalih dveh tarčnih genov EPOR1 in EPORT se statistično ne razlikuje od kontrolne skupine (netretiranih celic).

Izražanja tarčnih genov v netretiranih celicah MCF-7, in celicah MCF-7, ki so bile šest tednov kronično izpostavljene 5 oz 50 U rHuEpo/ml, zelo variira:

EPOR1 ima znižano raven izražanja v vzorčni skupini v primerjavi s kontrolno skupino v prvem in četrtem tednu kronične izpostavljenosti 5 U rHuEpo/ml, prav tako v prvem, četrtem in petem tednu po tretiranju s 50 U rHuEpo/ml, medtem ko se njegovo izražanje v drugem tednu kronične izpostavljenosti 5 U rHuEpo poviša (za faktor 3,6).

Podobno je tudi pri tarčnem genu EPOR2, ki ima v prvem, tretjem in četrtem tednu kronične izpostavitve 5 U rHuEpo/ml znižano raven izražanja. Pri kronični izpostavitvi in nadaljnjem tretiranju s 50 U rHuEpo/ml je izražanje znižano v vseh tednih (razen v drugem tednu). V drugem tednu kronične izpostavljenosti 5 U rHuEpo/ml pa se, prav tako kot pri genu EPOR1, pojavi povišano izražanje gena (za faktor 2).

Izražanje tarčnega gena EPORT se poviša v vseh tednih kronične izpostavitve 5 U rHuEpo/ml (razen v prvem in četrtem tednu), zlasti po dveh tednih (za faktor 4,3), medtem ko ima gen EPORT po tretiranju s 50 U rHuEpo/ml v četrtem in petem tednu znižano raven izražanja, v drugem tednu pa je izražanje povišano.

Pri primerjavi izražanja tarčnih genov v celicah MCF-10A, ki so bile šest tednov kronično tretirane s 5 U rHuEpo/ml in celicah MCF-10A, ki smo jih nato vsaka dva tedna izpostavili še 50 U rHuEpo/ml za 8 minut, se izkaže, da ima tarčni gen EPOR1 po šestih tednih tretiranja s 5 U rHuEpo/ml znižano raven izražanja v vzorčni skupini (v primerjavi s kontrolno skupino brez tretmaja s 50 U rHuEpo/ml) za faktor 0,3. Ostali tretmaji se statistično ne razlikujejo od kontrolne skupine.

Na podlagi primerjave izražanja tarčnih genov pri celicah MCF-7, ki smo jih kronično izpostavili 5 U rHuEpo/ml za šest tednov in celicah MCF-7, ki smo jih potem vsak teden tretirali še s 50 U rHuEpo/ml za 8 minut, ugotavljamo, da imajo skoraj vsi tarčni geni v tretirani vzorčni skupini znižano raven izražanja v primerjavi z netretirano kontrolno skupino, razen pri genu EPOR1 po šestih tednih, ko je izražanje gena zvišano, in po štirih tednih tretiranja, ko ne pride do statistično značilne razlike.

Rezultati razmerja izražanja tarčnih genov kronično izpostavljenih celic MCF-7 za devet tednov 5 U rHuEpo/ml in nato tretiranih s 50 U rHuEPo/ml za različne čase v primerjavi z akutno tretiranimi celicami MCF-7 za različne čase nam pokažejo, da imajo vsi trije tarčni geni, EPOR1, EPOR2 in EPORT, znižano raven izražanja v vzorčni skupini (kronično tretirane celice) v primerjavi s kontrolno skupino (akutno tretirane celice) pri času 0 minut, gena EPOR1 in EPOR2 pa tudi pri času 4 minute.

Razmerje izražanja tarčnih genov akutno izpostavljenih celic MCF-7 v primerjavi z akutno tretiranimi celicami MCF-10A za različne čase je pri genu EPOR2 močno povišano pri vseh časih tretiranja (4,6 - 14,5-krat), zlasti v času 0 min (netretirane celice), kjer je faktor izražanja 14,5. Iz tega sklepamo, da je izražanje tega gena že v osnovi veliko višje pri tumorski celični liniji kot pri normalni in je zato povišano izražanje prisotno tudi v ostalih časih akutne izpostavitve. Vendar se to razmerje s časom tretiranja manjša, iz česar lahko sklepamo dvoje: ali se z daljšanjem časa tretiranja povišuje izražanje tarčnih genov pri normalni celični liniji ali pa se z daljšanjem časa tretiranja znižuje izražanje tarčnih genov pri tumorskih celicah. Pri tarčnem genu EPORT je izražanje povišano le pri času 8 minut, in sicer za faktor 2,1. V ostalih tretmajih in pri genu EPOR1 ni bilo statistično značilnih razlik v izražanju.

Razmerje izražanja tarčnih genov kronično izpostavljenih celic MCF-7 po tednih v primerjavi s kronično tretiranimi celicami MCF-10A po tednih je pri tarčnem genu EPOR1 povišano po dveh tednih kronične izpostavitve 5 U rHuEpo/ml in po šestih tednih nadaljnega tretiranja s 50 U rHuEpo/ml (za 3,6-krat). Pri genu EPOR2 je razmerje izražanja povišano v vseh tretmajih (zlasti v drugem tednu izpostavitve 5 U rHuEpo/ml, za faktor 7,4), razen v četrtem tednu pri tretiranju s 50 U rHuEpo/ml. Pri genu EPORT pa je povišano izražanje prisotno pri vseh tretmajih, zlasti v drugem tednu kronične izpostavitve 5 U rHuEpo/ml (za faktor 13) in po šestih tednih kronične izpostavitve rHuEpo in nato tretiranju s 50 U rHuEpo/ml (za faktor 5). Vsem trem tarčnim genom je skupno povišanje izražanje v istih tretmajih – po dveh tednih kronične izpostavitve 5 U rHuEpo/ml in po šestih tednih kronične izpostavitve rHuEpo in nato tretiranju s 50 U rHuEpo/ml.

Razlika v izražanju gena EPOR1 in EPOR2 se verjetno pojavi zato, ker oligonukleotidni začetniki ne zavzemajo celega funkcionalnega dela receptorja v enakem obsegu. Ta razlika je opazna zlasti pri primerjavi celic MCF-10A tretiranih z rHuEpo po tednih v primerjavi z netretiranimi celicami ter pri primerjavi akutno tretiranih celic MCF-7 v primerjavi z akutno tretiranimi celicami MCF-10A, kjer se gen EPOR2 izraža povišano v vseh tretmajih, raven izražanja gena EPOR1 pa ni spremenjena.

Pri številnih raziskavah je bila v tumorjih prisotna ekspresija EPOR, iz česar so sklepali na negativen vpliv na rast tumorja in preživetje. Vendar pa so mnoge od teh raziskav vprašljive zaradi težav z metodami za zaznavanje proteina EpoR, potrebe po primernih kontrolah in pomanjkljivega zaznavanja fiziološke prisotnosti površinskih EpoR na tumorskih celicah. Ena od pomembnejših metodoloških tematik se navezuje na uporabo nespecifičnih oz. slabo specifičnih protiteles za EpoR. V večini raziskav, predvsem tistih pred letom 2006 (Henke, 2006; Westenfelder, 2000; Acs, 2001; Brines, 2004; McBroom, 2005), so uporabljali protitelo C-20 (Santa Cruz Biotechnology), ki se je izkazalo za nezanesljivega tako za imunski odtis kot imunohistokemijo (zaradi navzkrižne reaktivnosti

z drugimi proteini, med drugim s stresnim proteinom HSP70, katerega prisotnost se poveča v številnih humanih karcinomih in je pod vplivom hipoksije).

Pri tumorskih celicah, ki so se na rHuEpo *in vitro* odzvale, je bil njihov odziv zanemarljiv kljub temu, da je bil EpoR izražen ali pa so šele izredno visoke koncentracije rHuEpo izzvale biološki odgovor. Te ugotovitve kažejo na možnost odsotnosti znotrajcelične signalizacije po vezavi liganda na receptor, nizke vsebnosti EpoR ali pa nefunkcionalnosti EpoR na celični površini v tumorski celični liniji (Sinclair, 2007). To bi si lahko razlagali kot posledica uporabe metode, pri kateri se je raziskovala prisotnost EpoR izključno z uporabo mRNA, ki kodira divji tip EpoR po celotni dolžini. Arcasoy et al. (2003) so v več tumorskih celičnih linijah in primarnih rakih z RT-PCR odkrili prisotnost petih dodatnih oblik receptorja (poleg normalne funkcionalne oblike), ki sicer lahko vežejo Epo, vendar se nadaljnja signalna transdukacija Epo ne sproži. Tako topna in okrnjena oblika receptorja EpoR tekmujeza vezavo liganda (Epo) z divjim tipom EpoR. Če je razmerje mutantov v primerjavi z divjim tipom visoko, lahko to vpliva na signalizacijo EpoR. Ta hipotetična situacija bi lahko razložila, zakaj so za rast tumorskih celic/aktivacijo receptorja potrebne visoke koncentracije rHuEpo (Szenajch, 2010).

Za rakave celice obstaja več biološki vidikov signalne poti Epo/EpoR, ki lahko igrajo pomembno vlogo pri posredovanju Epo signala in pri nekrvotvornih celicah pospešujejo njihovo rast. Prvi vidik domneva nižjo afiniteto EpoR do liganda pri rakavih celicah v primerjavi z afiniteto pri normalnih celicah (Sytkowski, 2004). Drugo pomembno vprašanje je lokalizacija in število molekul EpoR v rakavih celicah. LaMontagne et al. (2003) so odkrili, da je bil EpoR v celicah raka dojke MCF-7 prisoten predvsem intracelularno. Do sedaj so menili, da se na ekstracelularni Epo odzove le na membrano vezan EpoR, s čimer so številni avtorji pojasnjevali odsotnost odgovora na rHuEpo. Njihovi rezultati so še vedno v nasprotju s prej omenjeno študijo (Arcasoy, 2002), ki pri celicah MCF-7 navaja izražanje membranskega EpoR in pozitiven odgovor na Epo. Razumevanje teh razlik je mogoče razložiti s študijo (Um et al., 2007) pri celicah humanega neuroblastoma. Z novo metodo so avtorji uspeli z manj kot 50 visoko afinitetnimi molekulami EpoR na površini celic SH-SY5Y dokazati aktiviranje Epo signalnih poti. Na ta način bi lahko prispevali pri reševanju težav s štetjem majhnega števila molekul EpoR na površini nekrvotvornih celic pri do sedaj objavljenih nasprotujučih rezultatih.

Pri nedavnih raziskavah (Larsson, 2009) se je izkazalo, da lahko s pomočjo izražanja EPOR napovemo prisotnost tumorja, vendar se te napovedi različne pri posameznih oblikah raka. Pri bolnikih z rakom dojke je pomenilo visoko izražanje EPOR pozitivno napoved prisotnosti tumorja, če je bil tumor pozitiven za estrogenski receptor (ER), medtem ko pri tumorjih z negativnim ER ni bilo mogoče napovedati prisotnosti tumorja. Pomen raziskav, ki so povezane z detekcijo izražanja EPOR pri rakavih celicah je torej izreden in še dokaj neraziskan.

Zavedati pa se moramo, da so med fiziološko najpomembnejšimi *in vivo* raziskave tumorja, pri katerih je bil rezultat tretiranja s stimulatorji eritropoeze (ESA) zmanjšanje rasti tumorja preko radiosenzibilnosti, znižanje hipoksije oz. povečanje imunosti tumorja. In najpomembnejše, pri nobeni živali se pri *in vivo* raziskavah tumorja ni pokazalo, da bi

ESA sami po sebi povečali rast tumorja oz. zmanjšali možnosti preživetja. Šele nadaljnje dobro nadzorovane raziskave bodo razjasnile, ali je uporaba ESA pri anemičnih bolnikih varna (Sinclair, 2007).

Priprava proteininskih vzorcev za analizo na čipih

Koncentracije proteinov celic MCF-7 pri akutni izpostavitvi rHuEpo so bile med 0,78 – 1,34 mg/ml, pri celicah MCF-10A pa med 1,01 – 1,52 mg/ml. Pri kronično tretiranih 5.1. šelicah po tednih smo pri tumorski celični liniji MCF-7 določili koncentracijo proteinov od 0,65 – 1,37 mg/ml, pri celicah MCF-10A pa so bile vrednosti od 0,21 – 2,14 mg/ml.

Za analizo izražanja proteinov na proteininskih čipih z nanošenimi protitelesi za signalne proteine ter proteine udeležene pri proliferaciji in apoptozi bi potrebovali koncentracijo proteinov 2 mg/ml. Ker smo v proteininskih lizatih dobili prenizke koncentracije proteinov, bi vilo potrebno poskuse ponoviti na večjem številu celic.

Glede na 5-krat večjo količino proteinov pri kronično tretiranih celicah MCF-10A z rHuEpo za šest tednov v primerjavi z dvema tednoma, domnevamo da ima rHuEpo proliferativen učinek na rast celic. Tega z MTT testi žal nismo uspeli ovrednotiti, saj so se nam po šestih tednih kroničnega tretiranja z 5 U rHuEpo/ml celice okužile.

Za večjo zanesljivosti rezultatov bi bilo potrebno vse poskuse ponoviti. Za širšo predstavo o sami signalizaciji rHuEpo bi bilo vsekakor potrebno preveriti vpliv rHuEpo tudi na nivoju izražanja proteinov.

5.2 SKLEPI

Pri analizi proliferacije normalne celične linije MCF-10A in tumorske celične linije MCF-7 pod vplivom rekombinantnega humanega eritropoetina (rHuEpo) smo prišli do naslednjih sklepov:

- Pri akutni izpostavitvi celic deluje rHuEpo podobno na normalne in tumorske celice. Dokazali smo namreč, da rHuEpo v višjih koncentracijah (40 in 80 U rHuEpo/ml) vpliva na obe celični liniji proliferativno.
- Pri kronični izpostavitvi celic rHuEpo je proliferativen učinek na celice MCF-7 drugačen kot pri akutnem tretiranju celic MCF-7. Pri kronični izpostavitvi celic MCF-7 se namreč statistično značilno poveča število celic pri nižjih koncentracijah rHuEpo.
- Dolgotrajno (deset tednov) delovanje 5 U rHuEpo/ml ni bistveno vplivalo na proliferacijo celic MCF-7.

Proučevali smo tudi izražanje genov za eritropoetinski receptor (EPOR) pri normalni MCF-10A in tumorski MCF-7 celični liniji po akutni in kronični izpostavitvi rHuEpo. Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo:

- Po akutnem tretiranju z rHuEpo je izražanje gena za eritropoetinski receptor različno pri tumorski in normalni celični liniji dojke. Pri akutni izpostavitvi celic MCF-10A se izražanje tarčnih genov EPOR1, EPOR2 in EPORT statistično ne razlikuje od kontrolne skupine (netretiranih celic), medtem ko je pri akutno tretiranih tumorskih celicah MCF-7 izražanje vseh treh tarčnih genov pri skoraj vseh časih znižano.

- Tudi kronično izpostavljenje celice MCF-7 imajo po deset tednih tretiranja s 5 U rHuEpo/ml v vseh časovnih točkah znižano izražanje genov za eritropoetinski receptor v primerjavi s kontrolo.
- Pri kronično izpostavljenih celicah MCF-10A (5 oz. 50 U rHuEpo/ml za šest tednov) ima hormon vpliv na tarčni gen EPOR2, in sicer se njegovo izražanje zviša, medtem ko pri izražanju genov EPOR1 in EPORT ni statistično značilnih razlik v primerjavi s kontrolno skupino (netretiranimi celicami).
- Pri kronično izpostavljenih celicah MCF-7 (5 oz. 50 U rHuEpo/ml za šest tednov) so razlike v izražanju genov EPOR1, EPOR2 in EPORT zanemarljive, razen v drugem tednu tretiranja s 5 U rHuEpo/ml, ko je izražanje vseh treh tarčnih genov precej povišano (2 - 4,3-krat) v primerjavi s kontrolo (netretiranimi celicami).

Izražanje genov smo medsebojno primerjali pri različnih kontrolnih in vzorčnih skupinah, in ugotovili:

- Pri visokih koncentracijah rHuEpo (50 U rHuEpo/ml v primerjavi s 5 U rHuEpo/ml) smo opazili znižano izražanja tarčnih genov pri kronično tretiranih tumorskih celicah po tednih. Tega nismo zasledili pri kronično tretiranih normalnih celicah po tednih.
- Če primerjamo kronično izpostavljenje tumorske celice MCF-7 z akutno tretiranimi celicami MCF-7 v različnih časovnih točkah, ni bistvenih razlik v izražanju tarčnih genov EPOR1, EPOR2 in EPORT.
- Če primerjamo izražanja tarčnih genov med kronično izpostavljenimi celicami MCF-7 in kronično tretiranimi celicami MCF-10A po tednih, opazimo da je izražanje genov EPOR2 in EPORT povišano, zlasti v drugem tednu kronične izpostavitve 5 U rHuEpo/ml (za faktor 7,4, in 13).
- Izražanje EPOR2 je veliko višje pri tumorski celični liniji kot pri normalni celični liniji. Če primerjamo akutno tretirane celice MCF-7 s celicami MCF-10A, lahko ugotovimo, da je izražanje gena EPOR2 veliko višje pri tumorski celični liniji kot pri normalni v vseh časovnih točkah, vendar se s časom akutne izpostavitve to razmerje niža.

6 POVZETEK

Eritropoetin (Epo) je glikoprotein iz skupine citokinov. Kot odgovor na hipoksijo tkiva nastaja predvsem v ledvicah in tudi v jetrih. V kostnem mozgu deluje na prednische eritroidne celice in na prekurzorje eritrocitov (Erc) ter nadzira njihovo proliferacijo, diferenciacijo in zorenje. Ob vezavi Epo na eritropoetinski receptor (EpoR) na površini celic se sproži natančno uravnavan sistem signalnih poti. Epo in EpoR se izražata tudi v mnogih nekrvotvornih tkivih in pri mnogih tipih raka ter rakavih celičnih obolenjih, kjer njuna funkcija še vedno ni pojasnjena.

Rekombinantni humani Epo (rHuEpo) se uporablja za dvig ravni hemoglobina (Hb) pri bolnikih z anemijo. Anemije je lahko med drugim tudi posledica rasti tumorja v kostnem mozgu in zdravljenja raka s kemoterapijo oziroma obsevanjem. Nekatere raziskave kažejo, da je anemija napovedni dejavnik slabšega preživetja bolnikov z rakiom. Zdravljenje z rHuEpo odpravi anemijo, zmanjša potrebo po transfuziji in izboljša bolnikovo počutje. Poleg tega rHuEpo izboljša uspešnost kemoterapije in radioterapije zaradi boljše prekravljjenosti in preskrbe tumorja s kisikom. Toda po drugi strani prisotnost Epo in njegovega receptorja (EpoR) pri mnogih tipih raka in rakastih celičnih linijah postavlja pod vprašaj terapevtske učinke rHuEpo pri bolnikih z rakiom. Nakazuje se namreč možnost, da rHuEpo vpliva na hitrejšo rast tumorja, pospešuje njegovo angiogenezo in varuje rakaste celice pred apoptozo. Nekatere nedavne klinične študije sto pokazali slabše preživetje bolnikov, pri katerih je bila kemo- in radioterapija kombinirana z rHuEpo, v primerjavi z bolniki, ki so prejemali samo transfuzije krvi. Nasprotujejoče si ugotovitve o učinkih rHuEpo v prekliničnih in kliničnih študijah vsekakor terjajo razjasnitev mehanizma delovanja rHuEpo za odgovorno ravnanje med zdravljenjem.

Naš namen je bil preučiti vpliv rekombinantnega humanega eritropoetina na izražanje eritropoetinskega receptorja in proliferacijo v tumorski in normalni celični liniji dojke. Pri obeh celičnih linijah, tumorski MCF-7 in normalni MCF-10A smo dokazali vpliv rHuEpo, tako na proliferacijo celic kot na izražanje tarčnih genov za eritropoetinske receptorje EPOR1, EPOR2 in EPORT.

Naša temeljna hipoteza je predvidevala, da deluje eritropoetin različno na proliferacijo tumorskih in normalnih celic dojke. Vendar pa lahko na podlagi dobljenih rezultov testov MTT sklepamo, da je proliferativni učinek po akutni izpostavitvi rHuEpo pri obeh celičnih linijah podoben. Dokazali smo namreč, da v višjih koncentracijah (40 in 80 U rHuEpo/ml) deluje akutna izpostavitev rHuEpo proliferativno na rast celic MCF-7. Visoke koncentracije rHuEpo imajo velik vpliv tudi na proliferacijo celic MCF-10A po akutni izpostavitvi rHuEpo. Po drugi strani pa se za razliko od akutnega tretiranja z rHuEpo, pri kronični izpostaviti celic MCF-7 statistično značilno poveča število celic pri nižjih koncentracijah rHuEpo, medtem ko je pri višjih koncentracijah učinek na rast sicer prisoten, a ta ni statistično značilen. Kljub temu, da smo celice MCF-7 za deset tednov izpostavljeni delovanju 5 U rHuEpo/ml, se njihova odzivnost na nivoju proliferacije ni bistveno spremenila.

S polimerazno reakcijo v realnem času smo dokazali tudi našo hipotezo, da je izražanje gena za eritropoetinski receptor različno pri tumorski in normalni celični liniji dojke. Po kronični in akutni izpostavitvi celic MCF-7 hormonu rHuEpo se izražanje eritropoetinskega receptorja zniža, medtem ko pri akutno tretiranih celicah MCF-10A ni

statistično značilnih razlik v izražanju tarčnih genov. Razlike v izražanju tarčnih genov so prisotne tudi po kroničnem tretiranju normalnih oz. tumorskih celic po tednih.

Kot smo domnevali, se po kronični izpostavljenosti celic eritropoetinu po tednih spremeni njihova odzivnost na nivoju izražanja eritropoetinskega receptorja, in sicer se pri normalni celični liniji MCF-10A zviša izražanje EPOR2, pri tumorski celični liniji MCF-7 pa pride do zvišanega izražanja vseh treh tarčnih genov po dveh tednih tretiranja s 5 U rHuEpo/ml.

Vsekakor bi bilo potrebno naše teste zaradi velike variabilnosti (predvsem napake pri številu nasajenih celic, napake pri pipetiranju, pasaže v kateri so bile celice, viabilnosti celic) večkrat ponoviti.

7 VIRI

7.1 TISKANI VIRI

- Acs G., Acs P., Beckwith S.M., Pitts R.L., Clements E., Wong K., Verma A. 2001. *Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer*. Cancer Res., 61: 3561-3565
- Arcasoy M.O., Amin K., Karayal A.F., Chou S., Raleigh J.A., Varia M.A., Haroon Z.A. 2002. *Functional significance of erythropoietin receptor expression in breast cancer*. Lab invest, 82: 911-918
- Arcasoy M.O., Jiang X., Haroon Z.A. 2003. *Expression of erythropoietin receptor splice variants in human cancer*. Biochem Biophys Res Commun., 307: 999-1007
- Bagnis C., Beaufils H., Jacquiaud C., Adabra Y., Jouanneau C., La Nahour G., Chantal Jaudon M., Bourbouze R., Jacobs C., Deray G. 2001. *Erythropoietin enhances recovery after cisplatin-induced acute renal failure in the rat*. Nephrol. Dial. Transplant., 16: 932-8
- Bazan J.F. 1990. *Structural design and molecular evolution of cytokine receptor superfamily*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6934-6938
- Beckman D.L., Lin L.L., Quinones M.E., Longmore G.D. 1999. *Activation of the erythropoietin receptor is not required for internalization of bound erythropoietin*. Blood, 94: 2667-2675
- Berdel W.E., Danhauser-Riedl S., Oberberg D., Zafferani M. 1992. *Effects of hematopoietic growth factors malignant nonhematopoietic tumor cells in vitro*. Semin Oncol, 19: 41-45
- Berdel W.E., Oberberg D., Reufi B., Thiel E. 1991. *Studies on the role of the recombinant human erythropoietin in the growth regulation of human nonhematopoietic tumor cells in vitro*. Semin Oncol, 19: 41-45
- Boudot C., Petitfrère E., Kadri Z., Chretien S., Mayeux P., Haye B., Billat C. 1999. *Erythropoietin induces glycosylphosphatidylinositol hydrolysis. Possible involvement of phospholipase c-gamma(2)*. J. Biol. Chem. 274: 33966–33972
- Bradford M.M. 1976. *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem., 72: 248-54
- Breymann C. 2000. *Erythropoietin test methods*. Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism, 14: 135-45
- Brines M., Grasso G., Fiordaliso F., Sfacteria A., Ghezzi P., Fratelli M., Latini R., Xie Q., Smart J., Su-Rick C., Pobre E., Diaz D., Gomez D., Hand C., Coleman T., Cerami A. 2004.

Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common β-subunit heteroreceptor. Proc Natl Acad Sci USA, 101: 14907-14912

Bustin S.A. 2005. *Real-time, fluorescence-based quantitative PCR: a snapshot of current procedures and preferences.* Expert Review Of Molecular Diagnostics, 5, 4: 493-498

Cella D., Zagari M.J., Vandoros C., Gagnon D.D., Hurtz H., Nortier J.W.R. 2003. *Epoetin alfa treatment results in clinically significant improvements in quality of life in anemic cancer patients when referenced to the general population.* J. Clin. Oncol. 21: 366–373

Constantinescu S.N., Ghaffari S., Lodish H.F. 1999. *The erythropoietin receptor: Structure, activation and intracellular signal transduction.* Trend Endocrinol Metab., 10: 18-23

D'Andrea A.D., Lodish H.F., Wong G.G. 1989. *Expression cloning of the murine erythropoietin receptor.* Cell, 57: 277-285

Demetri G.D., Kris M., Wade J., Degos L., Cella D. 1998. *Quality-of-life benefit in chemotherapy patients treated with epoetin α is independent of disease response or tumor type: results from a prospective community oncology study.* Procrit Study Group. J Clin Oncol., 16: 3412–25

Egrie J.C., Dwyer E., Lykos M. 1997. *Novel erythropoiesis stimulating protein (NESP) has a longer serum half-life and greater in vivo biological activity than recombinant human erythropoietin (rHuEpo).* Blood, 90: 56a

Ehrenreich H., Hasselblatt M., Dembowski C. 2002. *Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial.* Mol. Med., 8: 495-505

Elliott S., Busse L., Bass M.B., Lu H., Sarosi I., Sinclair A.M., Spahr C., Um M., Van G., Begley C.G. 2006. *Anti-Epo receptor antibodies do not predict Epo receptor expression.* Blood, 107: 1892–1895

Farrell F., Lee A. 2004. *The erythropoietin receptor and it's expression in tumour cells and other tissues.* The Oncologist, 9: 18-30

Feldman L., Wang Y., Rhim J.S., Bhattacharya N., Loda M., Sytkowski A.J. 2006. *Erythropoietin stimulates growth and STAT5 phosphorylation in human prostate epithelial and prostate cancer cells.* Prostate, 66. 135-145

Ferrario E., Ferrari L., Bidoli P., De Candis D., Del Vecchio M., De Dosso S., Buzzoni R., Bajetta E. 2004. *Treatment of cancer-related anemia with epoetin alfa: a review.* Cancer Treatment Reviews, 30: 563-75

Frank S.J. 2002. *Receptor dimerization in GH and erythropoietin action—it takes two to tango, but how?* Endocrinology 143: 2–10

Fras A.P. 1994. *Onkologija*. Onkološki inštitut Ljubljana: Katedra za onkologijo in radioterapijo, Ljubljana, 165-171, 172-182

Gabrilove J.L., Cleeland C.S., Livingston R.B. 2001. *Clinical evaluation of once-weekly dosing of epoetin α in chemotherapy patients: improvements in hemoglobin and quality of life are similar to three-times-weekly dosing*. J Clin Oncol., 19: 2875–82

Gewirtz D.A., Di X., Walker T.D., Sawyer S.T. 2006. *Erythropoietin fails to interfere with the antiproliferative and cytotoxic effects of antitumor drugs*. Clin. Cancer Res. 12: 2232–2238

Glaspy J., Bukowski R., Steinberg D., Taylor C., Tchekmedyian S., Vadhan-Raj S. 1997. *Impact of therapy with epoetin alfa on clinical outcomes in patients with nonmyeloid malignancies during cancer chemotherapy in community oncology practice*. Procrit Study Group, J. Clin. Oncol. 15: 1218–1234

Grasso G., Sfacteria A., Cerami A., Brines M. 2004. *Erythropoietin as a tissue-protective cytokine in brain injury: what do we know and where do we go?* Neuroscientist, 10: 93-8

Greil R., Thödtman R., Roila F. 2008. *Erythropoietins in cancer patients: ESMO recommendations for use*. Ann. Oncol., 19: ii113–ii115

Hammerling U., Kroon R., Wilhelmsen T., Sjodin L. 1996. *In vitro bioassay for human erythropoietin based on proliferative stimulation of an erythroid cell line and analysis of carbohydrate-dependent microheterogeneity*. J Pharm. Biomed. Anal., 14: 1455-1469

Hanlon P.R., Fu P., Wright G.L., Steenbergen C., Arcasoy O.M., Murphy E. 2005. *Mechanisms of erythropoietin-mediated cardioprotection during ischemia-reperfusion injury: role of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase signaling*. FASEB J., 19: 1323-5

Henke M., Mattern D., Pepe M., Bézay C., Weissenberger C., Werner M., Pajonk F. 2006. *Do erythropoietin receptors on cancer cells explain unexpected clinical findings?* J. Clin. Oncol. 24: 4708–4713

Henke M., Laszig R., Rübe C., Schäfer U., Haase K., Schilcher B., Mose S., Beer K.T., Burger U., Dougherty C., Frommhold H. 2003. *Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, doubleblind, placebo-controlled trial*. Lancet, 362: 1255–1260

Hensen et. al. 1989. J Immunol Meth., 119:203-210

Hodges V.M., Rainey S., Lappin T.R., Maxwell AP.. 2007. *Pathophysiology of anemia and erythrocytosis*. Crit. Rev. Oncol. Hematol., 64: 139–58

- Jacobs K., Shoemaker C., Rudersdorf R., Neill S.D., Kaufman R.J., Mufson A., Seehra J., Jones S.S., Hewick R., Fritsch E.F. 1985. *Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin*. Nature 313: 806–810
- Jelkmann W. 2004. *Molecular biology of erythropoietin*. Intern Med., 43(8): 649-59.
- Juul S. E., Yachnis A. T., Rojiani A. M., Christiansen R. D. 1999. *Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain*. Pediatr. Dev. Pathol., 2: 148–158
- Juul S. E., Zhao Y., Dame J. B., Du Y., Hutson A. D., Christensen R. D. 2000. *Origin and fate of erythropoietin in human milk*. Pediatr. Res., 48: 660–667
- Klingmuller U. 1997. *The role of tyrosine phosphorylation in proliferation and maturation of erythroid progenitor cells – signals emanating from the erythropoietin receptor*. Eur. J. Biochem., 249: 637-647
- Kocjančič A., Mrevlje F., Štajer D. 2005. *Interna medicina*, 3. izdaja, Littera Picta, Ljubljana
- Konstantinopoulos P.A., Karamouzis M.V., Papavassiliou A.G. 2007. *Selective modulation of the erythropoietic and tissue-protective effects of erythropoietin: Time to reach the full therapeutic potential of erythropoietin*. Biochim Biophys Acta., 1776: 1-9
- Krantz S.B. 1991. *Erythropoietin*. Blood, 77: 419-434
- Krantz S.B. 1994. *Pathogenesis and treatment of the anemia of chronic disease*. Am. J. Med. Sci. 307: 353–359
- Kreft S., Bren A.F., Buturović-Ponikvar J. 2005. Zdravljenje anemije z epoetini, Janssen-Cilag, Johnson&Johnson d.o.o., Ljubljana
- LaMontagne K.R., Butler J., Marshall D.J., Tullai J., Gechtman Z., Hall C., Meshaw A., Farrell F.X. 2006. *Recombinant epoetins do not stimulate tumor growth in erythropoietin receptor-positive breast carcinoma models*. Mol. Cancer Ther. 5: 347–355
- Larsson A., Jirström K., Fredlund E., Nilsson S., Rydén L., Landberg G., Pahlman S. 2009. *Erythropoietin receptor expression and correlation to tamoxifen response and prognosis in breast cancer*. Clin. Cancer Res. 15: 5552–5559
- Laugsch M., Metzen E., Svensson T., Depping R., Jelkmann W. 2008. *Lack of functional erythropoietin receptors of cancer cell lines*. Int. J. Cancer 122: 1005–1011
- Leyland-Jones B. 2003. *Breast cancer trial with erythropoietin terminated unexpectedly*. Lancet Oncol. 4: 459–460

- Leyland-Jones B., Semiglazov V., Pawlicki M., Pienkowski T., Tjulandin S., Manikhas G., Makhson A., Roth A., Dodwell D., Baselga J., Biakhov M., Valuckas K., Voznyi E., Liu X., Vercammen E.. 2005. *Maintaining normal hemoglobin levels with epoetin alfa in mainly nonanemic patients with metastatic breast cancer receiving first-line chemotherapy: a survival study.* J. Clin. Oncol., 23: 5960–5972
- Lin F.K., Suggs S., Lin C.H., Browne J.K., Smalling R., Egrie J.C., Chen K.K., Fox G.M., Martin F., Stabinsky Z. 1985. *Cloning and expression of the human erythropoietin gene.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82: 7580–7584
- Lin C:S., Lim S.K., D'Agati V., Costantini F. 1996. *Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis.* Genes Dev., 10: 154-164
- Liu W.M., Powles T., Shamash J, Propper D., Oliver T., Joel S. 2004. *Effect of haemopoietic growth factors on cancer cell lines and their role in chemosensitivity.* Oncogene, 23: 981-990
- Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. *Analysis of gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{(-\Delta\Delta C(T))}$ method.* Methods, 25, 4: 402-408
- Manello F., Fabbri L., Ciandrini E., Tonti G.A. 2008. *Increased levels of erythropoietin in nipple aspirate fluid and in ductal cells from breast cancer patients.* Cell Oncol., 30:51-61
- Manello F., Tonti G.A.M. 2008. *Erythropoietin and its receptor in breast cancer: Putting together the pieces of the puzzle.* Oncol., 13: 761-768
- McBroom J.W., Acs G., Rose G.S., Krivak T.C., Mohyeldin A., Verma A. 2005. *Erythropoietin receptor function and expression in epithelial ovarian carcinoma.* Gynecol. Oncol. 99: 571–577
- Miyake T., Kung C.K., Goldwasser E. 1977. *Purification of human erythropoietin.* J Biol Chem, 252: 5558–5564
- Mulcahy L. 2001. *The erythropoietin receptor.* Semin Oncol., 28: 19-23
- Mundt D., Berger M.R., Bode G. 1992. *Effect of recombinant human erythropoietin on the growth of human tumor cell lines in vitro. Micro-titterec-tetrazolium assay.* Arzneimitelforschung, 42. 92-95
- Mutschler E., Derendorf H. 1995. *Drug Actions: Basic Principles and Therapeutic Aspects.* Sientific Publishers Stuttgart, 595-612
- Nakamura Y., Komatsu N., Nakauchi H. 1992. *A truncated erythropoietin receptor that fails to prevent programmed cell death of erythroid cells.* Science, 257: 1138-1141

- Novaković S., Hočevan M., Jezeršek-Novaković B., Strojan P., Žgajnar J., Rudolf Z., Sok M. 2009. *Onkologija – raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka*. Mladinska knjiga.
- Overgaard J., Hoff C., Hansen H.S., Specht L., Overgaard M., Grau C., Andersen E., Johansen J., Andersen L., Evensen J. 2007. *Randomized study of the importance of Novel Erythropoiesis Stimulating Protein (Aranesp) for the effect of radiotherapy in patients with primary squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC) — the Danish Head and Neck Group DAHANCA 10 randomized trial*. Eur. J. Cancer Suppl., 5: 7
- Pfaffl M.W., Horgan D.W., Dempfle L. 2002. *Relative Expression Software Tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR*. NAR 30, e36
- Rizzo J.D., Somerfield M.R., Hagerty K.L., Seidenfeld J., Bohlius J., Bennett C.L., Cella D.F., Djulbegovic B., Goode M.J., Jakubowski A.A., Rarick M.U., Regan D.H., Lichtin A.E. 2008. *Use of epoetin and darbepoetin in patients with cancer: 2007 American Society of Clinical Oncology/American Society of Hematology clinical practice guideline update*. J. Clin. Oncol., 26: 132–149
- Romanowski R.R., Sytkowski A.J. 1994. *The molecular structure of human erythropoietin*. Hematol Oncol Clin North Am., 8(5): 885-94
- Rosser J., Eckardt K.U. 2005. *Erythropoietin receptor: Their role beyond erythropoiesis*. Nephrol Dial Transplant, 20: 1025-1028
- Rosti V., Pedrazzoli P., Ponchio L., Zibera C., Novella A., Lucotti C., Della Cuna G.R., Cazzola M. 1993. *Effect of recombinant human erythropoietin on hematopoietic and non-hematopoietic malignant cell growth in vitro*. Haematologica, 78: 208-212
- Sakanaka M., Wen T.C., Matsuda S., Morishita E., Nagao M., Sasaki R. 1998. *In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 4635-4640
- Sinclair A.M., Todd M.D., Forsythe K., Knox S.J., Elliott S., Bergley C.G. 2007. *Expression and function of erythropoietin receptors in tumors*. American cancer society, 477-488
- Silva A., Pieniazek N. 2003. *Latest Advances and Trends in PCR-based Diagnostic Methods*. Textbook-Atlas of Intestinal Infections in AIDS. Springer, str. 397-412.
- Smith R.E., Aapro M.S., Ludwig H., Pintér T., Smakal M., Ciuleanu T.E., Chen L., Lillie T., Glaspy J.A. 2008. *Darbepoetin alpha for the treatment of anemia in patients with active cancer not receiving chemotherapy or radiotherapy: results of a phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study*. J. Clin. Oncol., 26: 1040–1050

- Sytkowski A.J. 2004. *Erythropoietin: blood, brain and beyond.*, first ed. Wiley-VCH, Weinhei
- Swift G.H., Peyton M.J., MacDonald R.J. 2000. *Assessment of RNA quality by semiquantitative RT-PCR of multiple regions of a long ubiquitous mRNA*. Biotechniques, 28, 3: 524-531
- Szenajch J., Wcislob G., Jeongc J.Y., Szczylikb C., Feldman L. 2010. *The role of erythropoietin and its receptor in growth, survival and therapeutic response of human tumor cells*. Biochim. Biophys. Acta, doi: 10.1016/j.bbcan.2010.04.002
- Takeshita A., Shinjo K., Higuchi M. 2000. *Quantitative expression of erythropoietin receptor on acute leukemia cells: relationship between the amount of EPOR and CD phenotypes, in vitro proliferative response, the amount of other cytokine receptors and clinical prognosis*. Japan adult leukemia study group. Br. J Haemotol., 108: 55-63
- Temkin S.M., Hellmann M., Serur E., Lee Y., Abulafia O. 2006. *Erythropoietin administration during primary treatment for locally advanced cervical carcinomas associated with poor response to radiation* Int. J. Gynecol. Cancer, 16: 1855–1861
- Thomas G., Ali S., Hoebers F.J.P., Darcy K.M., Rodgers W.H., Patel M., Abulafia O., Lucci J.A., Begg A.C. 2008. *Phase III trial to evaluate the efficacy of maintaining hemoglobin levels above 12.0 g/dL with erythropoietin vs above 10.0 g/dL without erythropoietin in anemic patients receiving concurrent radiation and cisplatin for cervical cancer*. Gynecol. Oncol., 108: 317–325
- Um M., Gross A.W., Lodish H.F. 2007. *A “classical” homodimeric erythropoietin receptor is essential for the antiapoptotic effects of erythropoietin on differentiated neuroblastoma SH-SY5Y and pheochromocytoma PC-12 cells*. Cell. Signal. 19: 634–645
- Vandelsompele J., De Preter K., Pattyn F., Poope B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. 2002. *Acurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. Genome biology, 3: 0034.1-0034.11
- Vansteenkiste J., Pirker R., Massuti B. 2001. *Double-blind, placebo-controlled, randomized phase III trial of darbepoetin α in lung cancer patients receiving chemotherapy*. J. Natl Cancer Inst., 94: 1211–20
- Vesey D.A., Cheung C., Pat B., Endre Z., Gobe G., Johnson D.W. 2004. *Erythropoietin protects against ischaemic acute renal injury*. Nephrol Dial. Transplant., 19: 348-55
- Yasuda Y., Masuda S., Chikuma M., Inoue K., Nagao M., Sasaki R. 1998. *Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis*. J. Biol. Chem., 273: 25381–25387

Waller D.G., Renwick A.G., Hillier K. 2005. *Medical Pharmacology and Therapeutics*, 2nd Ed., Elsevier Saunders, Edinburgh

Walrafen P., Verdier F., Kadri Z., Chretien S., Lacombe C., Mayeux P. 2005. *Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor*. Blood, 105: 600-608

Westenfelder C., Baranowski R.L. 2000. *Erythropoietin stimulates proliferation of human renal carcinoma cells*. Kidney Int., 58: 647-657

Westpahl G., Niederberger E., Blum C., Wollman Y., Knoch T.A., Rebel W., Debus J., Friedrich E. 2002. *Erythropoietin and G-CSF receptors in human tumor cells: expression and aspects regarding functionality*. Tumori, 88: 150-159

Wojchowski D.M., Gregory R.C., Miller C.P., Pamdit A.K., Pircher T.J. 1999. *Signal transduction in the erythropoietin receptor system*. Exp. Cel. Res., 253: 143-156

Wong M.L., Medrano H.F. 2005. *Real-time PCR for mRNA quantification*. BioTechniques, 39, 1: 75-85

Wright J.R., Ung Y.C., Julian J.A., Pritchard K.I., Whelan T.J., Smith C., Szechtman B., Roa W., Mulroy L., Rudinskas L., Gagnon B., Okawara G.S., Levine M.N. 2007. *Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of erythropoietin in nonsmall-cell lung cancer with disease-related anemia*. J. Clin. Oncol., 25: 1027-1032

Wu H., Liu X., Jaenisch R., Lodish H.F. 1995. *Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor*. Cell, 83: 59-67

7.2 ELEKTRONSKI VIRI

Amgen Announces Interim Results Of Aranesp(R) "PREPARE" Study In Breast Cancer Patients (3. dec. 2007)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19762512>, (30. mar. 2010)

How Red Blood Cells are Produced. 2012. Janssen Inc.

<http://www.empowerthepatient.com/red-Blood-cells.htm> (2. avg. 2009)

Lah Turnšek T. *Rak in matične celice – dve plati medalje*. 2011 Gea (feb. 2011)

http://biobanka.si/pdf/Rak_in_maticne_celice.pdf (10. okt. 2011)

Osnovna dejstva o raku. 2010. Onkološki inštitut Ljubljana

http://www.onko-i.si/za_javnost_in_bolnike/osnovna_dejstva_o_Raku/index.html (4. jan. 2010)

Teden boja proti raku. 2010. Posebna objava. Statistični urad R. Slovenije (1. mar. 2010)

http://www.stat.si/novica_prikazi.aspx?id=2982 (21. mar. 2012)

8 ZAHVALA

Potrpežljivost je vrlina vsakega raziskovalca in prijatelja.

Rada bi se zahvalila svoji somentorici, Sabini Berne, raziskovalki po poklicu in srcu, da je potrdila to odliko raziskovalca.

Posebna zahvala tudi Toniju Petanu za vso pomoč pri delu na Institutu Jožef Stefan.

Iskrena hvala staršem za spodbudo in podporo, ko sem jo najbolj potrebovala.

Hvala tebi, da si me spremjal na tej poti, z razumevanjem, večnim optimizmom in neprecenljivo tehnično pomočjo.

In nenazadnje, hvala vsem profesorjem, asistentom, sošolcem in prijateljem, da ste mi tekom študija širili obzorja z znanjem, ki ga zdaj podajam naprej.

9 PRILOGE

Priloga A

TWO-WAY ANOVA, BONFERRONI POSTTESTS

Preglednica 18: Statistična obdelava rezultatov testa MTT s programom GraphPad Prism (vpliv na proliferacijo celic MCF-7 in MCF-10A po akutni in kronični izpostaviti rHuEpo)

Akutno tretirane celice MCF-7					Kronično tretirane celice MCF-7					Akutno tretirane celice MCF-10A				
0 vs 5					0 vs 5					0 vs 2,5				
Čas (h)	0	5	Razlika	95% CI of diff.	Čas (h)	0	5	Razlika	95% CI of diff.	Čas (h)	0	2,5	Razlika	95% CI of diff.
0	1	1	0	-0,47 do 0,48	0	1	1	0	-0,55 do 0,55	0	1	1	0	-1,71 do 1,71
24	1,63	1,55	-0,08	-0,58 do 0,42	24	1,33	1,64	0,3	-0,25 do 0,86	24	1,35	1,54	0,19	-1,52 do 1,90
48	2	1,77	-0,23	-0,71 do 0,24	48	1,74	2,23	0,48	-0,07 do 1,04	48	1,32	1,15	-0,17	-1,88 do 1,54
72	2,49	1,98	-0,5	-0,98 do -0,03	72	1,76	2,2	0,44	-0,11 do 0,99					
Čas (h)	Razlika	t	vrednost P	Povzetek	Čas (h)	Razlika	t	Vrednost P	Povzetek	Čas (h)	Razlika	t	Vrednost P	Povzetek
0	0	0	P > 0,05	ns	0	0	0	P > 0,05	ns	0	0	0	P > 0,05	ns
24	-0,08	0,56	P > 0,05	ns	24	0,3	1,89	P > 0,05	ns	24	0,19	0,39	P > 0,05	ns
48	-0,23	1,67	P > 0,05	ns	48	0,48	3,02	P < 0,05	*	48	-0,17	0,34	P > 0,05	ns
72	-0,5	3,64	P < 0,01	**	72	0,44	2,75	P < 0,05	*					
0 vs 10					0 vs 10					0 vs 5				
Čas (h)	0	10	Razlika	95% CI of diff.	Čas (h)	0	10	Razlika	95% CI of diff.	Čas (h)	0	5	Razlika	95% CI of diff.
0	1	1	0	-0,48 do 0,48	0	1	1	0	-0,55 do 0,55	0	1	1	0	-1,71 do 1,71
24	1,63	1,5	-0,13	-0,63 do 0,37	24	1,33	1,73	0,4	-0,15 do 0,95	24	1,35	1,51	0,15	-1,55 do 1,86
48	2	1,93	-0,07	-0,55 do 0,40	48	1,74	2,39	0,65	0,10 do 1,20	48	1,32	1,1	-0,22	-1,93 do 1,49
72	2,49	1,95	-0,5346	-1,01 do -0,06	72	1,76	2,3	0,54	-0,01 do 1,09					
Čas (h)	Razlika	t	vrednost P	Povzetek	Čas (h)	Razlika	t	Vrednost P	Povzetek	Čas (h)	Razlika	t	Vrednost P	Povzetek
0	0	0	P > 0,05	ns	0	0	0	P > 0,05	ns	0	0	0	P > 0,05	ns
24	-0,08	0,92	P > 0,05	ns	24	0,4	2,49	P > 0,05	ns	24	0,15	0,31	P > 0,05	ns
48	-0,23	0,54	P > 0,05	ns	48	0,65	4,05	P < 0,001	***	48	-0,22	0,45	P > 0,05	ns
72	-0,5	3,86	P < 0,001	***	72	0,54	3,36	P < 0,01	**					
0 vs 20					0 vs 20					0 vs 10				
Čas (h)	0	20	Razlika	95% CI of diff.	Čas (h)	0	20	Razlika	95% CI of diff.	Čas (h)	0	10	Razlika	95% CI of diff.
0	1	1	0	-0,48 do 0,48	0	1	1	0	-0,55 do 0,55	0	1	1	0	-1,71 do 1,71
24	1,63	1,93	0,3	-0,18 do 0,78	24	1,33	1,99	0,66	0,11 do 1,21	24	1,35	1,51	0,15	-1,56 do 1,86
48	2,01	2,04	0,04	-0,44 do 0,51	48	1,74	2,17	0,42	-0,13 do 0,98	48	1,32	1,11	-0,21	-1,91 do 1,50
72	2,49	2,13	-0,36	-0,84 do 0,11	72	1,76	1,89	0,13	-0,42 do 0,68					
Čas (h)	Razlika	t	vrednost P	Povzetek	Čas (h)	Razlika	t	Vrednost P	Povzetek	Čas (h)	Razlika	t	Vrednost P	Povzetek
0	0	0	P > 0,05	ns	0	0	0	P > 0,05	ns	0	0	0	P > 0,05	ns
24	0,3	2,16	P > 0,05	ns	24	0,66	4,1	P < 0,001	***	24	0,15	0,31	P > 0,05	ns
48	0,04	0,27	P > 0,05	ns	48	0,42	2,64	P < 0,05	*	48	-0,21	0,42	P > 0,05	ns
72	-0,36	2,61	P < 0,05	*	72	0,13	0,8	P > 0,05	ns					
0 vs 40					0 vs 40					0 vs 20				
Čas (h)	0	40	Razlika	95% CI of diff.	Čas (h)	0	40	Razlika	95% CI of diff.	Čas (h)	0	20	Razlika	95% CI of diff.
0	1	1	0	-0,48 do 0,48	0	1	1	0	-0,55 do 0,55	0	1	1	0	-1,71 do 1,71
24	1,63	2,07	0,45	-0,03 do 0,92	24	1,33	1,49	0,15	-0,40 do 0,71	24	1,35	1,54	0,19	-1,52 do 1,90
48	2	2,43	0,42	-0,06 do 0,89	48	1,74	2,03	0,29	-0,27 do 0,84	48	1,32	1,33	0,01	-1,78 do 1,80
72	2,49	2,59	0,1	-0,37 do 0,58	72	1,76	2,12	0,35	-0,20 to 0,91					
Čas (h)	Razlika	t	vrednost P	Povzetek	Čas (h)	Razlika	t	Vrednost P	Povzetek	Čas (h)	Razlika	t	Vrednost P	Povzetek
0	0	0	P > 0,05	ns	0	0	0	P > 0,05	ns	0	0	0	P > 0,05	ns
24	0,45	3,22	P < 0,01	**	24	0,66	4,1	P < 0,001	***	24	0,19	0,38	P > 0,05	ns
48	0,42	3,03	P < 0,05	*	48	0,42	2,64	P < 0,05	*	48	0,01	0,02	P > 0,05	ns
72	0,1	0,74	P > 0,05	ns	72	0,35	2,21	P > 0,05	ns					
0 vs 80					0 vs 80					0 vs 40				
Čas (h)	0	80	Razlika	95% CI of diff.	Čas (h)	0	80	Razlika	95% CI of diff.	Čas (h)	0	40	Razlika	95% CI of diff.
0	1	1	0	-0,48 do 0,48	0	1	1	0	-0,55 do 0,55	0	1	1	0	-1,71 do 1,71
24	1,63	2,07	0,44	-0,06 do 0,94	24	1,33	1,68	0,34	-0,21 do 0,90	24	1,35	1,61	0,26	-1,45 do 1,96
48	2	2,25	0,25	-0,23 do 0,72	48	1,74	1,99	0,25	-0,31 do 0,80	48	1,32	1,47	0,15	-1,16 do 1,49
72	2,49	2,53	0,04	-0,43 do 0,52	72	1,76	2,03	0,27	-0,28 do 0,82					
Čas (h)	Razlika	t	vrednost P	Povzetek	Čas (h)	Razlika	t	Vrednost P	Povzetek	Čas (h)	Razlika	t	Vrednost P	Povzetek
0	0	0	P > 0,05	ns	0	0	0	P > 0,05	ns	0	0	0	P > 0,05	ns
24	0,44	3,04	P < 0,05	*	24	0,34	2,14	P > 0,05	ns	24	0,19	0,37	P > 0,05	ns
48	0,25	1,8	P > 0,05	ns	48	0,25	1,53	P > 0,05	ns	48	0,13	1,15	P < 0,001	***
72	0,04	0,3	P > 0,05	ns	72	0,27	1,67	P > 0,05	ns					

Priloga B

AGILENT - KONCENTRACIJA CELOKUPNE RNA

Preglednica 19: Celice MCF-7 in MCF-10A: število nacepljenih celic, koncentracija, čistost (28S/18S) in kakovost (RIN) celokupne RNA v vzorcih

Vzorec	Število celic	Koncentracija (ng/µl)	rRNA Ratio [28S/18S]	RIN
MCF-7 50 U 0 min	40.000	28	1,9	9,1
MCF-7 50 U 4 min	40.000	22	1,9	9,3
MCF-7 50 U 8 min	40.000	20	2,1	10,0
MCF-7 50 U 16 min	40.000	32	1,9	9,8
MCF-7 50 U 32 min	40.000	36	2,1	9,9
MCF-7 50 U 64 min	40.000	28	2,1	9,8
MCF-10A 50 U 0 min	200.000	120	2,2	10
MCF-10A 50 U 4 min	200.000	88	2,1	9,8
MCF-10A 50 U 8 min	200.000	96	2,1	10,0
MCF-10A 50 U 16 min	200.000	112	2,1	9,8
MCF-10A 50 U 32 min	200.000	98	2,1	10,0
MCF-10A 50 U 64 min	200.000	96	2,2	10,0

Vzorec je poimenovan z različnim časom akutne izpostavitve 50 U rHuEpo/ml za 0, 4, 8, 16, 32 in 64 min.

Preglednica 20: Celice MCF-7: število nacepljenih celic, koncentracija, čistost (28S/18S) in kakovost (RIN) celokupne RNA v vzorcih po tednih tretiranja z rHuEpo

Vzorec	Število celic	Koncentracija (ng/µl)	rRNA Ratio [28S/18S]	RIN
MCF-7 1 teden 5 U	50.000	126	2,0	10,0
MCF-7 1 teden 5-50 U	50.000	100	2,0	10,0
MCF-7 2 teden 5 U	50.000	200	1,9	9,8
MCF-7 2 teden 5-50 U	50.000	157	1,8	9,9
MCF-7 3 teden 5 U	50.000	313	1,9	9,9
MCF-7 3 teden 5-50 U	50.000	203	1,8	9,9
MCF-7 4 teden 5 U	50.000	347	1,9	9,7
MCF-7 4 teden 5-50 U	50.000	220	2,1	9,9
MCF-7 5 teden 5 U	50.000	217	1,9	9,8
MCF-7 5 teden 5-50 U	50.000	208	1,9	9,9
MCF-7 6 teden 5 U	50.000	169	1,9	9,9
MCF-7 6 teden 5-50 U	50.000	167	2,0	9,9

Vzorec je poimenovan s številom tednov kronične izpostavitve 5 U rHuEpo/ml ter vzporedne 8-minutne izpostavitve 50 U rHuEpo/ml. Za vsako izpostavitev smo pripravili tri paralelne vzorce celic.

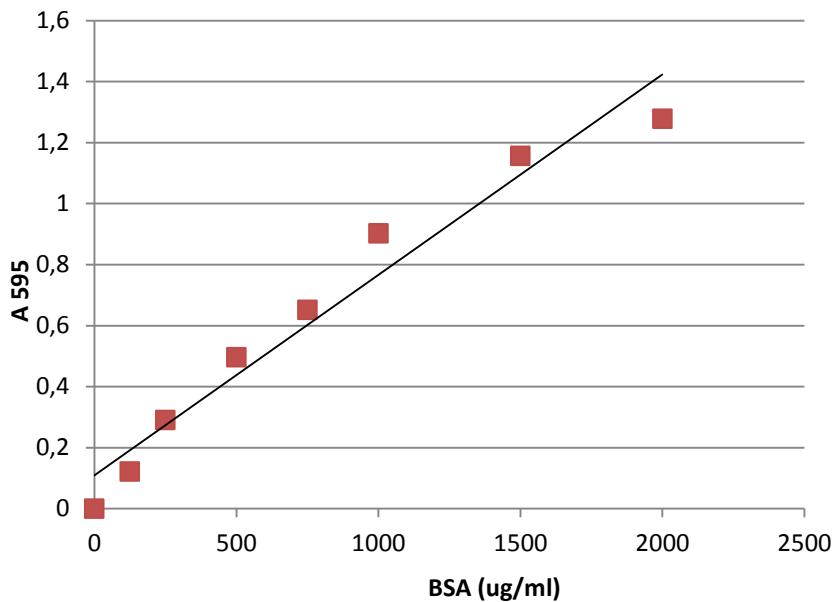
Preglednica 21: Celice MCF-10A: število nacepljenih celic, koncentracija, čistost (28S/18S) in kakovost (RIN) celokupne RNA v vzorcih po tednih tretiranja z rHuEpo

Vzorec	Število celic	Koncentracija (ng/ μ l)	rRNA Ratio [28S/18S]	RIN
MCF-10A 2 teden 5 U	200.000	90	1,9	10,0
MCF-10A 2 teden 5-50 U	200.000	69	2,0	9,9
MCF-10A 4 teden 5 U	200.000	110	1,9	9,9
MCF-10A 4 teden 5-50 U	200.000	48	1,8	N/A
MCF-10A 6 teden 5 U	150.000	66	1,9	9,9
MCF-10A 6 teden 5-50 U	150.000	33	2,1	9,7

Vzorec je poimenovan s številom tednov kronične izpostavitve 5 U rHuEpo/ml ter vzporedne 8-minutne izpostavitve 50 U rHuEpo/ml. Za vsako izpostavitev smo pripravili tri paralelne vzorce celic.

Priloga C

KONCENTRACIJA PROTEINOV – BRADFORD



Slika 29: Umeritvena krivulja BSA za določanje koncentracije proteinov po Bradfordu

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGJO

Tina STEPIŠNIK

**PRIMERJAVA IZRAŽANJA RAZLIČNIH OBLIK
ERITROPOETINSKEGA RECEPTORJA PRI
TUMORSKI IN NORMALNI CELIČNI LINIJI DOJKE
MED AKUTNO IN KRONIČNO IZPOSTAVITVIJO
ERITROPOETINU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012