

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Nina TROŠT

**VPLIV REKOMBINANTNEGA HUMANEGA
ERITROPOETINA NA RAST IN PREŽIVETJE CELIC
RAKA DOJKE TER NJIHOVO ODZIVNOST NA
CISPLATIN IN TAMOKSIFEN**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Nina TROŠT

**VPLIV REKOMBINANTNEGA HUMANEGA ERITROPOETINA NA
RAST IN PREŽIVETJE CELIC RAKA DOJKE TER NJIHOVO
ODZIVNOST NA CISPLATIN IN TAMOKSIFEN**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**THE EFFECT OF RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN
ON THE GROWTH AND SURVIVAL OF BREAST CANCER CELLS
AND THEIR RESPONSIVENES TO CISPLATIN AND TAMOXIFEN**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2013

Doktorska disertacija je zaključek doktorskega podiplomskega študija bioloških in biotehniških znanosti, znanstveno področje Genetika. Delo je potekalo na več ustanovah. Delo na celičnih linijah je potekalo na Centru za Funkcijsko Genomiko in Biočipe (CFGBC) Univerze v Ljubljani. Poskusi s cisplatinom so bili opravljeni na Onkološkem Inštitutu (OI) v Ljubljani. Analiza proteinskih lizatov na celicah RAMA je bila narejena na Inštitutu za biokemijo v Ljubljani v sodelovanju z dr. N. Hevir in prof. dr. T. Lanišnik-Rižner. Analiza proteinskega izražanja na celičnih lizatih po tretiranju s cisplatinom in rHuEPO je bila opravljena na Kemijskem Inštitutu (KI) v Ljubljani v sodelovanju s T. Zupančič in dr. M. Liović.

Na podlagi statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Senata Univerze z dne 24. 2. 2011 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski podiplomski študij bioloških in biotehnoloških znanosti, znanstveno področje Genetika. Za mentorico je bila imenovana doc. dr. Nataša Debeljak.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Simon Horvat
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Nataša Debeljak
 Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo

Član: prof. dr. Gregor Serša
 Onkološki inštitut Ljubljana

Datum zagovora: 10. julij 2013

Disertacija 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.

Nina Trošt

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 577: 618.19-006 (043.3) = 163.6
KG	eritropoetin/eritropoetinski receptor/celične linije/ rak dojke/cisplatin/mehanizmi citotoksičnosti/tamoksifen/viabilnost
AV	TROŠT, Nina, univ. dipl. biokem.
SA	DEBELJAK, Nataša (mentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, znanstveno področje genetika
LI	2013
IN	VPLIV REKOMBINANTNEGA HUMANEGA ERITROPOETINA NA RAST IN PREŽIVETJE CELIC RAKA DOJKE TER NJIHOVO ODZIVNOST NA CISPLATIN IN TAMOKSIFEN
TD	Doktorska disertacija
OP	XVIII, 152 str., 23 pregl., 63 sl., 3 pril., 234 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Eritropoetin (EPO) spodbuja proliferacijo in diferenciacijo eritroidnih progenitorjev v kostnem mozgu. Deluje preko vezave na eritropoetinski receptor (EPOR), ki je izražen tudi v tumorskem tkivu. Z doktorskim delom smo želeli ovrednotiti vlogo rekombinantnega humanega EPO (rHuEPO) na celične linije raka dojke. V celičnih linijah MCF-7, MDA-MB-361, T-47D, MDA-MB-231, SKBR3, Hs578T, Hs578Bst in MCF-10A smo najprej preverili izražanje receptorjev za estrogen (ESR), progesteron (PGR) in EPOR. Celice smo nato kratkotrajno (24 h) in dolgotrajno (9 tednov) tretirali z rHuEPO in preverili nivo njihove proliferacije. Tretirane celice (MCF-7 in MDA-MB-231) smo nadalje inducirali s cisplatinom ter preverili njihovo viabilnost. Rezultate proliferacijskih študij smo nadgradili z analizo izražanja p53-odvisnih genov ter proteinske signalizacije. Preverili smo aktivacijo signalnih poti MAPK, PI3K in JAK2/STAT5, ki so značilne za signalizacijo preko para EPO-EPOR. Pokazali smo, da so učinki rHuEPO odvisni od genetskega ozadja izbrane celične linije (izražanje ESR, PGR, mutacije v <i>TP53</i>) ter tudi od dolžine tretiranja. Kratkotrajno tretiranje z rHuEPO ima anti-proliferativni učinek, vendar hkrati zaščiti celice pred citotoksičnostjo cisplatina, saj zmanjša število senescentnih celic. Dolgotrajno tretiranje poveča proliferacijo celic MCF-7, v pogojih stresa (indukcija s cisplatinom) pa zmanjša njihovo viabilnost in poveča število senescentnih celic. Neodvisno od dolžine tretiranja rHuEPO zmanjša nivo apoptoze pri celicah, induciranih s cisplatinom. Pri hormonsko-odvisnih tipih raka dojke (ESR+/PGR+) smo ovrednotili vlogo visokega izražanja EPOR. Pripravili smo modelne celične linije s povišanim izražanjem EPOR (T-47D in MCF-7 ^{EPOR+}) ter na njih pokazali, da visoko izražanje EPOR poveča viabilnost celic, induciranih s tamoksifenom.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 577: 618.19-006 (043.3) = 163.6
CX erythropoietin/erythropoietin receptor/cell lines/breast cancer/cisplatin/mechanisms of cytotoxicity/tamoxifen/viability
AU TROŠT, Nina
AA DEBELJAK, Nataša (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Genetics
PY 2013
TI THE EFFECT OF RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN ON THE GROWTH AND SURVIVAL OF BREAST CANCER CELLS AND THEIR RESPONSIVENES TO CISPLATIN AND TAMOXIFEN
DT Doctoral Dissertation
NO XVIII, 152 p., 23 tab., 63 fig., 3 ann., 234 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Erythropoietin (EPO) stimulates proliferation and differentiation of erythroid progenitors in the bone marrow. It exerts its effects by binding to the erythropoietin receptor (EPOR), which is also expressed in the tumor tissue. We evaluated the role of recombinant human EPO (rHuEPO) in breast cancer cell lines. In MCF-7, MDA-MB-361, T-47D, MDA-MB-231, SKBR3, Hs578T, Hs578Bst and MCF-10A cell lines, we examined the expression of estrogen (ESR) and progesterone (PGR) receptors and EPOR. Cells were short (24 h) and long-term (9 weeks) treated with rHuEPO and assessed for their proliferation. Treated cells (MCF-7 and MDA-MB-231) were further exposed to cisplatin and check for their viability, expression of p53-dependent genes and protein signaling. We examined the activation of MAPK, PI3K and JAK2/STAT5 signaling pathways that are specific for the EPO-EPOR signaling axis. We have shown that rHuEPO effects depend on the genetic background of selected cell lines (ESR and PGR expression, mutations in *TP53*), as well as the length of treatment. Short-term treatment with rHuEPO has an anti-proliferative effect, but also protects cells from cisplatin cytotoxicity since it decreases the number of senescent cells. Long-term treatment increases the proliferation of MCF-7 cells, while under conditions of stress (exposure to cisplatin) it reduces their viability and increases the number of senescent cells. rHuEPO acts anti-apoptotic since it lowers the level of apoptosis independently of the length of exposure. In hormone-dependent breast cancer type (ESR+/PGR+), we evaluated the role of high EPOR expression levels. We designed the model of EPOR overexpression cell lines (T-47D and MCF-7^{EPOR+}) which was used for the elucidation of the EPOR effect on tamoxifen treatment. We have shown that high EPOR expression increases cell viability after exposure to tamoxifen.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	X
Kazalo slik	XII
Kazalo prilog	XVI
Okrajšave	XVII
1 UVOD	1
1.1 RAZISKOVALNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ERITROPOETIN (EPO)	3
2.1.1 Struktura in vloga EPO	3
2.1.2 Regulacija izražanja EPO	5
2.2 ERITROPOETINSKI RECEPTOR (EPOR)	7
2.3 VLOGA EPO IN EPOR IZVEN HEMATOPOETSKEGA TKIVA	11
2.4 SIGNALNE POTI EPO-EPOR	13
2.4.1 Fosforilacija EPOR	13
2.4.2 Signalna pot JAK2/STAT5	14
2.4.3 Signalna pot RAS/MAPK	14
2.4.4 Signalna pot PI3K	16
2.4.5 Signalna pot protein kinaze C	16
2.4.6 Vloga tirozinske fosfataze SHP1 in proteina CISH	16
2.5 UPORABA REKOMBINANTNEGA HUMANEGA ERITROPOETINA V KLINIČNI ONKOLOGIJI	17
2.5.1 Izražanje in vloga EPOR v tumorskem tkivu	18

2.5.2	rHuEPO in rak dojk	20
2.6	CISPLATIN	24
2.6.1	Mehanizmi delovanja cisplatina	24
2.6.2	Cisplatin in rHuEPO	26
2.7	TAMOKSIFEN	27
2.7.1	Mehanizmi delovanja	28
2.7.2	Razvoj celične odpornosti na TAM	28
3	MATERIALI IN METODE	31
3.1	NESMRTNE CELIČNE LINIJE	31
3.1.1	Receptorski status celičnih linij raka dojke	32
3.1.2	Priprava osnovnega rastnega medija	32
3.1.3	Precepljanje celic	33
3.1.4	Štetje celic	34
3.2	TESTI CELIČNE PROLIFERACIJE	35
3.2.1	Direktno štetje celic z avtomatskim števcem ADAM	35
3.2.2	Kalorimetrične metode	35
3.2.3	XCELLigence	36
3.3	TESTI KLONIGENOSTI	37
3.4	TRETIRANJE CELIC Z rHuEPO	37
3.4.1	Testi celične proliferacije	38
3.4.2	Testi klonigenosti	38
3.4.3	Analiza celične signalizacije na proteinskem nivoju	40
3.4.4	Statistična analiza	40
3.5	TRETIRANJE CELIC Z rHuEPO IN CISPLATINOM	40
3.5.1	Testi celične proliferacije	40
3.5.2	Testi klonigenosti	41
3.5.3	Analiza izražanja tarčnih genov	42

3.5.4	Analiza celične signalizacije na proteinskem nivoju	43
3.5.5	Statistična analiza	43
3.6	DETEKCIJA SENESENCE	44
3.7	DETEKCIJA APOPTOZE	44
3.8	qPCR-KVANTITATIVNA VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REAL-NEM ČASU	45
3.8.1	Načrtovanje začetnih oligonukleotidov	46
3.8.2	Preverjanje uspešnosti delovanja začetnih oligonukleotidov	47
3.8.3	Izolacija RNA iz celičnih linij raka dojke	48
3.8.4	Meritev koncentracije izolirane RNA ter analiza njene kvalitete	49
3.8.5	Priprava vzorcev cDNA	49
3.8.6	Meritev izražanja tarčnih genov	50
3.8.7	Izračun relativnih vrednosti izražanja genov ter njihova normalizacija	54
3.8.8	Statistična analiza podatkov	55
3.9	IZOLACIJA PROTEINOV IN ZAZNAVANJE TARČNIH PROTEINOV	55
3.9.1	Izolacija celokupnih proteinov iz celičnih linij	55
3.9.2	Določevanje koncentracije proteinov po metodi BCA	56
3.9.3	Ločevanje proteinov na poliakrilamidenm gelu	57
3.9.4	Metoda prenosa western: mokri prenos	58
3.9.5	Zaznava tarčnih proteinov	59
3.9.6	Ocena količine proteinov	60
3.10	KLONIRANJE IN DELO Z BAKTERIJAMI	61
3.10.1	Priprava bakterijskega gojišča	61
3.10.2	Pomnoževanje plazmidov	61
3.10.3	Izolacija plazmidne DNA	62
3.10.4	Prekloniranje gena za <i>EPOR</i> v ekspresijski plazmid pcDNA3.1/V5-His TOPO	62
3.10.5	Transfekcije	64

3.10.6 Selekcija klonov celic s povečanim izražanjem EPOR	65
3.10.7 Identifikacija klonov s povišanim izražanjem EPOR	65
3.11 ANALIZA ODZIVNOSTI CELIC NA TRETIRANJE S TAMOKSIFENOM	65
3.12 ANALIZA IZRAŽANJA PROTEINOV ESR, PGR IN GPER PRI CELIČNIH LINIJAH RAMA 37 IN RAMA 37-28	66
4 REZULTATI	67
4.1 IZRAŽANJE RECEPTORJEV ZA RASTNE FAKTORJE	67
4.1.1 Izražanje genov <i>EPOR</i>, <i>EPO</i>, <i>ESR</i>, <i>PGR</i> in <i>GPER</i> v celičnih linijah RAMA 37 in RAMA 37-28	71
4.1.2 Izražanje proteinov ESR in GPER v celičnih linijah RAMA 37 in RAMA 37-28	72
4.1.3 Izražanje EPOR na proteinskem nivoju	72
4.2 VPLIV TRETIRANJA Z rHuEPO NA PROLIFERACIJO IN KLONIGENOST CELIC RAKA DOJK	73
4.2.1 Vpliv rHuEPO na celično proliferacijo	73
4.2.2 Testi klonigenosti	78
4.3 VPLIV rHuEPO NA IZRAŽANJE GENOV ZGODNJEGA ODZIVA	82
4.4 ANALIZA CELIČNE PROLIFERACIJE NA PROTEINSKEM NIVOJU	82
4.5 TRETIRANJE CELIC Z rHuEPO IN CISPLATIN	91
4.5.1 Vpliv rHuEPO na viabilnost celic po tretiranju s cisplatinom	91
4.5.2 Testi klonigenosti	93
4.5.3 Analiza izražanja genov signalne poti p53	95
4.5.4 Analiza celične signalizacije na proteinskem nivoju	102
4.5.5 Analiza senescence	105
4.5.6 Analiza apoptoze	106
4.5.7 Aktivacija signalnih poti, udeleženih v procese apoptoze, celičnega cikla ter popravljanje DNA	108
4.6 IDENTIFIKACIJA CELIC S POVIŠANIM IZRAŽANJEM EPOR	109

4.6.1 Restriksijska analiza <i>EPOR</i> po vključitvi v plazmidni vektor pcDNA3.1/V5-His TOPO	109
4.7 VLOGA EPOR PRI CELIČNEM ODGOVORU NA TAMOKSIFEN	111
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	113
5.1 RAZPRAVA	113
5.1.1 Karakterizacija modelnega sistema: celične linije raka dojk	114
5.1.2 Povezava med izražanjem receptorjev za rastne faktorje in odzivnostjo na rHuEPO	115
5.1.3 Vpliv rHuEPO na viabilnost celic po tretiranju s cisplatinom	118
5.1.4 Vpliv rHuEPO in cDDP tretiranja na signalno pot p53	119
5.1.5 Vpliv EPOR na tretiranje s tamoksifenom	122
5.2 SKLEPI	124
6 POVZETEK (SUMMARY)	126
6.1 POVZETEK	126
6.2 SUMMARY	128
7 VIRI	130
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Pregl. 1: Vpliv tretiranja z rHuEPO na odzivnosti humanih tumorskih celičnih linij na anti-tumorsko terapijo (Szenajch in sod., 2010)	21
Pregl. 2: Pred-klinične študije na modelih raka dojke: Delovanje in vloga EPOR (McKinney in Arcasoy, 2011)	23
Pregl. 3: Lastnosti celičnih linij	31
Pregl. 4: Receptorski status celičnih linij raka dojke	32
Pregl. 5: Celične linije in ustrezna osnovna rastna gojišča	33
Pregl. 6: Test celične proliferacije po tretiranju z rHuEPO: koncentracije nacepljenih celic	38
Pregl. 7: Koncentracije celic, uporabljene pri testih klonigenosti	39
Pregl. 8: Oligonukleotidni začetniki	46
Pregl. 9: Probe TaqMan	47
Pregl. 10: Temperaturni profil verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR)	48
Pregl. 11: Priprava osnovnih raztopin za obdelavo vzorcev RNA z DNazo in sintezo cDNA	50
Pregl. 12: Priprava osnovne reakcijske raztopine za reakcijo qPCR s tehnologijo SybrGreen (en vzorec)	51
Pregl. 13: Priprava osnovne reakcijske raztopine za reakcijo qPCR na mikrotiterskih ploščicah StellarArray (1x ploščica s 384 luknjicami)	52
Pregl. 14: Temperaturni profil verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR) za analizo mikrotiterskih ploščic StellarArray	53
Pregl. 15: Priprava osnovne reakcijske raztopine za reakcijo qPCR s tehnologijo TaqMan (en vzorec)	54
Pregl. 16: Sestava ločevalnega in koncentracijskega poliakrilamidnega gela za ločevanje proteinov	57
Pregl. 17: Seznam primarnih in sekundarnih protiteles, uporabljenih pri prenosu western	60
Pregl. 18: Sestava LB gojišča za gojenje bakterijskih kultur	61

Pregl. 19:	Zaporedje začetnih nukleotidov, uporabljenih pri prekloniranju gena <i>EPOR</i>	63
Pregl. 20:	Temperaturni program verižne reakcije s polimerazo (PCR) za pomnoževanje gena <i>EPOR</i> iz plazmidne DNA	63
Pregl. 21:	Koncentracija celic za analizo viabilnosti po tretiranju s TAM	66
Pregl. 22:	Pearsonovi korelacijski koeficienti (r), izračunani za izražanje receptorjev v celičnih linijah	70
Pregl. 23:	Izražanje gena <i>EPOR</i> v celicah po transfekciji s plazmidnim vektorjem pcDNA3.1/V5-His <i>EPOR</i> wt	110

KAZALO SLIK

	str.
Sl. 1: Humani eritropoetin (EPO) (Jelkmann, 1992; Cheetham in sod., 1998)	4
Sl. 2: Shema regulacije izražanja gena za eritropoetin (<i>EPO</i>) (Bunn, 2013)	6
Sl. 3: Regulacija prepisovanja <i>EPO</i> s HIF-2 α (Haase, 2010)	7
Sl. 4: Shematski prikaz eritropoetinskega receptorja (EPOR) (Syed in sod., 1998)	9
Sl. 5: Alternativno izrezovanje <i>EPOR</i> ; nastanek topnih in skrajšanih izooblik receptorja (Sinclair in sod., 2007)	11
Sl. 6: Izražanje mRNA za <i>EPOR</i> v različnih tkivih (Elliott in Sinclair, 2012)	12
Sl. 7: Signalne poti, ki se aktivirajo po vezavi EPO na EPOR (Szenajch in sod., 2010)	15
Sl. 8: Izooblike proteinov EPOR in specifičnost komercialno dostopnih protiteles C-20 in M-20 (Sinclair in sod., 2007)	19
Sl. 9: Shematski prikaz transporta cDDP v celico oziroma iz nje ter transport in akumulacija cDDP znotraj celice (Sancho-Martínez in sod., 2012)	25
Sl. 10: Genotoksični učinki cDDP v jedru celice (Sancho-Martínez in sod., 2012)	27
Sl. 11: Signalne poti, ki so udeležene v razvoj odpornosti na TAM (García-Becerra in sod., 2012)	30
Sl. 12: Tloris ploščice za analizo celične proliferacije po izpostavitvi celic rHuEPO	38
Sl. 13: Shema poskusa za analizo klonigenosti po tretiranju z rHuEPO	39
Sl. 14: Shema poskusa za analizo celične viabilnosti po izpostavitvi rHuEPO in tretiranju s cDDP	41
Sl. 15: Shematski prikaz testa klonigenosti po izpostavitvi rHuEPO in cDDP	42
Sl. 16: Shematski prikaz priprave vzorcev za analizo aktivacije signalnih poti in izražanja tarčnih genov po tretiranju z rHuEPO in cDDP	43
Sl. 17: Shema "sendviča" za prenos proteinov iz gela na membrano	59
Sl. 18: Diagram Heatmap	67
Sl. 19: Izražanje genov za <i>EPOR</i> , <i>EPHB4</i> , <i>CSF2RB</i> , <i>ESR1</i> , <i>ESR2</i> , <i>PGR</i> , <i>GPER</i> (izooblike <i>GPER1</i> in <i>GPER2</i>) in <i>EPO</i> v celičnih linijah raka dojke	68

Sl. 20:	Hierarhično gručanje celičnih linij	69
Sl. 21:	Izražanje genov <i>EPOR</i> , <i>EPO</i> , <i>ESR</i> , <i>PGR</i> in <i>GPER</i> v celičnih linijah RAMA 37 in RAMA 37-28	71
Sl. 22:	Izražanje proteinov ESR2 in GPER v celičnih linijah RAMA 37 in RAMA 37-28	72
Sl. 23:	Izražanje proteina EPOR	72
Sl. 24:	Določitev delovne koncentracije rHuEPO; titracijska krivulja za celično linijo MCF-7	73
Sl. 25:	Proliferacija celic MCF-7 v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO (5 U/ml)	74
Sl. 27:	Proliferacija celic MDA-MB-231 v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO (5 U/ml)	74
Sl. 26:	Proliferacija celic T-47D v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO (5 U/ml)	75
Sl. 28:	Proliferacija celic Hs578T v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO (5 U/ml)	75
Sl. 29:	Proliferacija celic SKBR3 v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO (5 U/ml)	76
Sl. 30:	Proliferacija celic RAMA 37 v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO (5 U/ml)	76
Sl. 31:	Proliferacija celic RAMA 37-28 v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO (5 U/ml)	77
Sl. 32:	Primerjava hitrosti proliferacije za celični liniji RAMA 37 in RAMA 37-28	78
Sl. 33:	Testi klonigenosti za celično linijo MCF-7: število kolonij v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO	79
Sl. 34:	Testi klonigenosti za celično linijo MDA-MB-231: število kolonij v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO	79
Sl. 35:	Testi klonigenosti za celično linijo Hs578T: število kolonij v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO	80
Sl. 36:	Testi klonigenosti za celični liniji RAMA 37 in RAM 37-28: število kolonij v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO	81
Sl. 37:	Izražanje genov zgodnjega odziva pri celični liniji MCF-7 po tretiranju z rHuEPO	83
Sl. 38:	Izražanje genov zgodnjega odziva pri celični liniji T-47D po tretiranju z rHuEPO	84

Sl. 39:	Izražanje genov zgodnjega odziva pri celični liniji MDA-MB-231 po tretiranju z rHuEPO	85
Sl. 40:	Izražanje genov zgodnjega odziva pri celični liniji SKBR3 po tretiranju z rHuEPO	86
Sl. 41:	Izražanje genov zgodnjega odziva pri celični liniji Hs578T po tretiranju z rHuEPO	87
Sl. 42:	Fosforilacija proteinov ERK (pERK), AKT (pAKT) in STAT5 (pSTAT5) po izpostavitvi celic rHuEPO	88
Sl. 43:	Fosforilacija proteinov ERK (pERK) in AKT (pAKT) po tretiranju celic RAMA 37 in RAMA 37-28 z rHuEPO	89
Sl. 44:	Fosforilacija proteinov ERK (pERK) po tretiranju celic MDA-MB-231 z rHuEPO	90
Sl. 45:	Vpliv rHuEPO na viabilnost celice MCF-7 po tretiranju s cisplatinom	92
Sl. 46:	Vloga rHuEPO na viabilnost celic MDA-MB-231 po tretiranju s cisplatinom	93
Sl. 47:	Testi klonigenosti: Delež preživetja celic MCF-7 glede na rHuEPO tretiranje in izpostavitvev cisplatinu	94
Sl. 48:	Testi klonigenosti: Delež preživetja celic MDA-MB-231 glede na rHuEPO tretiranje in izpostavitvev cisplatinu	95
Sl. 49:	Diferencialno izraženi geni glede na rHuEPO tretiranje	96
Sl. 50:	Diferencialno izraženi geni po izpostavitvi celic cisplatinu in tretiranju z rHuEPO	97
Sl. 51:	Izražanje genov signalne poti p53 v celicah MCF-7 po tretiranju z rHuEPO in cDDP: diagram Heatmap	98
Sl. 52:	Večrazsežno lestvičenje vzorcev celic MCF-7 po tretiranju z rHuEPO in cDDP glede na izražanja genov signalne poti p53	99
Sl. 53:	Analiza izražanja genov signalne poti p53: diferencialno izražani geni glede na tretiranje z rHuEPO	100
Sl. 54:	Analiza izražanja genov signalne poti p53: diferencialno izražani geni glede na izpostavitvev cisplatinu, v odvisnosti od rHuEPO tretiranja	101
Sl. 57:	Fosforilacija proteina ERK (pERK) po tretiranju celic MDA-MB-231 z rHuEPO in izpostavitvi cisplatinu	102

Sl. 55:	Signalizacija na nivoju transkriptoma v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO	103
Sl. 56:	Signalizacija na nivoju transkriptoma v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO in cisplatinom	104
Sl. 58:	Vpliv tretiranja z rHuEPO na delež senescentnih celic MCF-7 po izpostavitvi cisplatinu	105
Sl. 59:	Vpliv kratkotrajnega in dolgotrajnega tretiranja z rHuEPO na nivo apoptoze pri celicah MCF-7, izpostavljenih cisplatinu	107
Sl. 60:	Izražanje proteinov p21 Waf1/Cip1, pH2AX, PUMA, BAD, pBAD in pBCL2 po tretiranju celic MCF-7 z rHuEPO in cisplatinom	108
Sl. 61:	Restrikcijska analiza plazmidnega vektorja pcDNA3.1/V5-His <i>EPOR</i> wt	110
Sl. 62:	Viabilnost celic RAMA 37 in RAMA 37-28 po tretiranju s tamoksifenom	111
Sl. 63:	Viabilnost celic T-47D in T2 (T-47D ^{EPOR+}) po tretiranju s tamoksifenom	112

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Geni, vključeni na qPCR ploščici StellarArray (Lonza, 00188319)
- Priloga B: Shema plazmidnega vektorja pcDNA3.1/V5-His TOPO in sekvenca poliklonskega mesta plazmidnega vektorja pcDNA3.1/V5-His TOPO
- Priloga C: Sekvenca *EPOR* divjega tipa z oligonukleotidnima začetnikoma (označena rdeče) za prekloniranje v plazmidni vektor pcDNA3.1/V5-His TOPO

OKRAJŠAVE

AKT	protein kinaza B; uradni simbol AKT1; angl. v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
AC	adenokarcinom; angl. adenocarcinoma
AF-1(2)	domena za funkcijsko aktivacijo-1(2); angl. activatin function-1(2)
AIB1	pomnožen v tkivu dojke; angl. amplified in breast
ANOVA	analiza variance; angl. analysis of variance
ATP	adenozin trifosfat; angl. adenosine triphosphate
BAD	z BCL2 povezan agonist smrti; angl. BCL2-associated agonist of cell death
BCL2	regulator apoptoze BCL2; angl. B-cell CLL/lymphoma 2
BCL2L1	BCL2-podobni protein 1; angl. BCL2-like 1
BFU-E	eritroidni začetniki, brsteči; angl. burst forming unit erythroid
BAK1	BCL2 antagonist/ubijalec 1; angl. BCL2-antagonist/killer 1
BAX	BCL2-vezan protein X; angl. BCL2-associated X protein
CASP	cisteinska peptidaza, povezana z apoptozo; angl. apoptosis-related cysteine peptidase
CCND1	ciklin D1; angl. cyclin D1
cDDP	cisplatin; angl. cisplatin
CDKN1B	inhibitor celičnega cikla p27 ^{Kip1} ; angl. cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
CFA	test klonigenosti, angl. colony formation assay
CFU-E	eritroidni začetniki, ki tvorijo kolonije; angl. colony forming unit erythroid
CISH	s citokini indiciran protein z SH2 domeno; angl. cytokine-inducible SRC homology 2-containing protein
CREBBP	CREB vezavni protein; angl. CREB-binding protein
CRKL	kinaza, homolog CT10 ptičjega onkogeno; angl. CRKL v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like
CSF2	granulocyte in makrofage stimulirajoči faktor 2; angl. colony-stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
CSF2RB	nizko afinitetni receptor za faktor, ki stimulira rast kolonij 2; angl. colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity
CTR1	transporter bakra; uradni simbol SLC31A1; angl. solute carrier family 31 (copper transporters), member 1

DBS	dvojni prelomi molekule DNA; angl. DNA double strand breaks
EGFR	receptor za epidermalni rastni faktor; angl. epidermal growth factor receptor
EPHB4	receptor za efrin B4; angl. ephrin receptor B4
EPO	eritropoetin; angl. erythropoietin
EPOR	receptor za eritropoetin; angl. erythropoietin receptor
ERK	z mitogeni aktivirana protein kinaza 1; uradni simbol MAPK1; angl. mitogen-activated protein kinase 1
ESR1	receptor za estrogene α ; angl. estrogen receptor α
ESR2	receptor za estrogene β ; angl. estrogen receptor β
FBS	serum govejega zarodka; angl. foetal bovine serum
FDA	združenje za hrano in zdravila; angl. food and drug association
FDR	popravek multiplih primerjav; angl. false discovery rate
FOG1	prijatelj transkripcijskega faktorja GATA; uradni simbol ZFPM1; angl. freing of GATA
GATA	GATA vezavni protein; angl. GATA-binding protein
GPCR	receptor, sklopljen z G-proteini; angl. G-protein coupled receptor
GPOR	membransko vezan receptor za estrogen; angl. G protein-coupled receptor
GRB2	z receptorji rastnih faktorjev povezan protein 2; angl. growth factor receptor-bound protein 2
GSK3	kinaza glikogenske sintaze 3; angl. glycogen synthase kinase 3
HER2	humani receptor za epidermalni rastni faktor 2; uradni simbol ERBB2; angl. human epidermal growth factor receptor 2
HIF	faktor hipoksije; angl. hypoxia-inducible factor
HNF4	hepatocitni jedrni faktor 4; angl. Hepatocyte Nuclear Factor-4
HSPA	protein vročinskega šoka 70 kDa; angl. heat-shock 70 kDa protein
IDC	invazivni duktalni karcinom; angl. invasive ductal carcinoma
IL	interlevkin; angl. interleukin
IL1A	interlevkin 1 alfa; angl. interleukin 1, alpha
IFNG	interferon gama; angl. interferon, gamma
JAK2	janus kinaza 2; angl. Janus kinase 2
JNK	z mitogeni aktivirana protein kinaza 8; uradni simbol MAPK8; angl. mitogen-activated protein kinase 8
KIE	element indukcije v ledvicah; angl. Kidney Inducible Element

LBD	ligand vezavna domena; angl. ligand-binding domain
LC ₅₀	efektivna koncentracija 50 %; angl. lethal concentration 50 %
LYN	tirozinska kinaza LYN; angl. v-src-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog
MAPK	z Ras mitogeni aktivirana proteinska kinaza; angl. Ras-mitogen activated protein kinase
MDR	protein za multiplo rezistenco; uradni simbol ABCB; angl. ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
MRP	z multiplo rezistenco povezani protein; uradni simbol ABCC1; angl. ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1
NaDS	natrijev dodecil sulfat; angl. sodium dodecyl sulfate
NFKB1	jedrni faktor kapa 1; angl. nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cell 1
NOXA	s PMA inducirani protein 1; uradni simbol PMAIP1; angl. PMA-induced protein 1
PBS	fosfatni pufer; angl. phosphate buffer saline
PGR	receptor za progesteron; angl. progesterone receptor
PHD	HIF prolil hidroksilaze; uradno ime EGLN; angl. HIF-prolil hydroxylases
PI3K	fosfoinozitol kinaza 3; uradni simbol PIK3CA; angl. phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha
PRKC	protein kinaza C; angl. protein kinase C
PUMA	BCL2 vezavni protein 3; uradni simbol BBC3; angl. BCL2 binding component 3
p38	z mitogeni aktivirana protein kinaza 14; uradni simbol MAPK14; angl. mitogen-activated protein kinase 14
p53	tumorski protein 53; uradni simbol TP53; angl. tumor protein 53
RAF1	raf1 onkogen; angl. v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
RKC	rdeče krvne celice; angl. red blood cells
RIN	integriteta RNA; angl. RNA integrity number
ROS	reaktivne kisikove zvrsti; angl. reactive oxygen species
SCF	faktor izvornih celic; uradni simbol KITLG; angl. stem cell factor

SERM	selektivni modulator receptorja za estrogen; angl. selective estrogen receptor modulator
SHC1	transformirajoči protein 1 s Src 2 homologno domeno; angl. SHC (Src homology 2 domain-containing) transforming protein 1
SHP	fosfotirozinska fosfataza z domeno SH2; uradno ime PTPN; angl. (Src homology 2 domain-containing) phosphotyrosine phosphatase
SHP1	fosfotirozinska fosfataza 1 z domeno SH2; uradno ime PTPN6; angl. (Src homology 2 domain-containing) phosphotyrosine phosphatase 1
SOCS	inhibitor citokinske signalizacije; angl. suppressor of cytokine signaling
SRC1	koaktivator receptorjev za steroide-1; angl. steroid receptor coactivator-1
STAT	aktivatorji in signalizatorji transkripcije; angl. signal transducers and activators of transcription
TAM	tamoksifen; angl. tamoxifen
TEC	tec tirozinska kinaza; angl. tec protein tyrosine kinase
4-OH-TAM	4-hidroksi tamoksifen; angl. 4-hydroxytamoxifen
TNF	faktor tumorske nekroze alfa; angl. tumor necrosis factor alpha
Tyr	tirozin; angl. tyrosine
UPR	odgovor nezvitih proteinov; angl. unfolded protein response
qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo; angl. quantitative polymerase chain reaction
VHL	protein Von Hippel-Lindau, ubikvitinska protein ligaza E3; angl. Von Hippel-Lindau tumor suppressor, E3 ubiquitin protein ligase

1 UVOD

xHormon eritropoetin (EPO) je regulator zorenja eritroidnih progenitorjev v kostnem mozgu in omogoča njihovo proliferacijo in diferenciacijo v zrele eritrocite. Deluje preko vezave na površinski eritropoetinski receptor (EPOR), ki je primarno izražen na celicah hematopoetskega tkiva. Aktivacija receptorja sproži signalne poti, ki so udeležene v procesih rasti, proliferacije in zaščite pred apoptozo. Izražanje EPOR pa ni vezano le na hematopoetsko tkivo in je bilo potrjeno tudi v drugih ne-hematopoetskih tkivih ter tudi pri raku. Mehanizmi delovanja signalizacije EPO-EPOR v teh tkivih še niso pojasnjeni. V klinični onkologiji se rekombinantni humani EPO (rHuEPO) uporablja za zdravljenje anemij, ki se razvijejo kot posledica kemo- in radioterapije ter infiltracije tumorskih celic v kostni mozeg. Vendar pa je uporaba rHuEPO vprašljiva, saj je več kliničnih študij izpostavilo negativne učinke rHuEPO na napredovanje bolezni ter posledično na preživetje bolnikov (Szenajch in sod., 2010).

Namen našega dela je bil raziskati mehanizme delovanja rHuEPO na celične linije raka dojke. V izbranih celičnih linijah smo na genskem in proteinskem nivoju želeli opredeliti nivo izražanja EPOR ter določiti vpliv rHuEPO tretiranja na celično proliferacijo in izražanje genov zgodnjega odziva. Poleg tega nas je zanimalo, ali rHuEPO aktivira signalne poti JAK2/STAT5, MAPK in PI3K, ki so značilne za signalizacijo EPO-EPOR v hematopoetskem tkivu. Na nivoju izražanja genov signalne poti p53 ter proteinov, udeleženih v procese apoptoze in regulacije celičnega cikla smo želeli opredeliti vlogo rHuEPO tretiranja na citotoksičnost, posredovano s cisplatinom. Zanimalo nas je tudi, ali rHuEPO spremeni nivoja apoptoze in senescence po indukciji s cisplatinom, ki bi lahko vplivala na viabilnost celic. Dodatno, nas je zanimala vloga EPOR v terapiji hormonsko-odvisnih oblik raka dojke s tamoksifenom. Pripravili smo modelne celične linije s povečanim izražanjem EPOR in izraženimi receptorji za estrogene (ESR) ter preverili njihovo viabilnost po tretiranju s tamoksifenom. Postavili smo si tri hipoteze, ki se navezujejo na vlogo signalnega para EPO-EPOR v procesih celične proliferacije, apoptoze in senescence. Kot modelni sistem smo uporabili celične linije raka dojke v normalnih in stresnih pogojih (indukcija s cisplatinom oziroma tamoksifenom).

1.1 RAZISKOVALNE HIPOTEZE

Hipoteza 1: rHuEPO poveča proliferativni potencial celic raka dojke preko aktivacije signalnih poti JAK2/STAT5, MAPK in PI3K in spremeni fosforilacijski vzorec in/ali izražanje proteinov ERK, AKT in STAT5.

Hipoteza 2: rHuEPO zaščiti celice raka dojke pred citotoksičnostjo cisplatina, zmanjša nivo njihove apoptoze ter pripomore k razvoju agresivnejših fenotipov.

Hipoteza 3: Visok nivo izražanja eritropoetinskega receptorja (EPOR) pri hormonsko-odvisnih oblikah celičnih linij raka dojke (ESR+, PGR+) negativno vpliva na učinkovitost tamoksifena in pripomore k razvoju odpornosti na tamoksifen.

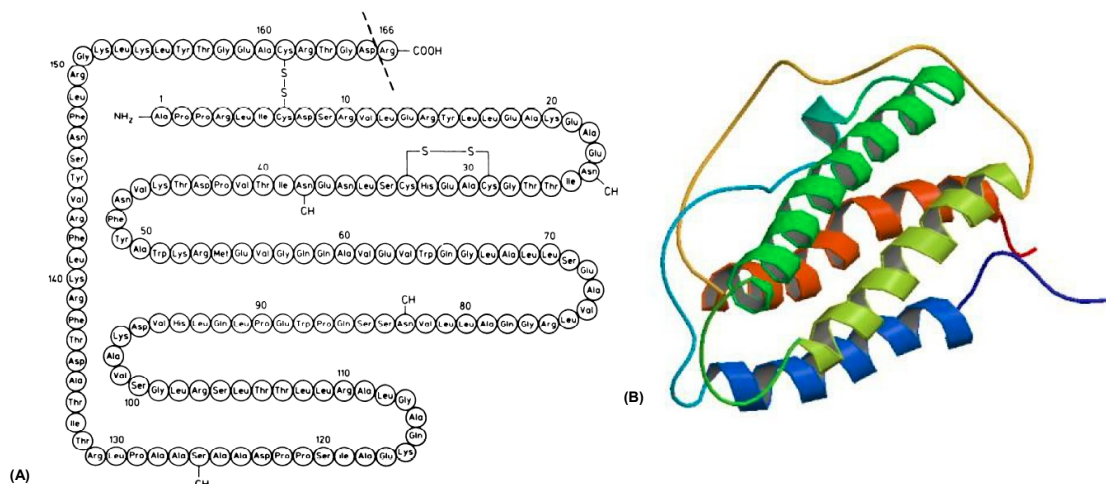
2 PREGLED OBJAV

2.1 ERITROPOETIN (EPO)

2.1.1 Struktura in vloga EPO

Eritropoetin je hormon, ki je ključnega pomena za proces zorenja rdečih krvnih celic (RKC) ali eritrocitov v kostnem mozgu. Gre za proces eritropoeze, v katerem EPO promovira viabilnosti eritroidnih začetnikov, njihovo proliferacijo ter končno diferenciacijo do zrelih eritrocitov (Bunn, 2013). Proces eritropoeze se začne s progresivno diferenciacijo multipotentnih hematopoetskih izvornih celic do zgodnjih BFU-E (angl. Burst Forming Unit-Erythroid) oziroma poznih eritroidnih začetnikov CFU-E (angl. Colony Forming Unit-Erythroid). CFU-E so od EPO odvisne celice, ki po 3-5 mitotskih delitvah dozoriijo v zrele eritrocite. Med EPO odzivne celice spadajo še pro-eritroblasti in bazofilni eritroblasti ter BFU-E v pozni fazi razvoja (Chateauvieux in sod., 2011).

EPO je hormon iz družine citokinov tipa I, za katero je značilno globularno zvitje s štirimi amfipatičnimi α -vijačnicami. Zapis za gen *EPO* je na kromosomu 7 (q11-q22) in obstaja v eni sami kopiji. Tvori ga 5 eksonov in 4 introni, ki kodirajo prekurzorski protein s 193 aminokislinskimi ostanki. Po odcepu hidrofobnega sekretornega peptida iz N-konca, ki poteče v endolazmatskem retikulumu ter po odcepu C-končnega arginina 166, dobimo EPO protein s 165 aminokislinskimi ostanki. Dodatni post-translacijski modifikaciji proteina sta glikozilacija, ki poteče v Golgijevem aparatu in tvorba disulfidnih mostičkov. Funkcionalen EPO v zreli obliki ima štiri sladkorne verige, ki predstavljajo 40 % (w/w) celotne molekule ter dva disulfidna mostička (Cys7-161 in Cys29-33). Primarna struktura proteina EPO je prikazana na sliki 1. Peptidno jedro proteina ima molekulsko maso 18 kDa in zadostuje za *in vitro* aktivacijo procesa eritropoeze. Sladkorne verige dajejo proteinu navidezno velikost 34-38 kDa (NaDS geli) in so ključnega pomena za stabilnost proteina *in vivo*, njegovo topnost in biološko aktivnost (Jelkmann, 1992). Zlasti pomembni za ohranjanje stabilnosti proteina *in vivo* so trije N-vezani kompleksni polisaharidi (Asp24, 38 in 83), vloga O-vezanega oligosaharida (Ser126) pa naj ne bi bila povezana z ohranjanjem stabilnosti proteina. Med posamezniki obstajajo individualne razlike v sestavi N-vezanih sladkornih komponent. Z metodo gelske kromatografije so iz človeškega seruma izolirali 3 tipe EPO, ki se medsebojno ločijo v biološki in imuno reaktivnosti. Biološka aktivnost je odvisna tudi od naboja ključnih aminokislinskih ostankov, zato EPO z alkiliranimi SH-skupinami cisteinov ni biološko aktiven. Razlike v neto naboju EPO vodijo v patološka stanja in so bile potrjene pri bolnike s policitemijo in anemijo (Wide in Bengtsson, 1990).



Slika 1: Humani eritropoetin (EPO) (Jelkmann, 1992; Cheetham in sod., 1998)

(A) Shematski prikaz primarne strukture humanega EPO. Zreli protein EPO je zgrajen iz 165 aminokislinskih ostankov. Na sliki so prikazane post-translacijske spremembe: (i) odcep arginina 166 s C-konca proteina; (ii) glikozilacija Asp24, 38, 83 ter Ser126; (iii) tvorba disulfidnih mostičkov (Cys7-161 in Cys29-33). (B) 3D struktura humanega eritropoetina. Globularno zvitje proteina EPO, ki ga tvorijo 4 α -vijačnice.

Figure 1: Human erythropoietin (EPO) (Jelkmann, 1992; Cheetham in sod., 1998)

(A) Schematic representation of primary structure of human EPO. The mature EPO protein is composed of 165 amino acid residues. Figure shows post-translation modification of EPO protein: (i) cleavage of arginine 166 from the C-terminus; (ii) the glycosylation of Asp24, 38, 83 and Ser126 and (iii) disulfide bridge formation (between Cys7-161 and Cys29-22). (B) 3D structure of human erythropoietin. EPO is a globular protein, comprising 4 α -helix.

Količina EPO v krvni plazmi je obratno sorazmerna z maso RKC oziroma hematokritom in je v normalnih pogojih v mejah med 6 in 32 U/l (Jelkmann, 2011). Ko količina hemoglobina v krvi pade pod 100 oziroma 120 g/l se plazemski nivo EPO poveča proporcionalno z resnostjo nastale anemije. Serumska koncentracija EPO je pri ženskah in moških približno enaka, je neodvisna od starosti in med menstrualnim ciklusom ne niha. Življenjska doba EPO v krvni plazmi je približno 7-8 h (Bunn, 2013).

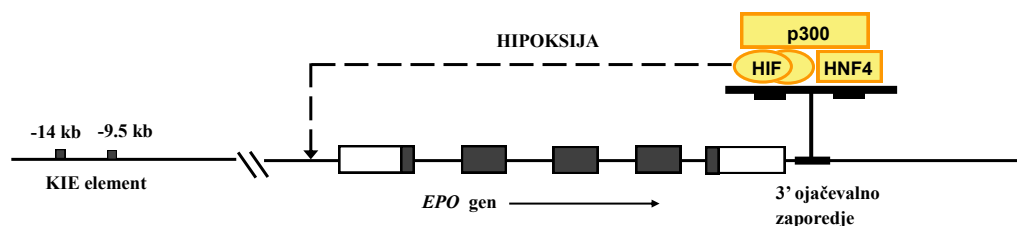
Tekom embrionalnega in neonatalnega razvoja, vse dokler proces eritropoeze ne preide v domeno kostnega mozga, so jetra glavno mesto sinteze EPO. Pri odraslem človeku pa to vlogo prevzamejo ledvica (85 %), medtem ko jetra sintetizirajo le manjši del (15 %). V ledvicah sinteza EPO poteka v nevronalnih fibroblastih v intersticijski regiji blizu proksimalnih tubularnih celic (Obara in sod., 2008; Maxwell in sod., 1993a; Suzuki in sod., 2007; Koury in sod., 1991; Frede in sod., 2011; Fisher in sod., 1996), v jetrih pa v perivenskih hepatocitih (Koury in sod., 1991; Zanjani in sod., 1977). Izražanje EPO je bilo potrjeno tudi v možganih, pljuči, srcu, kostnem mozgu, vranici ter v reproduktivnih organih. V glia celicah in nevronih deluje citoprotektivno ter jih zaščiti pred oksidativnimi poškodbami. Poleg tega naj bi EPO iz glia celic prispeval k serumskim zalogam (Weidemann in Johnson, 2009), medtem

ko je njegova vloga v ostalih organih lokalna regulacija angiogeneze in celične viabilnosti (Haase, 2010).

2.1.2 Regulacija izražanja EPO

Osnovni stimulu za sintezo EPO je razpoložljivost O₂ za potrebe metabolizma. Zmanjšana količina O₂ v ledvicah je lahko posledica zmanjšane količine RKC (anemija), nepravilnosti v vezavi O₂ na molekulo hemoglobina (hipoksemija) ali nepravilnosti v pritoku krvi do ledvic (stenoza ledvične arterije). Zmanjšana razpoložljivost O₂ vodi v hipoksijo, ki je tako glavni stimulu za sintezo EPO. Tkivno specifično in s hipoksijo posredovano prepisovanje *EPO* sta odvisna od dveh regulatornih zaporedij; *cis* elementa navzgor (5') in ojačevalnega zaporedja navzdol (3') od promotorja *EPO*. V promotorski regiji *EPO* je odzivni element GATA, ki zavira njegovo izražanje (Imagawa in sod., 1994, 1997). Shema gena *EPO* je prikazana na sliki 2. Inflamatorna citokina interleukin-1 (IL1) in tumorski faktor nekroze- α (TNF) inhibirata prepisovanje *EPO* preko aktivacije GATA2 in NF κ B1. Jedrni receptor HNF4 (angl. Hepatocyte Nuclear Factor-4) in HIF1 (angl. Hypoxia Inducible Factor 1) se vežeta na ojačevalno zaporedje, ki je na 3'-koncu *EPO*. Oba proteina interagirata s ko-aktivatorjema p300 in CREBBP (angl. CREB-Binding Protein) ter izzoveta aktivacijo prepisovanja. HNF4 je izražen v ledvičnem korteksu ter v jetrih, kjer omogoča močno indukcijo izražanja *EPO* (Makita in sod., 2001).

Indukcija izražanja s hipoksijo je regulirana preko transkripcijskih faktorjev HIF (angl. Hypoxia Inducible Factor). V hipoksičnih pogojih ter ob povišanih koncentracijah kelatorjev železa in kobalta se HIF aktivirajo v vseh celicah. Poznane so tri homologne oblike proteinov HIF- α (HIF-1 α , HIF-2 α in HIF-3 α) ter tri homologne oblike proteinov HIF- β (HIF-1 β , HIF-2 β in HIF-3 β). V normoksičnih pogojih poteče hitra razgradnja HIF- α , medtem ko so proteini HIF- β konstitutivno izraženi in je njihova stabilnost neodvisna od koncentracij O₂. HIF-1 α in HIF-2 α heterodimeri delujejo kot aktivatorji prepisovanja tarčnih genov (Maxwell in sod., 1993b; Martin in sod., 2005).



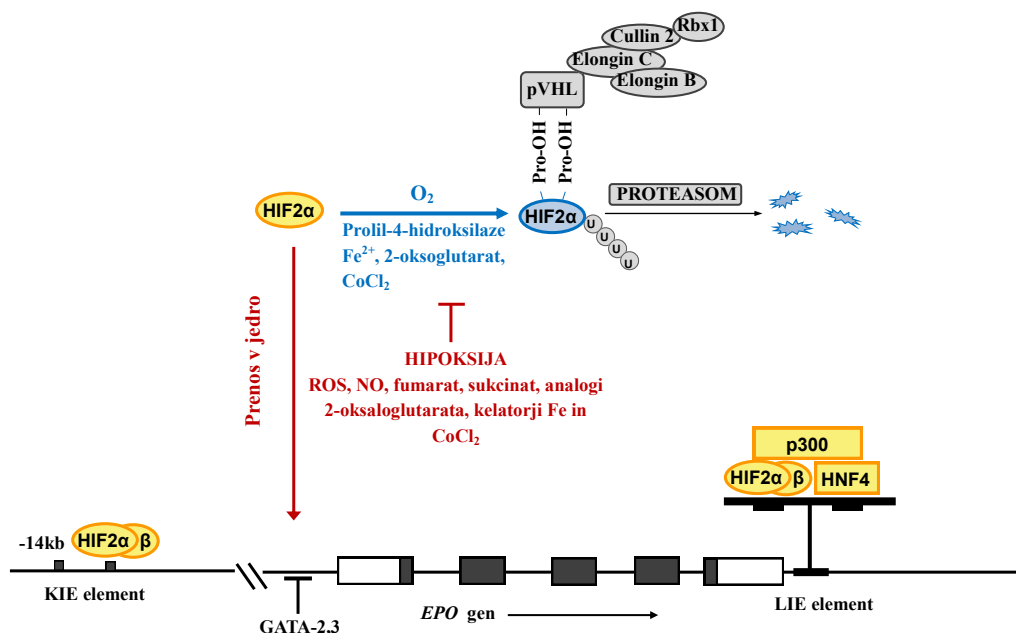
Slika 2: Shema regulacije izražanja gena za eritropoetin (*EPO*) (Bunn, 2013)

EPO je zgrajen iz 5 eksonov, ki so na sliki prikazani s pravokotniki. Kodirajoče regije so pobarvane s črno. Daleč stran od promotorja *EPO* na 5'-koncu je regulatorni element, ki izzove prepisovanje *EPO* v ledvicah (KIE, angl. Kidney-Inducible Element). Na 3'-koncu gena *EPO* je ojačevalno zaporedje, na katerega se vezeta transkripcijska faktorja HNF4 ter HIF. Po vezavi transkripcijskega aktivatorja p300 na HNF4 in HIF nastane ojačevalni kompleks, ki inducira prepisovanje *EPO*.

Figure 2: Schematic representation of the regulation of erythropoietin (*EPO*) expression (Bunn, 2013)

Coding regions are shown in black. Far upstream of the *EPO* promotor is a kidney-inducible (KIE) element that is required for high-level up-regulation of *EPO* mRNA in kidney. Just downstream from the *EPO* gene is an enhancer that binds to HNF4 and HIF. These two transcription factors bind to the transcription activator p300 and form enhanceosome which is an inducer of *EPO* transcription.

Regulacija izražanja *EPO* s hipoksijo je kompleksen proces, ki poteka na več ravneh; v hipoksičnih pogojih pride do indukcije in stabilizacije HIF- α , sledi translokacija HIF- α iz citoplazme v jedro kjer HIF- α dimerizira s HIF- β ter vezava HIF- α /HIF- β kompleksa na ojačevalno zaporedje na 3'-koncu gena *EPO* (Michiels in sod., 2002). Heterodimeri HIF1 in HIF2 imajo številne skupne tarčne gene, klub temu pa so heterodimeri HIF2 glavni regulatorji izražanja *EPO* (Gruber in sod., 2007; Morita in sod., 2003; Rankin in sod., 2007; Scortegagna in sod., 2003). Encimi prolil hidroksilaze (PHD, angl. HIF-prolyl hydroxylases) so ključnega pomena za hitro razgradnjo HIF- α v normoksičnih pogojih. Ti encimi hidroksilirajo prolilne ostanke v O₂-odvisni domeni HIF- α ter tako omogočijo vezavo proteina VHL (angl. Von Hippel-Lindau). Slednji deluje kot ubikvitinska ligaza E3, ki promovira proteasomsko razgradnjo (slika 3). Encimi PHD delujejo kot senzorji kisika (O₂), železa ter metabolne aktivnosti (2-oksaloglutarat) celic (Elliott in Sinclair, 2012) in so v hipoksičnih pogojih neaktivni (Epstein in sod., 2001). Poleg prolil hidroksilaz so za inhibicijo HIF- α pomembne tudi asparaginske hidroksilaze, ki hidroksilirajo asparagin na C-koncu molekule HIF- α . Na takšen način preprečijo interakcijo HIF- α s proteinoma p300 in CREBBP, ki delujeta kot ko-aktivatorja prepisovanja *EPO*. Reaktivne kisikove zvrsti (ROS, angl. Reactive Oxygen Species) oksidirajo ter tako destabilizirajo HIF- α ter posledično znižajo izražanje *EPO* (Haase, 2010).



Slika 3: Regulacija prepisovanja *EPO* s HIF-2α (Haase, 2010)

Slika prikazuje regulacijo gena *EPO* preko signalne poti Von Hippel-Lindau (VHL)/HIF/PHD. Encimi PHD hidroksilirajo HIF-2α ter tako omogočijo njegovo proteasomsko razgradnjo preko kompleksa VHL E3-ubikvitinske ligaze (pVHL). V normoksičnih pogojih do razgradnje HIF-2α ne pride, zato le-ta preide v jedro ter tvori heterokomplekse s HIF-2β. HIF-2α/β heterodimeri se vežejo na ustrezni regulatorni element na 3'-koncu gena *EPO* ter povečajo nivo njegovega prepisovanja. Za aktivacijo prepisovanja je ključnega pomena prisotnost ko-aktivatorjev prepisovanja, proteina CREBBP (angl. CREB-binding protein) in p300.

Figure 3: Regulation of *EPO* transcription by HIF-2α (Haase, 2010)

Figure shows an overview of *EPO* gene regulation by the von Hippel-Lindau (VHL)/HIF/PHD oxygen-sensing pathway. Proteasomal degradation of HIF-2α by the VHL-E3 ubiquitin ligase complex requires hydroxylation by PHDs. In the absence of oxygen, HIF-2α is not degraded and translocates to the nucleolus where it forms heterodimer with HIF-2β. HIF-2α/β heterodimers bind to the HIF regulatory binding sites and increase *EPO* transcription in the presence of transcription coactivators, such as CREB-binding protein (CREBBP) and p300.

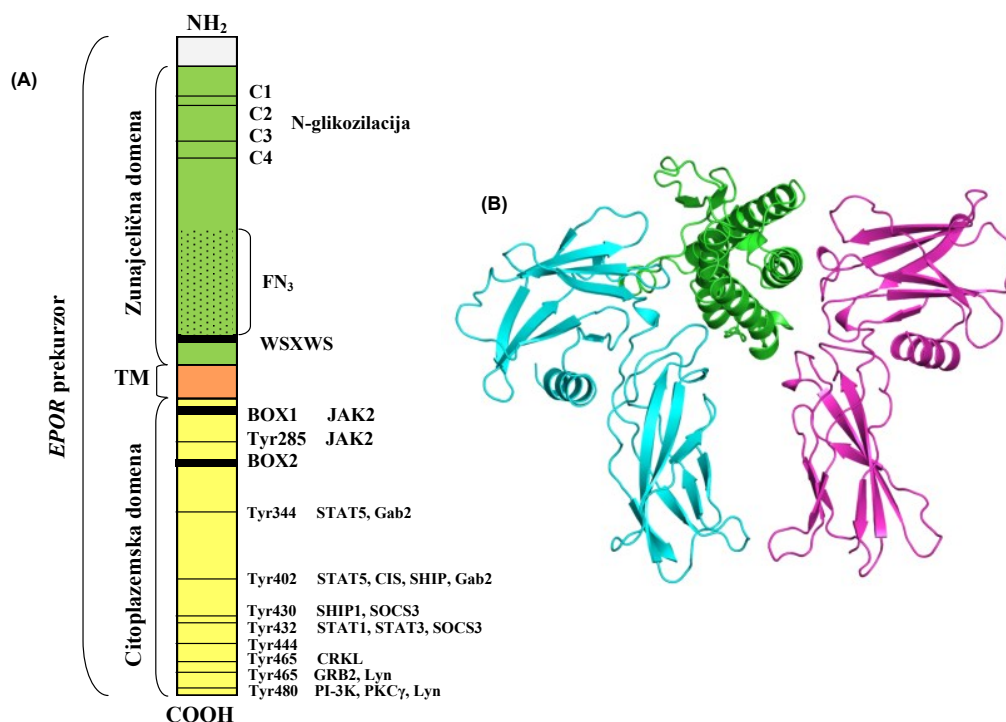
2.2 ERITROPOETINSKI RECEPTOR (EPOR)

Vloga EPO v procesu eritropoeze je odvisna od njegove vezave z membranskim eritropoetinskim receptorjem (EPOR). Primarna tarča EPO so tako eritroidne celice, ki na svoji plazemski membrani izražajo EPOR. Predvsem so to CFU-E in pa pro-eritroblasti, v katerih je EPOR tudi najvišje izražen (približno 1000 receptorjev na celico). Na membrani eritroidnih začetnikov je EPOR prisoten v obliki homodimerov tudi v odsotnosti liganda (Bunn, 2013; Livnah in sod., 1999). Gen za *EPOR* je kodiran na kromosomu 19p-q12 (Budarf in sod., 1990) in ga sestavlja 8 eksonov. Spada v družino citokinskih receptorjev, za katere so značilne homologne regije s štirimi cisteinskimi ostanki. Blizu transmembranske regije je motiv WSXWS (Bazan, 1990; Ihle in Kerr, 1995; Bazan, 1989; Ihle in sod., 1998), ki je ključnega pomena za vezavo liganda, internalizacijo receptorja in prenos signala (Quelle in sod.,

1992). Citoplazemske domene citokinskih receptorjev nimajo kinazne aktivnosti, zato je njihovo mitogeno delovanje odvisno od motivov BOX1 in BOX2. EPOR je sintetiziran v obliki 53 kDa prekursorja s 508 aminokislinskimi ostanki. Protein preide več postranslacijskih modifikacij; odcep N-končnega signalnega peptida in glikozilacijo. Zreli EPOR je tako sestavljen iz 483 aminokislin in ima molekulsko maso 56-57 kDa (Elliott in Sinclair, 2012) (slika 4).

Molekulska masa EPOR je odvisna od vzorca glikozilacije, ubikvitinacije ter drugih posttranslacijskih modifikacij (Jelkmann in sod., 2008). Zreli humani EPOR ima eno N-vezano polisaharidno verigo, zaradi katere ima na NaDS gelih molekulsko maso okrog 59-61 kDa (Elliott in sod., 2006; Atkins in sod., 1991; Elliott in sod., 2010). Transport receptorja na plazemsko membrano je precej neučinkovit, saj se tja prenese manj kot 10 % vsega sintetiziranega EPOR (Swift in sod., 2010; Neumann in sod., 1993; Hilton in sod., 1995). Slednji večinoma ostane v endolazmatskem retikulumu, endosomom podobnih strukturah ali pa je razgrajen v proteasomu (Ketteler in sod., 2002).

EPOR sestavljajo 3 domene: C-končna citoplazemska domena, transmembranska domena (22 aminokislin) ter N-končna zunajcelična domena. Zunajcelična domena (225 aminokislin) je sestavljena iz dveh fibronektinu III podobnih domen (Syed in sod., 1998) in omogoča vezavo liganda. Vsaka izmed fibronektinu podobnih domen ima 7 β -verig, povezanih s 6 α -vijačnicami. Na molekuli EPO sta dve vezavni mesti za EPOR, ki se ločita v afiniteti do receptorja ($K_D = 0.2$ nM in $K_D = 2.1$ μ M). Ena molekula EPO se torej veže na dimer EPOR. Dimerizacijo receptorja omogoča dimerizacijska domena na C-koncu zunajcelične domene. Citoplazemska domena (236 aminokislin) nima kinazne aktivnosti, vključuje pa motiva BOX1 in BOX2. BOX1 je ključnega pomena za vezavo kinaze JAK2 (angl. Janus kinase 2) ter za njeno aktivacijo (Constantinescu in sod., 2001; Tanner in sod., 1995).



Slika 4: Shematski prikaz eritropoetinskega receptorja (Syed in sod., 1998)

(A) Monomerni EPOR s tremi domenami; zunajcelično, transmembransko (TM) in citoplazemsko. Označenih je nekaj najpomembnejših komponent zunajcelične domene: 4 ohranjeni cisteinski aminokislinski ostanki (C1-4), N-glikozilacijsko mesto, fibronektinu III podobna domena (FN3) ter motiv WSXWS. V citoplazemski domeni sta označena motiva BOX1 in BOX2 ter vseh 9 tirozinskih (Tyr) aminokislinskih ostankov, ki so ključnega pomena za signalizacijo EPO-EPOR. Naznačena je tudi vloga motiva BOX1 pri aktivaciji kinaze JAK2. Prikazanih je vseh 9 tirozinskih ostankov ter proteini, ki se nanje vežejo (na desni strani); (B) Kristalna struktura kompleksa EPOR z vezanim EPO. Monomera EPOR sta označena z vijolično in modro, z zeleno je označen EPO.

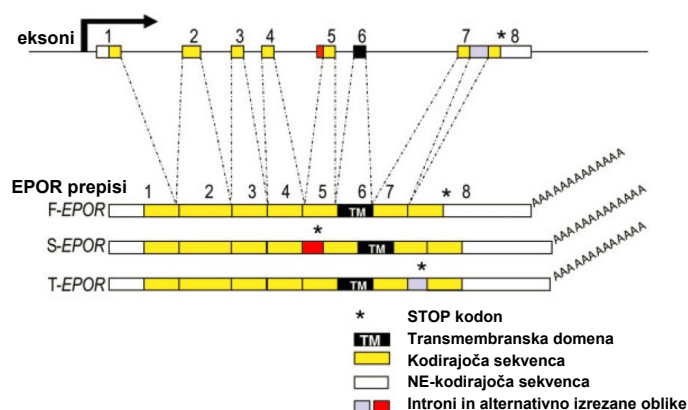
Figure 4: Schematic representation of erythropoietin receptor (EPOR) (Syed in sod., 1998)

(A) Monomeric EPOR with three domains; extracellular, transmembrane (TM) and cytoplasmic. Figure is showing some of the key features of EPOR: 4 conserved cysteine amino acid residues (C1-4), N-glycosylation site, a fibronectin III-like sub-domain and a WSXWS motif. Figure characterizes also the BOX1 motif and its role in JAK2 binding and activation and all of the 9 tyrosines of cytoplasmic domain. Proteins that bind tyrosines in their phosphorylated form are marked on the right handside. (B) The crystal structure of the complex between EPOR and EPO. EPOR monomers are shown in purple and blue and EPO is shown in green.

Citoplazemska domena je vključena v proces internalizacije receptorja ter omogoča aktivacijo kinaze p70 S6 (Jelkmann in sod., 2008).

Izražanje *EPOR* je konstitutivno in ni regulirano z EPO (Elliott in Sinclair, 2012) ali s hipoksijo. Starejša literatura sicer navaja od hipoksije odvisno prepisovanje *EPOR* (Wincewicz in sod., 2009; Chen in sod., 2010), vendar v regulatornih regijah gena ni regulatornega elementa za hipoksijo. Na 5-koncu *EPOR* sta regulatorni regiji GATA1 in SP1, v promotorski regiji pa je motiv CCACC, ki deluje kot negativni regulator izražanja. V hematopoetskem tkivu je izražanje *EPOR* v prvi vrsti regulirano preko transkripcijskega faktorja GATA1, ki je ključnega pomena za visoko aktivnost promotorja *EPOR* (Zon in sod., 1991). Poleg GATA1 so za njegovo izražanje pomembni še drugi transkripcijski faktorji; FOG1 (angl. Friend of GATA) in ETV6/RUNX1 (Inthal in sod., 2008), v eritroidnih začetnikih pa tudi SCL/TAL1 (Kassouf in sod., 2010; Mikkola in sod., 2003). SP1 regulira izražanja *EPOR* v eritroidnih začetnikih. Zunanja stimulatorja izražanja *EPOR* sta SCF (angl. Stem Cell Factor) (Sato in sod., 1998) in interleukin-1 α (IL1A) (Winter in sod., 1996), medtem ko interferon- γ (IFNG), ionomicin in PMA forbolni ester delujejo kot inhibitorji (Taniguchi in sod., 1997).

Gen *EPOR* je podvržen alternativnemu izrezovanju, katerega rezultat je množica izooblik *EPOR*. Med njimi so tudi takšne, ki se prevedejo v topne oziroma skrajšane oblike receptorja (slika 5). Arcasoy in sod. je na modelu celičnih linij (Arcasoy in sod., 2003) potrdil prisotnost različnih izooblik *EPOR*, ki kodirajo receptor brez vezavnega mesta za kinazo JAK2 oziroma brez transmembranske regije. Skrajšane izooblike *EPOR* niso funkcionalne, saj je JAK2 ključnega pomena za aktivacijo receptorja. Topne in skrajšane oblike delujejo antagonistično in zmanjšujejo signalizacijo preko funkcionalnega receptorja (Shimizu in sod., 1996). Njihovo izražanje je bilo potrjeno tudi pri raku dojke (Arcasoy in sod., 2003; LaMontagne in sod., 2006).



Slika 5: Alternativno izrezovanje *EPOR*; nastanek topnih in skrajšanih izooblik receptorja (Sinclair in sod., 2007)

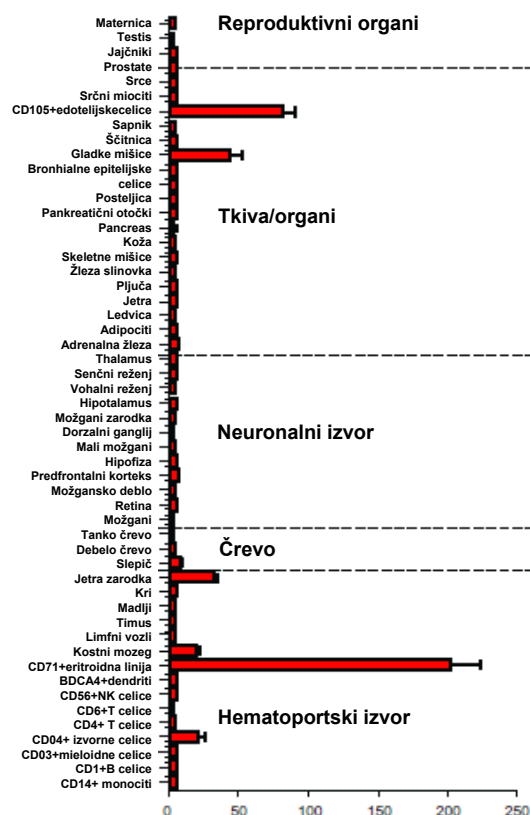
Prikazan je eritropoetinski receptor (*EPOR*) skupaj s prepisi, ki nastanejo po alternativnem izrezovanju. Prikazanih je vseh 8 eksonov (z rumeno) *EPOR*. (*F-EPOR*) celoten prepis eritropoetinskega receptorja; (*S-EPOR*) topna oblika; (*T-EPOR*) skrajšana oblika receptorja brez dela citoplazemske domene. (*) STOP kodoni; introna sta označena z rdečo oziroma s sivo.

Figure 5: Alternative splicing of *EPOR* gene: formation of soluble and truncated receptor isoforms (Sinclair in sod., 2007)

Figure is showing erythropoietin receptor (*EPOR*) together with transcripts generated by alternative splicing. All 8 exons are shown in yellow. (*F-EPOR*) functional form of the receptor; (*S-EPOR*) soluble form; (*T-EPOR*) truncated form which lacks a part of cytoplasmic domain. (*) STOP codons; introns are shown in red and grey.

2.3 VLOGA EPO IN EPOR IZVEN HEMATOPOETSKEGA TKIVA

EPOR je preferenčno izražen na celicah hematopoetskega tkiva. Njegovo izražanje (na mRNA in proteinskem nivoju) je bilo potrjeno tudi v nekaterih ne-hematopoetskih tkivih: možganih, ledvicah, maternici, endotelijskem tkivu, miokardiocitih, makrofagih, celicah retine, celicah adrenalnega korteksa ter tudi v številnih tumorskih celicah. Izražanje v teh tkivih je precej nižje od tistega v eritroidnih začetnikih (slika 6).



Slika 6: Izražanje mRNA za *EPOR* v različnih tkivih (Elliott in Sinclair, 2012)

Shema prikazuje povprečni nivo izražanja mRNA za *EPOR* (za $n = 2$) v različnih tkivih oziroma celičnih tipih ter ustrezne standardne napake. Podatki so bili pridobljeni z analizo na mikromrežah. Nivo izražanja je prikazan v povprečnih enotah fluorescence. Podatki so bili pridobljeni iz javno dostopne podatkovne baze <http://biogps.org> (Wu in sod., 2009). Na sliki so prikazani podatki za probo *EPOR*, 209962_AT.

Figure 6: *EPOR* mRNA expression in different tissues (Elliott in Sinclair, 2012)

Figure shows average level of *EPOR* mRNA expression (for $n = 2$) in different tissues or cell types and the corresponding standard deviations. Data were generated by microarray analysis. The level of expression is shown in the average fluorescence units. Data were obtained from the publicly available database <http://biogps.org> (Wu in sod., 2009). Probe shown is *EPOR*, 209962_AT.

V promotorju gena *EPOR* ni zaporedja TATA, zato je gen nizko izražen v vseh tkivih (Maouche in sod., 1994; Noguchi in sod., 1991). Poleg klasičnega homodimernega EPOR, izraženega v hematopoetskem tkivu, naj bi bil v ne-hematopoetskih tkivih izražen tudi heteroreceptor EPOR (Konstantinopoulos in sod., 2007), sestavljen iz homodimera EPOR in receptorja β (CSF2RB, angl. β -common Receptor). CSF2RB je podenota v receptorjih za interleukina 3 (IL3) in 5 (IL5) ter v receptorju za CSF2 (angl. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) (Brines in sod., 2004). Heteroreceptor EPOR naj bi imel tkivno-zaščitno vlogo (Brines in sod., 2004; Brines in Cerami, 2005; Brines in sod., 2008; Brines in Cerami, 2012). Kot potencialni partner za tvorbo heteroreceptorja EPOR je bil predlagan tudi efrinski receptor B4 (EPHB4, angl. EPHrin type-B receptor 4). EPO deluje anti-apoptotsko

v miokardijskih celicah in srčnih fibroblastih in jih zaščiti pred ishemičnimi poškodbami ter zmanjša obseg miokardijskega infarkta (Parsa in sod., 2004; Nishiya in sod., 2006). V endotelijskih celicah spodbuja proliferacijo (Anagnostou in sod., 1990) in neovaskularizacijo (Ribatti in sod., 1999; Carlini in sod., 1995), medtem ko v gladkih mišicah žil izzove kontrakcijo (Morakkabati in sod., 1996) in vazokonstrikcijo (Heidenreich in sod., 1991). V ledvicah zmanjša poškodbe zaradi ishemije/reperfuzije (Vesey in sod., 2004). Pri glodavcih z od cisplatina posredovano akutno odpovedjo ledvic spodbuja regeneracijo tubularnih ledvičnih celic (Vaziri in sod., 1994). Inducira akumulacijo HIF-1 α ter tako deluje nefroprotektivno (Imamura in sod., 2007). EPOR je izražen v različnih delih možgan: korteksu, hipokampusu, kapsuli interni in medmožganih. Izražajo ga nevroni, astrociti in možganske endotelijske celice. Signalna pot EPO-EPOR deluje nevrotrofično in nevroprotektivno (Noguchi in sod., 2007) ter omogoča proliferacijo in diferenciacijo nevronske izvorne in progenitorske celice (Studer in sod., 2000; Shingo in sod., 2001).

2.4 SIGNALNE POTI EPO-EPOR

2.4.1 Fosforilacija EPOR

Vezava EPO na homodimerni EPOR povzroči konformacijsko spremembo v transmembranski in citoplazemski domeni receptorja, ki vodi do aktivacije različnih kinaz ter drugih signalnih molekul. Med najpomembnejšimi kinazami so JAK2, PI3K (angl. Phosphatidylinositol 3-Kinase), protein kinaza C (PRKC) ter kinazi LYN in TEC (Jelkmann in sod., 2008). Kinaza JAK2 se z EPOR poveže med procesiranjem receptorja v endoplazmatskem retikulumu. Povezava je najverjetneje ključnega pomena za zorenje EPOR ter membransko lokalizacijo (Remy in sod., 1999). Konformacijska sprememba receptorskega homodimera postavi obe kinazi JAK2 v neposredno bližino, jima tako omogoči recipročno trans-fosforilacijo ter avtoaktivacijo. Aktivirani kinazi JAK2 fosforilirata tirozinske ostanke v citoplazemski domeni EPOR ter tako omogočita vezavo proteinov z domenami SH2 (angl. SRC homology 2). Med omenjene proteine spadajo GRB2, STAT5, SHC1 in CRKL in sklapljajo EPOR s specifičnimi signalnimi potmi znotraj celice (Mayeux in sod., 1993). Med njimi so najbolj značilne (slika 7):

- signalna pot JAK2/STAT5,
- signalna pot RAS/MAPK,
- signalna pot PI3K,

- signalna pot protein kinaze C (PKRC).

Po vezavi EPO na EPOR in sledeči aktivaciji receptorja, pride do internalizacije kompleksa EPO-EPOR. Nekaj receptorja se razgradi v lizosomih, preostanek pa se reciklira nazaj na membrano (Gross in Lodish, 2006; Sawyer in sod., 1987). Internalizacija EPOR ter sledeča razgradnja v lizosomih lahko poteče tudi neodvisno od vezave EPO (Beckman in sod., 1999).

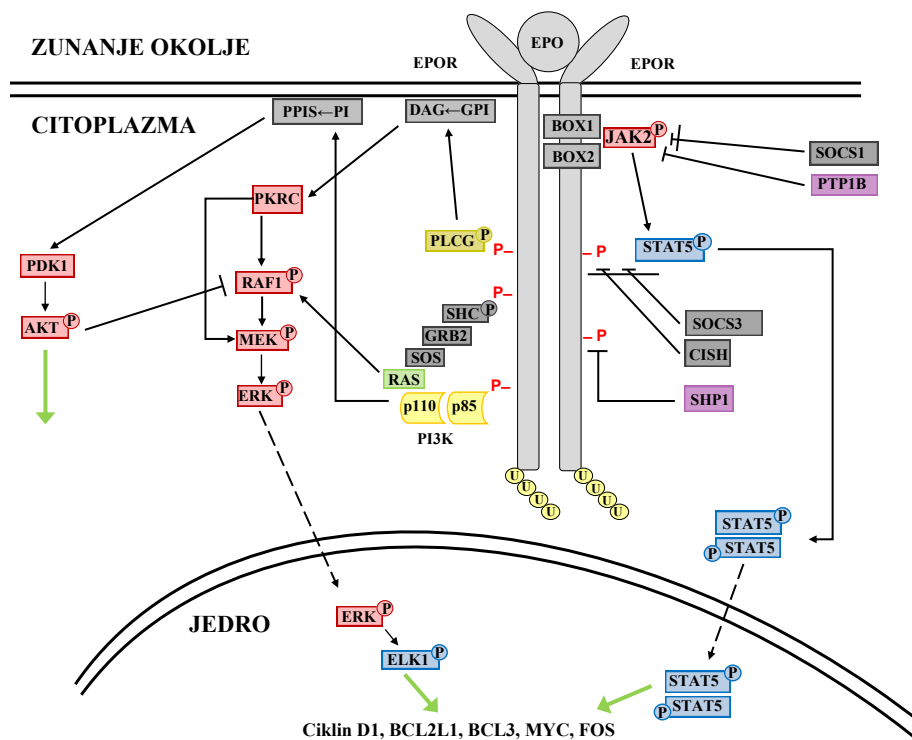
2.4.2 Signalna pot JAK2/STAT5

STAT (angl. Signal Transducers and Activators of Transcription) so transkripcijski faktorji, katerih aktivacija je regulirana s citokini (Ihle, 1995). Po aktivaciji dimerizirajo in preidejo iz citoplazme v jedro ter se tam vežejo na specifične elemente DNA, preko katerih regulirajo prepisovanje tarčnih genov (Silva in sod., 1999; Ihle, 2001). Transkripcijski faktor STAT5 obstaja v dveh izooblikah, STAT5A in STAT5B. Po vezavi EPO na EPOR, aktivna kinaza JAK2 fosforilira receptor na tirozinskih ostankih znotraj citoplazemske domene. STAT5 se veže na fosforilirana Tyr343 in Tyr401 ter po dimerizaciji preide v jedro, kjer se veže na promotor gena *BCL2L1* (Socolovsky in sod., 1998). Vloga signalne poti JAK2/STAT5 v procesu eritropoeze je torej anti-apoptotska. STAT5 interagira še s PI3K ter tako omogoči napredovanje celičnega cikla (Quelle in sod., 1992).

2.4.3 Signalna pot RAS/MAPK

Klasična signalna pot MAPK je sestavljena iz sosledja proteinov: Receptor → SHC → GRB2 → SOS1 → RAS → RAF1 → MEK → MAPK

Mehanizmi regulacije te signalne poti preko EPO so zelo kompleksni in še niso v celoti poznani. Adaptorska proteina SHC in GRB2 se vežeta na fosforilirane tirozine znotraj citoplazemske domene EPOR. Prav tako se tudi tirozinska fosfataza SHP2 veže s proteinom GRB2. EPO aktivira proteine RAS, RAF1, MEK in ERK1/2 (Tauchi in sod., 1995), ni pa še jasno ali aktivacija omenjenih proteinov poteka po klasičnem zaporedju signalne poti MAPK. Pokazano je bilo namreč, da lahko kinaza JAK2 direktno fosforilira RAF1 (Xia in sod., 1996). Poročila o vlogi signalne poti MAPK v EPO signalizaciji so si nasprotujoča; EPO naj bi preko omenjene signalne poti spodbujal eritropoezo v kulturi celic CFU-E (Sui in sod., 1998), hkrati pa naj bi njena inhibicija pripomogla k eritroidni diferenciaciji eritroleukemične celične linije (Matsuzaki in sod., 2000).



Legenda

- | | |
|---|--|
| protein kinaza | → aktivacija |
| fosfataza | — inhibicija |
| lipidna kinaza | — inhibicija s povratno zanko |
| fosfolipaza | - - -> prehod v jedro |
| G protein | → prepisovanje/prevajanje/
proliferacija/preživetje |
| faktor prepisovanja
(ang. <i>transcription factor</i>) | |
| P- fosforiliran tirozin (Tyr) | |
| P P P fosforilacijski dogodek | |
| U ubikvitinacija | |

Slika 7: Signalne poti, ki se aktivirajo po vezavi EPO na EPOR (Szenajch in sod., 2010)

Signalne poti, udeležene v signalizacijo preko para EPO-EPOR v hematopoetičnem tkivu: JAK2/STAT5, MAPK, PI3K in PKRC. Proteini SHP1, CISH in SOCS3 preprečijo fosforilacijo STAT5 ter tako zaustavijo signalizacijo.

Figure 7: Signaling pathways that are activated upon EPO binding to EPOR (Szenajch in sod., 2010)

Signaling pathways that are involved in signaling through EPO-EPOR in hematopoietic tissues: Jak2/STAT5, MAPK, PI3K and PKRC. SHP1, CISH and SOCS3 proteins prevent STAT5 phosphorylation and thus inhibiting signalization.

2.4.4 Signalna pot PI3K

Aktivacija kinaze PI3K privede do fosforilacije serin/treoninske kinaze AKT (AKT1, angl. Protein Kinase B), ki ima pomembno vlogo pri inhibiciji apoptoze, saj inhibira pro-apoptotski protein BAD, transkripcijske faktorje FOX (angl. Forkhead box) in kaspazo 9 (CASP9). Poleg tega aktivira kinazo GSK3 (angl. Glycogen Synthase Kinase 3), ki sodeluje v regulaciji celičnega cikla preko ciklina D1 (CCND1, angl. Cyclin D1) in transkripcijskega faktorja MYC. AKT inhibira RAF1 in je zato pomemben regulator signalne poti RAS/MAPK (Cross in sod., 1995).

Aktivacija kinaze PI3K ima pomembno vlogo v regulaciji signalizacije z EPO. Regulatorna podenota PI3K (p85) se preko vezavne domene SH2 veže na aktiviran EPOR, interagira s fosforiliranimi proteini GAB1, GAB2 in SHP2 (Damen in sod., 1993; Verdier in sod., 1997) ter tako signalno pot EPO povezuje s signalnimi potmi drugih rastnih faktorjev. Aktivirana PI3K je potrebna za od EPO posredovano indukcijo prepisovanja gena *MYC* (Chen in Sytkowski, 2001). V procesu eritropoeze inhibira proces apoptoze ter spodbuja preživetje eritroidnih začetnikov preko proteasomske razgradnje inhibitorja celičnega cikla CDKN1B (angl. Cyclin-Dependent Kinase inhibitor B1) (Bouscary in sod., 2003).

2.4.5 Signalna pot protein kinaze C

Obstaja 13 različnih protein kinaz C (PKRC), ki se medsebojno razlikujejo po strukturi in ko-faktorjih. PKRC so serin/treoninske kinaze. V procesu eritropoeze delujejo kot signal za rast in diferenciacijo in v odvisnosti od EPO regulirajo izražanje genov *FOS*, *JUN*, *BCL3*, *GATA2* in *BCL2L1* (Jelkmann in sod., 2008).

2.4.6 Vloga tirozinske fosfataze SHP1 in proteina CISH

Oba proteina sta udeležena v zaustavitvi signalizacije preko EPO-EPOR. Fosfataza SHP1 se veže na fosforiliran tirozinski ostanek znotraj EPOR in na kinazo JAK2, pri čemer pride do defosforilacije JAK2 in zaustavitve signalizacije (Klingmüller in sod., 1995). Eritroidni začetniki iz mišk z izbitim genom za SHP1 so prekomerno občutljivi na stimulacijo z EPO (Van Zant in Shultz, 1989).

Protein CISH (angl. Cytokine-Inducible SRC Homology 2-containing protein) je tarčni gen transkripcijskega faktorja STAT5 in ima pomembno vlogo pri inhibiciji od EPO posredovane proliferacije. Veže se na Tyr401 v citoplazemski domeni aktiviranega EPOR in sodeluje pri

proteasomalni razgradnji kompleksa EPO-EPOR, torej zmanjšuje nivo recikliranja receptorja nazaj ne membrano (Verdier in sod., 1997). Signalizacijo preko EPO-EPOR zaustavita tudi supresorja citokinske signalizacije SOCS1 in SOCS2 (angl. Suppressor Of Cytokine Signaling). Proteasomska razgradnja EPOR je tudi mehanizem zaustavitve signalizacije preko EPO-EPOR (Jelkmann in sod., 2008).

2.5 UPORABA REKOMBINANTNEGA HUMANEGA ERITROPOETINA V KLINIČNI ONKOLOGIJI

Anemije so pogost zaplet pri bolnikih z rakom (Jumbe, 2002; Weiss, 2003) in se razvijejo zaradi mielosupresivnih vplivov kemo- in radioterapije oziroma zaradi infiltracije tumorskih celic v kostni mozeg (Steinberg, 1989). Običajno so kronične in so pogojene z manjšo razpoložljivostjo železa, zmanjšano količino EPO ter inhibitornimi efekti pro-inflamatornih citokinov na eritroidne začetnike (Jelkmann, 1998).

Anemija je definirana kot stanje zmanjšane koncentracije RKC, zmanjšane količine hemoglobina (Hb) ter nižjega hematokrita. Kot kriterij za anemijo se uporabljajo Hb vrednosti < 13 g/dl za moške in < 12 g/dl za ženske. Anemija vpliva na potek zdravljenja ter tudi na kvaliteto življenja bolnikov z rakom:

- zmanjšuje oksigenacijo tkiva zato sta kemo- in radioterapija manj učinkoviti. Tako pripomore k lokalnemu napredovanju bolezni in razvoju agresivnejših fenotipov,
- povečuje izčrpanost pacientov ter tako omejuje intenzivnost zdravljenja,
- zmanjša oksigenacijo tumorjev in pripomore k večjemu številu hipoksičnih regij. V hipoksičnih regijah je verjetnost za angiogenezo večja, hkrati pa se s tem poveča metastatski potencial tumorskih celic.

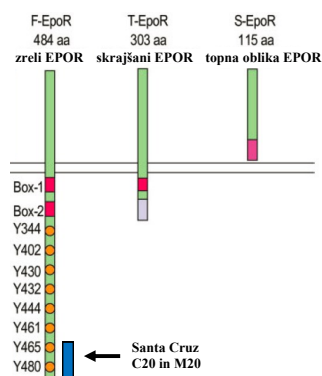
Rekombinantni humani eritropoetin (rHuEPO) se uporablja za zdravljenje anemij. Njegove pozitivne učinke so pokazale številne klinične študije opravljene v letih med 1997 in 2003 (Glaspy in sod., 1997; Cella in sod., 2003). Sistemska administracija rHuEPO pri anemičnih bolnikih viša nivo hemoglobina, uspešno nadomešča potrebo po transfuziji ter izboljša kvaliteto življenja (Nordstrom in sod., 2008; Rizzo in sod., 2008; Ray-Coquard in sod., 2009). Poleg tega povečuje oksigenacijo tumorjev ter tako povečuje učinkovitost kemo- oziroma radioterapije (Harrison in Blackwell, 2004).

Dvomi o smotrnosti uporabe rHuEPO za zdravljenje anemij pri bolnikih z rakom so se pojavili po objavi rezultatov kliničnih študij na pacientih z rakom glave in vratu (ENHENCE)

(Henke in sod., 2003), rakom dojk (BEST) (Leyland-Jones, 2003; Leyland-Jones in sod., 2005) ter na nekaterih meta-študijah (EPO-CAN 20, GOG 191 ter študije na raku dojk) (Bohlius in sod., 2009; Glaspy in sod., 2010; Ludwig in sod., 2009). Le-te so izpostavile negativne učinke rHuEPO za napredovanje bolezni in preživetje bolnikov predvsem zaradi povečanega tveganja za pojav venske tromboze in kardiovaskularnih zapletov (Bennett in sod., 2008) oziroma zaradi možnosti neposrednega delovanja rHuEPO na EPOR pozitivne tumorske celice (Bohlius in sod., 2009). Rezultati so imeli še toliko večjo težo zaradi velikega števila *in vitro* raziskav, ki so poročale o stimulacijski vlogi rHuEPO na celično proliferacijo (LaMontagne in sod., 2006; Westphal in sod., 2002; Acs in sod., 2001). Pri skoraj vseh študijah, ki poročajo o negativnih učinkih rHuEPO terapije, so bile tarčne koncentracije hemoglobina višje od normalnih. Ni še znano, kakšen je doprinos višjih koncentracij hemoglobina k negativnim učinkom terapije z rHuEPO. Prav zaradi tega je organizacija FDA (angl. Food and Drug Administration) izdala smernice o varni uporabi rHuEPO v klinični onkologiji. Pri rakavih bolnikih z anemijo, ki se razvije kot posledica kemoterapije, se rHuEPO sme uporabljati le pri tistih posameznikih s koncentracijami hemoglobina 9-11 g/dl. Dodatno, ne priporočajo uporabe rHuEPO pri pacientih z možnostjo izboljšanja stanja bolezni oziroma z možnostjo ozdravitve (Rizzo in sod., 2008).

2.5.1 Izražanje in vloga EPOR v tumorskem tkivu

Kljub razhajanjem v raziskovalnih krogih glede vpliva rHuEPO na tumorske celice, poročila iz zadnjih 10 let pričajo o pleiotropnem delovanju EPO na celice z izraženim EPOR. EPOR je izražen v tumorskem tkivu in tudi v tumorskih celičnih linijah na mRNA in proteinskem nivoju. Nivo izražanja mRNA je primerljiv tistemu v nehematopoetičnih tkivih. Signalizacija preko EPO-EPOR je bila potrjena pri številnih tipih raka: NSCLC (angl. Non-Small Cell Lung Cancer) (Brown in sod., 2007), HNSCC (angl. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma) (Arcasoy in sod., 2005) ter pri raku ledvic (Papworth in sod., 2009), dojk (Acs in sod., 2002), prostate (Feldman in sod., 2006), ženskih reproduktivnih organov (Yasuda in sod., 2002), živčnega sistema (Acs in sod., 2003) ter tudi pri malignem melanomu (Kumar in sod., 2005). Pri nekaterih tipih raka se izražanje EPOR kaže kot možen prognostični faktor za napovedovanje izida terapij. Tako ima visok nivo izražanja EPOR pozitivno prognostično vrednost pri raku dojk z izraženimi receptorji za estrogen (ESR+) (Larsson in sod., 2009). Vendar pa so si tudi poročila o izražanju EPOR v tumorskem tkivu nasprotna, predvsem zaradi nespecifičnosti uporabljenih protiteles. Rezultati študij, v katerih je bilo uporabljeno protitelo C-20 (Santa Cruz), so vprašljivi, saj je to protitelo močno nespecifično. Reagira z dodatnimi proteini, med katerimi je tudi protein vročinskega šoka 70 (HSPA, angl. Heat



Slika 8: Izooblike proteinov EPOR in specifičnost komercialno dostopnih protiteles C-20 in M-20 (Sinclair in sod., 2007)

Izooblike proteinov EPOR, ki nastanejo v procesu alternativnega izrezovanja. V citoplazemski domeni so prikazani tirozinski aminokislinski ostanki (Y), ki predstavljajo vezavna mesta za proteine z domenami SH2. Z vijolično so označene regije, ki so med receptorji nehomologne. Z modro je označen peptid, ki so ga uporabili za proizvodnjo anti-EPOR protiteles C-20 in M-20 (proizvajalec Santa Cruz).

Figure 8: Isoforms of EPOR protein and specificity of commercially available anti-EPOR antibodies C-20 and M-20 (Sinclair in sod., 2007)

Isoforms of EPOR protein that arise in the process of alternative splicing. Tyrosine (Y) residues in the cytoplasmic domain are binding sites for SH2 domain proteins. Purple regions are non-homologous. Blue peptide was used for the production of C-20 and M-20 anti-EPOR antibodies (manufacturer Santa Cruz).

Shock Protein 70), katerega izražanje je povišano v številnih humanih tumorjih in je odvisno tudi od hipoksije (Brown in sod., 2007). V zadnjem času je bilo razvitih več specifičnih protiteles za detekcijo EPOR, ki pa še niso dostopna širši raziskovalni skupnosti (Elliott in sod., 2010). Poleg tega, protitelo C-20 ne zazna topnih oziroma skrajšanih izooblik EPOR (slika 8) (Elliott in sod., 2010).

V znanstveni literaturi so si poročila o vplivu rHuEPO na tumorske celice nasprotujoča (preglednici 1 in 2); *in vitro* in *in vivo* študije poročajo o različnih učinkih rHuEPO na proliferacijo tumorskih celic ter njihovo odzivnost na kemo- in radioterapijo (Acs in sod., 2001; Liu in sod., 2004; Belenkov in sod., 2004). Razlike v učinkih rHuEPO je moč prišteti različnim metodološkim pristopom, predvsem pa uporabi imuno detekcije EPOR z nespecifičnimi protitelesi ter uporabi ne-fizioloških koncentracij rHuEPO. Poleg tega, so učinki odvisni od celičnega izvora in tipa tumorja oziroma od tipa celične linije. Še več, pri določeni celični liniji je učinek odvisen od pogojev gojenja ter uporabljenih reagentov. Na podoben problem naletimo pri poročilih iz kliničnih študij. Slednje namreč poročajo o različnih učinkih rHuEPO na razvoj bolezni oziroma na končno stanje (Chang in sod., 2005; Moebus in sod., 2007; Aapro in sod., 2009; Leyland-Jones, 2003; O'Shaughnessy, 2002). Medsebojna primerjava študij je težka, saj so bile študije različno načrtovane; med pacienti obstajajo razlike v stopnji bolezni, v zgodovini zdravljenja, kontrolnih skupinah ter v tarčnih količinah hemo-

globina.

Oksigenacija tkiva je pomemben faktor pri uspešnosti kemo- oziroma radioterapije. Pri salskih tumorskih celicah je radioterapija približno 3-krat uspešnejša v normoksičnih pogojih v primerjavi s hipoksičnimi (Kumar, 2000). Kljub pozitivnim učinkom terapije z rHuEPO na zmanjševanje hipoksičnosti tkiva (Overgaard in sod., 2007; Thomas in sod., 2008), nekatere klinične študije navajajo negativne učinke terapije na razvoj bolezni ter opozarjajo na možno udeležnost EPO v promociji angiogeneze, tako v normalnem kot tudi v tumorskem tkivu. V skladu s to hipotezo torej uporaba rHuEPO ne pripomore le k izboljšanju oksigenacije tkiva, pač pa kaže tudi potencial za pospeševanje angiogeneze in neovaskularizacije tumorskega tkiva, torej pospešuje rast tumorskih celic in pripomore k tvorbi in razsejanju metastaz (Glaspy, 2009; Hadland in Longmore, 2009). rHuEPO naj bi tako spodbujal migracijo in proliferacijo endotelijskih celic ter jih hkrati ščitil pred apoptozo (Arcasoy, 2008). Vlogo podporne terapije z rHuEPO so preizkusili v kombinaciji z različnimi proti-tumorskimi terapijami; ionizirajoča sevanja, derivati platine, alkilirajoči agensi, inhibitorji mikrotubulov in topoizomeraze, selektivnimi modulatorji estrogenov ter drugi. Nekaj primerov študij je navedenih v preglednici 1.

Ravnovesje med signalnimi potmi, ki inducirajo preživetje oziroma apoptozo, je ključnega pomena za razvoj odpornosti tumorskih celic na določen tip terapije. Lep primer takšnega ravnovesja je celična linija MCF-7, izpostavljena tamoksifenu in rHuEPO. rHuEPO v celicah aktivira signalne poti JNK, p38 in MAPK(ERK) (Gewirtz in sod., 2006), kljub temu pa ne spremeni njihove odzivnosti na tamoksifen. Znano je, da sta v pogojih stresa signalni poti JNK in p38 povezani z aktivacijo procesa apoptoze, medtem ko signalizacija preko MAPK(ERK) in PI3K(AKT) izzove indukcijo celične rasti in preživetja. Aktivacija JNK in p38 torej učinkuje ravno nasprotno aktivaciji MAPK(ERK) (Dent in sod., 2003b; Dent in Grant, 2001; Dent in sod., 2003a; Siddik, 2003).

2.5.2 rHuEPO in rak dojke

Najnovejši rezultati kažejo na vlogo rHuEPO pri regulaciji metastatskega potenciala tumorskih celic. Hedley in sod. (Hedley in sod., 2011) je v *in vivo* študiji na miškah z izbitim imunskim sistemom pokazal vpliv rHuEPO na metastatski potencial tumorjev, ki so se razvili po implantaciji tumorskih celic MDA-MB-231 in MDA-MB-435. rHuEPO je povečal velikost metastaz, vendar la v kombinaciji s kemoterapijo (paklitaksel). Klinični študiji BEST (Leyland-Jones, 2003) in BRAVE (Aapro in sod., 2009) sta bili sicer narejeni na pacientih z metastatsko obliko raka dojke, vendar pa nista opredelili vloge rHuEPO pri promociji metastatskega potenciala. Potrebne so dodatne študije za natančnejšo opredelitev njegove vloge

Preglednica 1: Vpliv tretiranja z rHuEPO na odzivnosti humanih tumorskih celičnih linij na anti-tumorsko terapijo (Szenajch in sod., 2010)
Preglednica prikazuje študije o vplivu podporne terapije z rHuEPO na kemo- oziroma radioterapijo. (*EPO/EPOR*) izražanje na nivoju mRNA; (*EPO/EPOR*) izražanje na proteinskem nivoju; (NA) ni podatka; (*) aktivacija proteina; (*p) aktivacija proteina s fosforilacijo; (+) mRNA/protein je prisoten; (-) mRNA/protein ni prisoten; ($\uparrow / \downarrow / \leftrightarrow$) - povečano/zmanjšano/nespremenjeno/nespremenjeno stanje. (HeLa) rak materničnega vratu; (SKOV3, A2780) rak ovarijski; (ACHN, Caki-1) rak ledvic; (HCT116) kolorektalni rak; (WM35, BLM) metastatski melanom; (MCF-7) metastatski melanom; (MCF-7) breast cancer.

Table 1: The effect of rHuEPO treatment on the responsiveness of human tumor cell lines to anti-cancer agents (Szenajch in sod., 2010)
Studies establishing effects of rHuEPO treatment on the efficacy of chemo- and radiotherapy are indicated. Abbreviations used in this table are as follows: (*EPO/EPOR*) expression on the mRNA level; (*EPO/EPOR*) expression on the protein level; (NA) data not available; (*) protein activation; (*p) protein activation by phosphorylation; (+) transcript/protein is present; (-) transcript/protein is not detectable; ($\uparrow / \downarrow / \leftrightarrow$) increased/decreased/unchanged/unchanged state. (HeLa) cervical cancer; (SKOV3, A2780) ovarian cancer; (ACHN, Caki-1) renal cell carcinoma; (HCT116) colorectal cancer; (WM35, BLM) metastatic melanoma; (MCF-7) breast cancer.

anti-tumorska terapija	celična linija	izražanje EPO/EPOR	odpornost	aktivacija signalnih poti	rHuEPO (U/ml)	čas izpostavitve rHuEPO	vir
DERIVATI PLATINE							
cisplatin	HeLa	EPO+/EPOR+, EPO+/EPOR+	$\uparrow$	*pTyr $\uparrow$	25, 50, 200	1 h	(Acs in sod., 2003)
	SKOV3	EPOR+	$\leftrightarrow$	NA	1, 10, 100, 200	1 h	(Saintigny in sod., 2007)
	A2780	EPO+/EPOR+, EPO+/EPOR+	$\leftrightarrow$	*pERK1/2 $\uparrow$, BCL2 $\uparrow$, BCL2L1 $\uparrow$, BAX $\downarrow$, BCL10 $\downarrow$	5, 35	2 meseca	(Solár in sod., 2008; Jeong in sod., 2008)
	ACHN	EPOR+	$\leftrightarrow$	*pERK1/2 $\uparrow$, BCL2 $\downarrow$	10	3 dni	(Liu in sod., 2004)
	Caki-1	EPOR+	$\leftrightarrow$	*pERK1/2 $\uparrow$, BCL2 $\downarrow$	10	3 dni	(Liu in sod., 2004)
	HCT116	EPOR+	$\leftrightarrow$	PKC $\uparrow$, BAX $\downarrow$, BCL2 $\downarrow$, NFKB1 $\downarrow$, CCND1 $\downarrow$	10	3 dni	(Liu in sod., 2004)
	WM35	EPO+/EPOR+	$\leftrightarrow$ (min $\uparrow$)	*EPOR $\uparrow$, *pRAF $\uparrow$, *pMEK $\uparrow$, *pMAPK $\downarrow$, *pELK $\downarrow$	10, 100	2 h	(Kumar in sod., 2005)
	BLM	EPOR+	$\uparrow$	*pJAK2 $\uparrow$, *pSTAT3 $\uparrow$, *pERK1/2 $\uparrow$	5	24 h	(Mirmohammadsadegh in sod., 2010)
MODULATORJI RECEPTORJA ZA ESTROGEN							
tamoksifen	MCF-7	NA	$\leftrightarrow$	*pERK1/2 $\uparrow$, *p38 $\uparrow$, *pJNK $\uparrow$, *pSTAT5-, *pAKT $\downarrow$	10, 100	24 h	(Gewirtz in sod., 2006)

v procesih metastaziranja. Glede na študijo Hedley in sod. (Hedley in sod., 2011) rHu-EPO vpliva na tumorske celice na dva načina, preko direktne vezave na EPOR tumorskih celic ter indirektno, preko vezave na EPOR celic iz okolice tumorja. Tako izzove aktivacijo signalnih poti, ki spodbujajo procese ožiljenja, povečajo izražanja metalo-proteinaz, mobilizirajo endotelijske progenitorje, aktivirajo koagulacijsko kaskado ter povečajo nalaganje trombina (Janmaat in sod., 2010; Ribatti in sod., 1999). Tromboza je pogost zaplet pri terapiji z rHuEPO in je povezana s povečano invazijo vaskularnega tkiva ter večjim metastatskim potencialom (Malik in sod., 2010). V zadnjem času vse več rezultatov kaže na interakcijo EPO-EPOR para z drugimi receptorji za rastne faktorje. Liang in sod. (Liang in sod., 2010) je pokazal vlogo rHuEPO na inhibicijo protitelesa trastuzumab, ki se uporablja pri HER2 pozitivnih tumorjih raka dojke (preglednica 2). Protitelo se veže na receptor HER2 in prepreči signalizacijo preko signalnih poti PI3K(AKT) in MAPK(ERK). Vloga rHuEPO v modulaciji obeh signalnih poti je že bila pokazana. Larsson in sod. (Larsson in sod., 2009) je pokazala pozitivne prognostične vrednosti visokega nivoja izražanja EPOR pri rakah dojke z izraženimi ESR. Hkrati so pokazali, da visoko izražanje obeh receptorjev negativno vpliva na terapijo s tamoksifenom. Povezava med EPO-EPOR in ESR je bila potrjena tudi na celičnih linijah raka dojke. Predvsem naj bi bila pomembna korelacija med EPOR in membranskimi receptorji za estrogene (GPER) ter androgen (mAR) (Pelekanou in sod., 2010; Notas in sod., 2010, 2012).

Preglednica 2: Pred-klinične študije na modelih raka dojke: Delovanje in vloga EPOR (McKinney in Arcasoy, 2011)

Table 2: *In vivo* breast cancer models: pre-clinical trials investigating tumor EPOR effects and function (McKinney in Arcasoy, 2011)

eksperimentalni model	strategija/intervencija	fenotip; <i>in vivo</i> učinek	vir
model raka dojke pri podganah (uporaba fibrinske tumorske komore za spremljanje <i>in vivo</i> rasti tumorja)	EPO/EPOR antagonisti	zaustavitev rasti tumorja	(Arcasoy in sod., 2002)
tumorji dojke v trebuhu podgan	rHuEPO vs. placebo	povečana aktivacija AKT, zmanjšana apoptoza tumorskih celic	(Szczzech in sod., 2008)
	kemoterapija s paklitakselom v kombinaciji z rHuEPO ali placebo	brez učinka na odziv tumorja na paklitaksel	
miš; implantacija tumorskih celic skozi hrbtno tumorsko komoro	rHuEPO	hitrejša rast in ožiljenje tumorja	(Hardee in sod., 2007)
	EPO/EPOR antagonisti	zaustavitev rasti in ožiljenja tumorja	
	izražanje konstitutivno aktivnega EPOR	hitrejša rast in ožiljenje tumorja	
	stabilno izražanje antagonistov EPO v celicah	zaustavitev rasti in ožiljenja tumorja	
ksenografi glodavskih tumorjev v miškah	izražanje konstitutivno aktivnega EPOR	hitrejša rast in ožiljenje tumorja, višja fosforilacija ERK	
	stabilno izražanje antagonistov EPO v celicah	tumorji se ne razvijejo	
ksenografi humanih HER2(+) tumorjev v miškah	terapija s trastuzumabom v kombinaciji z rHuEPO ali placebo	odpornost proti trastuzumabu	(Liang in sod., 2010)

2.6 CISPLATIN

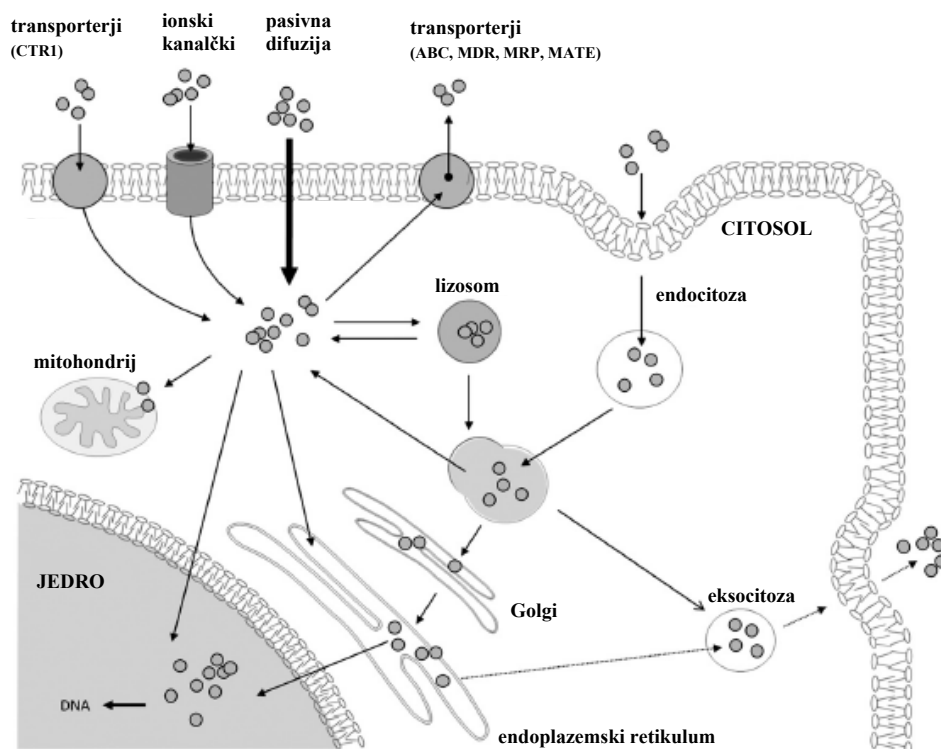
Cisplatin (cDDP, cis-diamindikloroplatina) je v terapiji raka eden najpogostejše uporabljenih kemoterapevtikov (Sancho-Martínez in sod., 2012; Cepeda in sod., 2007). V priliririrajočih celicah se veže na molekulo DNA ter z njo tvori adukte, ki preprečijo podvojevanje ter sledečo mitotsko delitev (Sorenson in Eastman, 1988). Vendar pa je njegova terapevtska učinkovitost omejena s stranskimi učinki, predvsem z nefrotoksičnostjo. Stranski učinki so odvisni od uporabljene doze; ob visokih uporabljenih koncentracijah deluje tudi na ne-proliferajoče celice (Barabas in sod., 2008; Jaggi in Singh, 2012; Rybak in sod., 2009; Sánchez-González in sod., 2011). Dodatni omejujoči faktor za terapevtsko učinkovitost je tudi pridobljena odpornost tumorskih celic na cDDP (Cepeda in sod., 2007).

2.6.1 Mehanizmi delovanja cisplatina

cDDP vstopa v celico na več načinov; s pasivno difuzijo (Gately in Howell, 1993), preko transporta, ki je odvisen od hidrolize ATP (Hall in sod., 2008; Kröning in sod., 2000) oziroma je v manjši meri reguliran preko H-RAS, protein kinaze A, protein kinaze C ter preko signalne poti Ca^{2+} -kalmodulin (Gately in Howell, 1993). Po vstopu v celico pride do hidroksilacije cDDP, ki močno poveča njegovo aktivnost (Andrews in Howell, 1990; Ekborn in sod., 2003). Proces je reguliran preko molekul s prostimi tiolnimi skupinami (Dabrowiak in sod., 2002). Transport cDDP v celico oziroma znotraj celice je prikazana na sliki 9. Delovanje cDDP je odvisno od uporabljene koncentracije in povzroči zaustavitev celičnega cikla (nizke koncentracije), apoptozo (srednje koncentracije) ali pa nekrozi-podobno celično smrt (visoke koncentracije) (Cepeda in sod., 2007; Sancho-Martínez in sod., 2011).

Molekula DNA ni edina tarča cDDP, pač pa le-ta deluje tudi na mitohondrije, lizosome, endoplazemski retikulum, plazemsko membrano, citoskelet in citosol.

Mitohondriji. cDDP poveča permeabilnost zunanje mitohondrijske membrane ter posledično izzove aktivacijo intrinzične poti apoptoze (Cullen in sod., 2007). Zniža izražanje anti-apoptotičnih genov *BCL2* in *BCL2L1* ter poviša nivo izražanja pro-apoptotičnih genov *BAX*, *BAK*, *BAD*, *BBC3* in *PMAIP1*. Iz mitohondrijev se tako sprosti citokrom c, se veže na APAF1 ter druge proteine apoptosoma ter aktivira iniciatorske *CASP9* oziroma efektorske *CASP3*. Na proteinskem nivoju se v odgovor na cDDP aktivirajo ERK, p38 in JNK. Aktiviran ERK stimulira p53, tumorske celice pa tako postanejo bolj občutljive za apoptozo (Mujoo in sod., 2003). Na mitohondrije deluje tudi posredno; v citosolu aktivira delovanje pro-apoptoznih proteinov iz družine *BCL2* ter zviša koncentracijo citosolnega kalcija ter tako spremeni homeostazo mitohondrijev (Sancho-Martínez in sod., 2012).



Slika 9: Shematski prikaz transporta cDDP v celico oziroma iz nje ter transport in akumulacija cDDP znotraj celice (Sancho-Martínez in sod., 2012)

Znotrajcelična koncentracija cDDP je odvisna od razmerja med vnosom v celico in iznosom iz nje. Glavni transporter za vnos cDDP v celico je CTR1 (angl. Copper Transporter 1). Transporterja ATP7A in ATP7B (angl. copper P-type Adenosine TriPhosphate) omogočata transport do plazemske membrane; za transport iz celice pa so pomembni transporterji ABC (angl. ATP-binding cassette), MDR (angl. Multidrug Resistance Protein), MRP (angl. Multidrug-Resistance associated Protein), ATPaze (angl. copper-transporting P-adenosine triphosphatase) in proteini MATE (angl. Multidrug And Toxin Extrusion).

Figure 9: Mechanisms of cellular handling of cDDP: inward and outward transport, and intracellular trafficking and accumulation (Sancho-Martínez in sod., 2012)

Intracellular concentration of cDDP is dependent on the inward and outward transport ratio. Copper transporter 1 (CTR1) is the main transporter for the cDDP intake. Copper P-type adenosine triphosphate (ATP7A and ATP7B) transporters are involved in transport to the plasma membrane; ATP-binding cassette (ABC), multidrug resistance protein (MDR), multidrug-resistance associated protein (MRP), copper-transporting P-adenosine triphosphate (ATPase) and multidrug and toxin extrusion transporters (MATE) are important for the export of cDDP out of the cell.

Lizosomi. Igrajo zelo pomembno vlogo pri citotoksičnosti, posredovani s cDDP. cDDP povzroči permeabilizacijo lizosomske membrane, pri čemer se v citosol sprostijo proteinaze katepsini in aktivirajo intrinzično pot apoptoze in tudi nekrozo. Na permeabilizacijo lizosomske membrane vplivajo: (i) reaktivne kisikove zvrsti (ROS) iz mitohondrija; (ii) aktivacija signalne poti p53 zaradi poškodb DNA; (iii) preko endoplazmatskega retikuluma aktivirana CASP2 ter (iv) aktivacija proteina BAX ter njegov prehod na membrano lizosomov (Sancho-Martínez in sod., 2012).

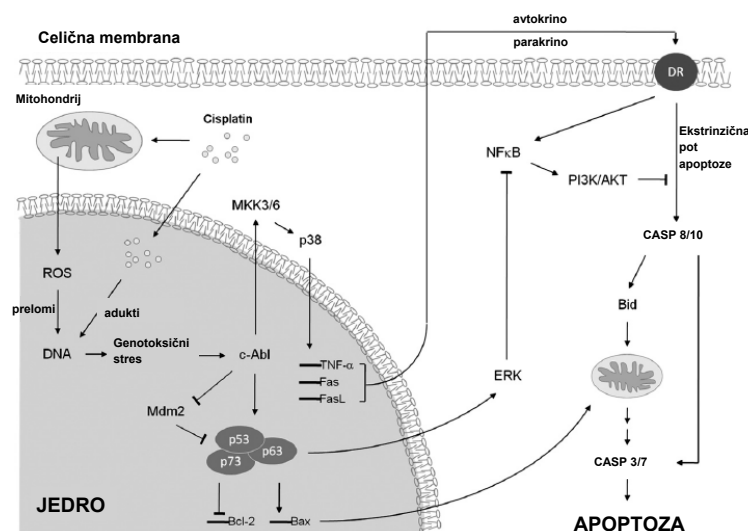
Endoplazmatski retikulum. Citotoksični učinki cDDP na endoplazmatski retikulum (ER) so najverjetneje povezani z indukcijo mehanizma UPR (angl. Unfolded Protein Response). cDDP se nalaga v ER ter se tam veže z različnimi proteini ter tako onemogoči njihovo pravilno zvitje. Poleg tega, aktivira proteina BAX in BAK, ki v membrani ER tvorita pore in omogočita izhajanje Ca^{2+} (Sancho-Martínez in sod., 2012).

Jedro. Genotoksični učinek cDDP (slika 10) je rezultat vezave z molekulo DNA ter tvorbe aduktov, ki so preferenčno 1,2- in 1,3-interverzični. V primeru 1,2-aduktov se cDDP kovalentno veže z mestom N7 dveh sosednjih purinskih baz in so oblike GpG. 1,3-adukti so oblike GpNpG. Poškodbe DNA izzovejo aktivacijo signalne poti p53. Protein p53 stimulira prepisovanje pro-apoptotskih proteinov BAX, BAK, NOXA in PUMA oziroma inhibira prepisovanje proteinov BCL2 in BCL2L1. Tako aktivira proces apoptoze ter prepreči nastanek neželenih mutacij (Sancho-Martínez in sod., 2012).

Razvoj odpornosti na cDDP je povezan z zmanjšano akumulacijo citostatika v celici (vloga transporterjev MRP2 in ATP7A/B), njegovo večjo inaktivacijo preko interakcije s tiol-vsebujočimi molekulami, večjo aktivnostjo popravilnih mehanizmov DNA (topoizomeraza II) in povišanim izražanjem genov nuklearnih izrezovalnih mehanizmov (ERCC1). Pomembni faktorji pri razvoju odpornosti so tudi prekomerno izražanje receptorjev HER2, preko katerih se aktivirata signalni poti MAPK in PI3K, mutacije v genu *TP53* ter inhibicija apoptoze. Aktivacija signalne poti PI3K(AKT) namreč poveča izražanje proteinov BCL2 in BCL2L1 ter inhibira izražanje proteina BAX (Lukyanova in sod., 2009; Kutuk in sod., 2009). Vloga rHuEPO pri zaščiti celic pred apoptozo naj bi bila povezana prav z aktivacijo signalnih poti MAPK in PI3K, torej z inaktivacijo izražanja proteina BAX in povečanim izražanjem proteinov BCL2 in BCL2L1 ter tudi z aktivacijo signalne poti NFkB1 (Mujoo in sod., 2003).

2.6.2 Cisplatin in rHuEPO

Obstaja več študij, ki opisujejo učinke rHuEPO na citotoksičnost, posredovano s cDDP. Učinki so odvisni od uporabljenega modela, uporabljenih koncentracij rHuEPO in zasnove poskusa. Nekaj analiz je predstavljenih v preglednici 1.



Slika 10: Genotoksični učinki cDDP v jedru celice (Sancho-Martínez in sod., 2012)

Adukti cDDP-DNA povzročijo dvojne prelome v molekuli DNA, ki aktivirajo številne kinaze: PI3K, ATM (angl. Ataxia-Telangliectasia Mutated), ATR (angl. ATM-Related) in DNA-PK (angl. DNA-activated Protein Kinase). Omenjene kinaze so vključene v procese zaustavitve celičnega cikla, popravljanja DNA in aktivacijo apoptoze. cDDP aktivira tudi proteine p53, p63 in p73 ter kinazo p38. Slednja stimulira TNF, ki se veže na svoj membranski receptor TNFR in aktivira ekstrinzično pot apoptoze.

Figure 10: Cisplatin genotoxic effects in cell nucleus (Sancho-Martínez in sod., 2012)

cDDP-DNA adducts cause double breaks in the DNA molecule that activate a number of kinases: PI3K, ataxia-telangliectasia (ATM), ATM-related (ATR) and DNA-activated protein kinase (DNA-PK). These kinases are involved in the process of cell cycle inhibition, DNA damage repair and activation of apoptosis. cDDP activate p53, p63, and p73 proteins and p38 kinase. The latter stimulates TNF, which binds to its membrane receptor (TNFR) and activates the extrinsic pathway of apoptosis.

2.7 TAMOKSIFEN

Tamoksifen (TAM) je ne-steroidni derivat trifeniletilena in je pogojni antagonist receptorja za estrogene (ESR). Ima anti-estrogenske učinke v dojki, medtem ko je njegovo delovanje v kostnem tkivu in kardiovaskularnemu sistemu pro-estrogeno (Macgregor in Jordan, 1998). Spada v skupino selektivnih modulatorjev receptorja za estrogene (SERM, angl. Selective Estrogen Receptor Modulators) ter se uporablja za zdravljenje ESR pozitivnih oblik raka dojk ter tudi za preprečevanje razvoja bolezni pri ženskah z visoko stopnjo tveganja (Macgregor in Jordan, 1998). TAM predstavlja pred-obliko terapevtika, ki ima le šibko afiniteto do ESR. Jetrna encima CYP2D6 in CYP3A4 omogočata pretvorbo TAM v aktivna metabolita, 4-hidroksi tamoksifen (4-OH-TAM) in N-desmetil-4-hidroksi tamoksifen, katerih afiniteta do ESR je 30-100 krat večja v primerjavi s TAM (Desta in sod., 2004). 4-OH-TAM ima v dojki antagonistično delovanje ter inhibira prepisovanje od estrogena odvisnih genov (Wang in sod., 2004).

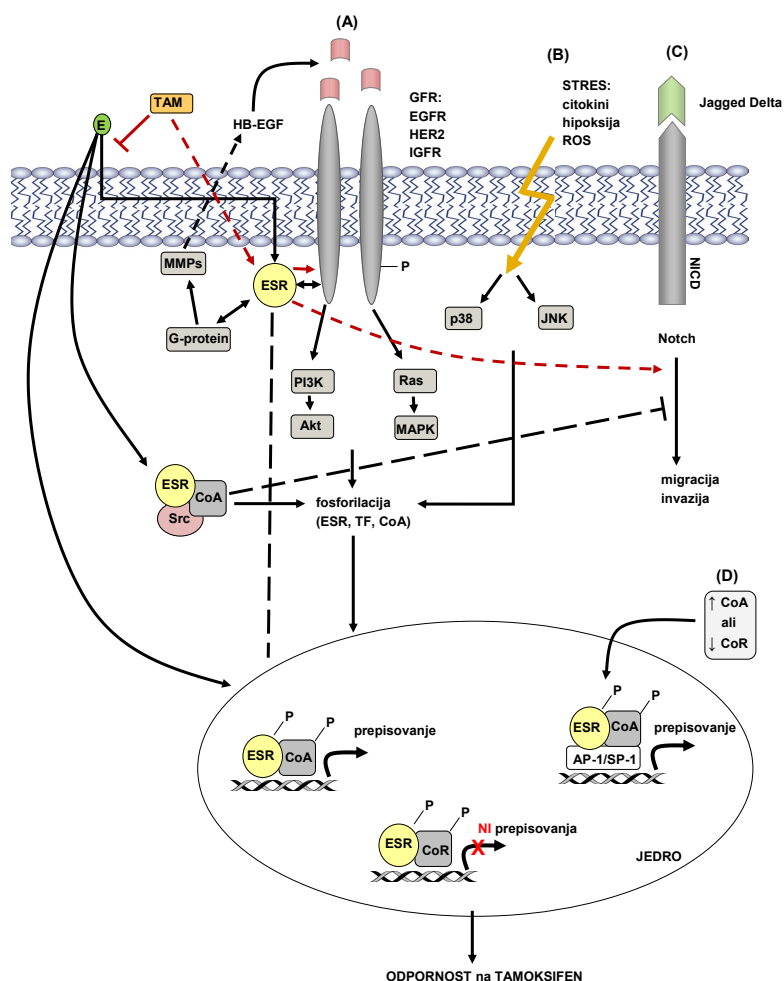
2.7.1 Mehanizmi delovanja

TAM se selektivno veže na ESR (preferenčno na ESR1), pri čemer povzroči konformacijsko spremembo receptorja, ki je različna od tiste po vezavi primarnega liganda, estrogena. Estrogen se veže v hidrofobni žep znotraj ligand-vezavne domene (LBD) receptorja ESR. V vezavo je udeležena vijačnica 12, ki zapre hidrofobni žep z vezanim ligandom. Sledita konformacijska sprememba receptorja in posledična aktivacija domene AF-2 (angl. Activation Function 2) znotraj LBD (Shiau in sod., 1998). TAM se prav tako veže v hidrofobni žep receptorja, v vezavi pa ni udeležena vijačnica 12. Slednja ne zapre hidrofobnega žepa z vezanim TAM, s čimer ovira vezavo kofaktorjev in onemogoča prepisovanje genov, ki so pod aktivacijsko kontrolo receptorske domene AF-2. Poleg tega, konformacijska sprememba ESR po vezavi TAM aktivira ko-represorje in deacetilaze, ki tako še dodatno inhibirajo aktivnost receptorja (Shou in sod., 2004; Smith in sod., 1997). Za gene, katerih prepisovanje je pod aktivacijsko kontrolo domene AF-1, ima TAM agonistično delovanje (Tzukerman in sod., 1994; McDonnell in sod., 1995). Antagonistično oziroma agonistično delovanje TAM je tkivno-specifično in je torej pogojeno s prevlado AF-1 oziroma AF-2 odvisnih genov ter je odvisno od spektra ko-aktivatorjev in ko-represorjev ESR v posameznem tkivu. Agonistično delovanje TAM prevladuje predvsem v tkivih z visoko izraženima ko-aktivatorjema AIB1 in SRC1 (Osborne in sod., 2005).

2.7.2 Razvoj celične odpornosti na TAM

Razvoj odpornosti na TAM je zelo pogost in se zgodi pri večini bolnikov z metastatsko boleznijo ter tudi pri 40 % bolnikov, ki TAM prejemajo v obliki adjuvantne terapije (Ring in Dowsett, 2004). K razvoju odpornosti prispeva več faktorjev (slika 11), v prvi meri izguba izražanja ESR1 oziroma nefunkcionalnost receptorja. Poleg tega naj bi k razvoju odpornosti pripomoglo tudi visoko izražanje receptorja ESR2 (Paech in sod., 1997). ESR reagira s številnimi ko-aktivatorji in ko-represorji, spremenjeni nabor le-teh pa je posledično pomemben faktor pri razvoju odpornosti. Med najpomembnejšimi ko-aktivatorji je AIB1, katerega izražanje je povišano v več kot 50 % tumorjev dojke. Pri pacientih brez terapije je visoko izražanje AIB1 pozitiven prognostični faktor, ravno nasprotno pa AIB1 poveča agonistične učinke TAM pri pacientih na adjuvantni terapiji (Osborne in sod., 2003). *In vitro* študije dodatno kažejo na vlogo ko-aktivatorja SRC1 pri zviševanju agonističnih učinkov 4-OH-TAM (Tzukerman in sod., 1994; Smith in sod., 1997). Dodatni razlogi za razvoj odpornosti na TAM so tudi zmanjšana aktivnost ko-represorjev tekom terapije (Chan in sod., 1999) ter povezanost signalne poti ESR z drugimi znotrajceličnimi signalnimi potmi, predvsem EGFR/HER2, IGFR ter signalno potjo membranske vezanega receptorja za estrogene

(GPER). Povišano izražanje receptorja HER2 prispeva k znižanemu izražanju ESR, povišanemu nivoju od estrogena neodvisne fosforilacije ESR in aktivacije prepisovanja ter tako predstavlja enega najpomembnejših mehanizmov razvoja *de novo* in pridobljene odpornosti na TAM (Pietras in sod., 1995).



Slika 11: Signalne poti, ki so udeležene v razvoj odpornosti na TAM (García-Becerra in sod., 2012)

(A) Tamoksifen (TAM) inhibira signalizacijo preko estrogena (E), medtem ko signalizacija preko receptorjev za rastne faktorje (GFR) vodi v od estrogena-neodvisno fosforilacijo ESR, aktivacijo transkripcijskih faktorjev (TF) ter njihovih ko-aktivatorjev (CoA). Kompleks E-ESR lahko zunaj jedra interagira z GFR, SRC, CoA in metaloproteinazami matriksa (MMPs), kar vodi v sprostitvev heparin-vezanega-EGF (HB-EGF, angl. Heparin-Binding-EGF); (B) Fosforilacija ESR in CoA zaradi stresa (hipoksija, ROS, citokini); (C) Signalna pot Notch regulira migracijo in invazijo celic raka dojke. Delovanje estrogena na omenjeno signalno pot je inhibitorno, medtem ko je delovanje TAM pro-aktivacijsko; (D) Visoka koncentracija CoA oziroma nizka koncentracija korepresorjev (CoR) vodi v odpornost celic na TAM.

Figure 11: Signaling pathways involved in the tamoxifen (TAM) resistance (García-Becerra in sod., 2012)

(A) While TAM inhibits estrogen (E) signalization, growth factor receptors (GFR) promote ESR phosphorylation and activation of transcription factors (TFs) and their coactivators (CoA) in an estrogen-independent manner. Outside nucleus E-ESR complex can interact with GFR, SRC, CoA and matrix metalloproteinases (MMPs) that release heparin-binding-EGF (HB-EGF, angl. Heparin-Binding-EGF); (B) Stress (cytokines, hypoxia, ROS) may trigger signalization leading to ESR and its coregulators phosphorylation; (C) Notch pathway regulates the migration and invasion of breast cancer cells. Estrogen inhibits this pathway while TAM activates it; (D) High levels of CoA and low levels of corepressors (CoR) have been implicated in the development of TAM resistance.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 NESMRTNE CELIČNE LINIJE

Pri doktorskem delu smo uporabili nesmrtnne celične linije MCF-7, T-47D, MDA-MB-361, MDA-MB-231, SKBR3, Hs578T, Hs578Bst, MCF-10A, UT7/EPO, RAMA 37 in RAMA 37-28. Celične linije MCF-7, T-47D, MDA-MB-361, MDA-MB-231, SKBR3, Hs578T, Hs578Bst in MCF-10A so humanega izvora in predstavljajo različne tipe raka dojke (preglednica 3). Pridobili smo jih iz Ameriške banke celičnih kultur (ATCC, angl. American Type Culture Collection). Celična linija UT7/EPO izvira iz kostnega mozga pacienta z megakariocitno levkemijo in smo jo pridobili od C. Lacout iz onkološkega inštituta Gustave Roussy iz Francije. Je od EPO odvisna celična linija, zato smo ob gojenju v rastno gojišče dodajali rHuEPO v koncentraciji 2 U/ml. Celični liniji RAMA 37 in RAMA 37-28 sta podganjega izvora. Celice RAMA 37-28 so klon RAMA 37 s povečanim izražanjem EPOR. Obe celični liniji smo pridobili iz Centra za raziskave raka in celično biologijo iz Belfasta (Queen's University Belfast, Irska). Vse celice z izjemo suspenzijskih UT7/EPO, rastejo kot pritrjena kultura. Celice smo gojili v celičnem inkubatorju pri 37 °C ter v vlažni atmosferi s 5 % CO₂. Celice smo gojili v ustreznem osnovnem rastnem gojišču z dodanim serumom govejega zarodka (FBS, angl. Fetal Bovine Serum) (preglednica 5).

Preglednica 3: Lastnosti celičnih linij

(IDC) invazivni duktalni karcinom, (AC) adenokarcinom, (F) fibrocitoza; (NA) ni podatka

Table 3: Cell line characteristics

(IDC) invasive ductal carcinoma, (AC) adenocarcinoma, (F) fibrocytosis, (NA) not available

celična linija	izvor	tip bolezni	ATCC številka	oblika celične kulture	tumorigenost <i>in vivo</i>	invazivnost <i>in vitro</i>
MCF-7	človek	IDC	HTB-22	pritrjena kultura	šibko tumorigena	šibko invazivna
T-47D			HTB-133			
MDA-MB-361		AC	HTB-27		visoko tumorigena	visoko invazivna
MDA-MB-231			HTB-26		visoko tumorigena in metastatska	
SKBR3			HTB-30		šibko tumorigena	šibko invazivna
Hs578T		IDC	HTB-126		ne-tumorigena	visoko invazivna
Hs578Bst		nerakasto tkivo okrog IDC	HTB-125		NA	NA
MCF-10A		F	CRL-10317		netumorigena	NA
UT7/EPO	megakariocitna levkemija	NA	suspenzijska kultura			
RAMA 37	podgana	karcinom dojke	NA	pritrjena kultura		
RAMA 37-28		karcinom dojke	NA			

3.1.1 Receptorski status celičnih linij raka dojke

Nivo izražanja receptorjev za estrogene (ESR) in progesteron (PGR) ter EPOR je prikazan v preglednici 4. Podatke o izražanju teh receptorjev na proteinskem nivoju smo dobili iz podatkovne baze ATCC oziroma iz literature. Izbrane celične linije raka dojke razdelimo na dve skupini: hormonsko-odvisne (MCF-7, T-47D in MDA-MB-361) in hormonsko-neodvisne celične linije (MDA-MB-231, SKBR3, Hs578T, Hs578Bst in MCF-10A).

Preglednica 4: Receptorski status celičnih linij raka dojke

Preglednica prikazuje izražanje receptorjev ESR, PGR in EPOR na proteinskem nivoju: (+) receptor je izražen; (-) receptor ni izražen; (NA) ni podatka

Table 4: Receptor expression in the breast cancer cell lines

Table shows ESR, PGR and EPOR expression on the protein level: (+) receptor is expressed; (-) receptor is not expressed; (NA) not available

celična linija	MCF-7	T-47D	MDA-MB-361	MDA-MB-231	SKBR3	Hs578T	Hs578Bst	MCF-10A	RAMA 37	RAMA 37-28
protein	ESR(+), PGR(+), EPOR(+)	ESR(+), PGR(+), EPOR(+)	ESR(+), PGR(-), EPOR(NA)	ESR(+), PGR(-), EPOR(+)	ESR(-), PGR(-), EPOR(+)	ESR(-), PGR(-), EPOR(+)	ESR(-), PGR(-), EPOR(NA)	ESR(-), PGR(-), EPOR(NA)	ESR(NA), PGR(NA), EPOR(+)	ESR(NA), PGR(NA), EPOR(+++)

3.1.2 Priprava osnovnega rastnega medija

Osnovno rastno gojišče za posamezno celično linijo smo izbrali glede na priporočila podatkovne baze ATCC. Za normalno rast celice potrebujejo dodatek FBS (Sigma, F9665); odstotek FBS v gojišču ter tip osnovnega gojišča za posamezno celično linijo sta navedena v preglednici 5.

Preglednica 5: Celične linije in ustrezna snovna rastna gojišča

Table 5: Cell lines and the corresponding basic growth medias

celična linija	rastno gojišče	odstotek FBS	ostali dodatki
MCF-7	EMEM (Sigma, M0643)	10 %	2.2 g/l NaHCO ₃ (Sigma, S3817), 0.11 g/l C ₃ H ₃ NaO ₃ (Sigma, P5280), 0.01 mg/ml inzulin (Sigma, I2643)
T-47D	RPMI 1640 (Sigma, R6504)		2 g/l NaHCO ₃ 0.02 mg/ml inzulin
MDA-MB-361	Liebovitz's L15 (Sigma, L4386)		1.5 g/l NaHCO ₃
MDA-MB-231			
SKBR3	McCoy's 5A (Sigma, M4892)		2.2 g/l NaHCO ₃
Hs578T	DMEM (Sigma, D7777)		3.7 g/l NaHCO ₃ , 0.01 mg/ml inzulin
Hs578Bst			3.7 g/l NaHCO ₃
MCF-10A	DMEM/F12 (Sigma, D8900)	5 %	1.2 g/l NaHCO ₃ , 0.01 mg/ml inzulin, 20 ng/ml EGF (Sigma, E9644), 0.5 µg/ml hidrokortizon (Sigma, H6909)
UT7/EPO	alphaMEM (Sigma, M0643)	10 %	3.7 g/l NaHCO ₃ , 2 U/ml rHuEPO
RAMA 37	DMEM (Sigma, D7777)		
RAMA 37-28			3.7 g/l NaHCO ₃

Postopek priprave: Osnovni mediji v prašni obliki smo zmešali z bidestilirano vodo (bdH₂O) ter NaHCO₃, v primeru gojišča EMEM smo k zmesi dodali še C₃H₃NaO₃. Gojišče smo mešali 2 h pri sobni temperaturi, uravnali pH na vrednosti 7.05 - 7.15 ter gojišče prefiltrirali preko filtra za tekočine z velikostjo por 0.22 µm. Po filtraciji smo posameznemu mediju dodali FBS in ustrezne dodatke (preglednica 5). Tako pripravljeno gojišče imenujemo osnovno rastno gojišče.

3.1.3 Precepljanje celic

Reagenti:

- fosfatni pufer pH 7.4 (PBS; Sigma, P4417),
- encim tripsin (Sigma, T4049).

Postopek:

Za resuspendiranje celic pri precepljanju v novo pasažo smo uporabili serinsko proteazo tripsin, ki cepi povezave med celičnimi proteini in površino steklenice za gojenje celic. Celice smo najprej dobro sprali s PBS, jim dodali tripsin ter jih postavili v celični inkubator za 5 min. Potem, ko so se celice odlepili od površine, smo delovanje tripsina zavrli z dodatkom osnovnega rastnega gojišča. Celice smo redčili v ustreznem razmerju in jih prenesli v nove steklenice s svežim gojiščem.

3.1.4 Štetje celic

Reagenti:

- čip s štirimi komorami za štetje celic (Digital Bio),
- raztopina propidijevga jodida (PI) z dodanim detergentom (reagent T) (komplet reagentov AccuStation Solution, Digital Bio),
- raztopina PI brez dodanega detergenta (reagent N) (komplet reagentov AccuStation Solution, Digital Bio).

Postopek:

Za štetje celic smo uporabili avtomatski števec ADAM (Digital Bio). Po tripsinizaciji smo celice resuspendirali v ustreznem volumnu rastnega gojišča in iz celične suspenzije odvzeli alikvot za določanje njihovega števila. Najprej smo celicam dodali raztopino PI z dodanim detergentom (razmerje 1:1), suspenzijo nanесли na čip ter določili celotno število celic v vzorcu (A). Sledilo je barvanje z raztopino PI brez dodanega detergenta (razmerje 1:1), nanos celic na čip ter določitev števila mrtvih celic (B). Po vzbujanju z zelenim laserjem (532 nm), CCD kamera znotraj aparata ADAM zazna celice, ki se obarvajo s PI. Število živih celic (N) smo določili iz razmerja med številom vseh in številom mrtvih celic. Princip metode temelji na dejstvu, da PI ne vstopa v celice z intaktno membrano oziroma z aktivnim metabolizmom, torej ne obarva živih celic.

$$A - B = N \quad (1)$$

V en. (1) predstavlja A število vseh celic v vzorcu, B število mrtvih celic v vzorcu in N število živih celic v vzorcu.

Odstotek živih celic (viabilnost) v vzorcu smo izračunali po enačbi:

$$\frac{A - B}{A} * 100\% = \text{viabilnost} \quad (2)$$

V en. (2) predstavlja A število vseh celic v vzorcu in B število mrtvih celic v vzorcu.

S štetjem celic zagotovimo enako gostoto nacepljenih celic za poskuse kar nam zagotavlja bolj nadzorovan poskus in zmanjšanje napake zaradi razlik v celični gostoti.

3.2 TESTI CELIČNE PROLIFERACIJE

Celično proliferacijo smo določali na tri načine:

- direktno štetje celic z avtomatskim števcem ADAM (Digital Bio),
- kalorimetrična določitev metabolne aktivnosti celic z reagentoma MTT in WST-1,
- meritev celične proliferacije z aparatom XCELLigence (Roche) v realnem času.

Teste smo uporabljali za analizo celične proliferacije po tretiranju z rHuEPO ter po indukciji s cDDP oziroma TAM. Proliferacijo izpostavljenih celic smo primerjali s proliferacijo neizpostavljenih celic. V vseh primerih smo 100 μ l celične suspenzije z ustrežno koncentracijo nacepili na plošče za gojenje celičnih kultur. Uporabili smo plošče s 96 luknjicami. Za vsak pogoj, ki smo ga testirali, smo celice nacepili v treh ponovitvah.

3.2.1 Direktno štetje celic z avtomatskim števcem ADAM

Postopek štetja celic smo izvedli v skladu z navodili proizvajalca in je opisan v 3.1.3.

3.2.2 Kalorimetrične metode

Kalorimetrični metodi z reagentoma MTT in WST-1 omogočata posredno določanje števila celic preko merjenja metabolne aktivnosti od NAD(P)H odvisnih celičnih oksidoreduktaz.

Reagent MTT

Reagenti:

- ploščice za gojenje celičnih kultur s 96 luknjicami,

- barvilo MTT (angl. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide); Sigma, M5655),
- 20 % raztopina SDS v 0.1 M HCl.

Postopek:

Postopek smo izvedli v skladu z navodili proizvajalca. Meritve smo opravili na spektrofotometru EPOCH (BioTek). Najprej smo pripravili delovno raztopino MTT s koncentracijo 5 mg/ml in jo dodali k celičnim kulturam v razmerju 1:10 (10 μ l v skupno 100 μ l). Kulture smo 4 h inkubirali v celičnem inkubatorju, potem pa odstranili gojišče z dodanim MTT. Netopni formazanski produkt smo raztopili v 20 % raztopini NaDS v HCl ter izmerili njegovo absorbanco pri 570 nm, od katere smo odšteli absorbanco ozadja, izmerjeno pri 670 nm.

Reagent WST-1

Reagent WST-1 je vodotopen, njegova redukcija v formazanski produkt pa poteka zunaj celice. V raztopino reagenta WST-1 je vključen tudi prejemnik elektronov, 1 -metoksi PMS, ki sodeluje pri pretvorbi reagenta v topni formazanski produkt. Prednosti reagenta WST-1 v primerjavi z reagentom MTT so manjša toksičnost zaradi redukcije reagenta zunaj celice ter večja efektivnost signala.

Reagenti:

- ploščice za gojenje celičnih kultur s 96 luknjicami,
- reagent WST-1 (angl. Wather Soluble Tetrazolium salt-1; Roche, 11644807001).

Postopek:

Postopek smo izvedli v skladu z navodili proizvajalca. Meritve smo opravili na spektrofotometru EPOCH. Najprej smo k celičnim kulturam dodali raztopino reagenta WST-1 v razmerju 1:10 (10 μ l v skupno 100 μ l) in jih inkubirali 4 h v celičnem inkubatorju. Po inkubaciji smo izmerili absorbnost topnega formazanskega produkta pri 450 nm ter od nje odšteli absorbnost ozadja, izmerjeno pri 690 nm.

3.2.3 XCELLigence

Aparat XCELLigence omogoča meritve celične rasti v realnem času. Deluje na principu celične upornosti, ki se spremeni po pritrditvi celic na površino ploščice. Aparat zaznava

razlike v prevodnosti glede na število pritrjenih celic. Za analizo celične proliferacije oziroma viabilnosti na aparatu XCELLigence potrebujemo posebne ploščice (s 16 luknjicami), katerih dno je prekrito s platino in tako omogoča zaznavanje razlik v celični prevodnosti.

Postopek:

Postopek smo izvedli v skladu z navodili proizvajalca. Najprej smo v luknjice nanесли 100 μ l rastnega gojišča ter ga 30 min inkubirali na sobni temperaturi. Nato smo na ploščice dodali celice v ustrezni koncentraciji ter ploščice prenesli v aparat XCELLigence. Meritev smo izvajali 5 dni, podatke smo zajemali na 1 h.

3.3 TESTI KLONIGENOSTI

Test klonigenosti je metoda za analizo celične proliferacije ter sposobnosti celic za tvorbo kolonij. Metoda temelji na sposobnosti posamezne celice za neskončno število delitev in tvorbo kolonij, klonov posamezne celice.

Reagenti:

- ploščice za gojenje celičnih kultur s 6 luknjicami,
- metanol,
- 0.5 % raztopina barvila Crystal Violet (Sigma, C3886).

Postopek:

Celice smo v nizki koncentraciji nacepili na ploščice za gojenje celičnih kultur ter jih gojili v celičnem inkubatorju 14 dni. Uporabili smo ploščice s po 6 luknjicami. Celicam smo zamenjali gojišče na 5 dni in ga nadomestili s svežim. Po končanem gojenju smo celice najprej sprali s hladnim metanolom (10 min) ter jih nato pobarvali z 0.5 % raztopino Crystal Violet (10 min). Število kolonij smo določili s štetjem oziroma z uporabo sistema UviPro (Uvitec). Prešteli smo vse kolonije s po več kot 50 celicami. Kolonije smo razlikovali glede na njihovo velikost: kolonije z manj kot 100 celicami smo definirali kot majhne, tiste z več kot 100 celicami pa kot velike.

3.4 TRETIRANJE CELIC Z rHuEPO

Clične linije MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-361, T47D, SKBR3, Hs578T, RAMA 37 in RAMA 37-28 smo tretirali z rHuEPO ter določili njegov vpliv na celično proliferacijo.

3.4.1 Testi celične proliferacije

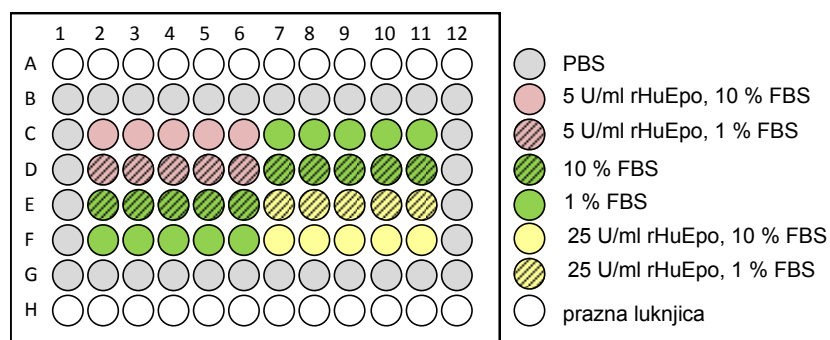
Celice smo v ustrezni koncentraciji (preglednica 6) nacepili na ploščice za gojenje celičnih kultur. Uporabili smo ploščice s 96 luknjicami.

Preglednica 6: Test celične proliferacije po tretiranju z rHuEPO: koncentracije nacepljenih celic

Table 6: Cell concentrations used in the proliferation studies investigating rHuEPO effects

celična linija	koncentracija
MCF-7	7500 celic/ml
MDA-MB-231	
SKBR3	
Hs578T	
RAMA 37	12500 celic/ml
RAMA 37-28	

Za nacepitev celic smo uporabili osnovno rastno gojišče ter jih v kulturi pustili 24 h, da so se pritrdile. Naslednji dan smo osnovno gojišče zamenjali; celicam smo dodali gojišča z različnimi koncentracijami dodanega FBS (1 in 10 %) ter rHuEPO (5 in 25 U/mL). Kontrolne celice smo gojili v gojišču brez dodanega rHuEPO (slika 12). Rast celic RAMA 37 in RAMA 37-28 smo spremljali 5 dni, pri vseh ostalih celičnih linijah smo meritev izvajali 7 dni. Vsak dan smo pomerili eno ploščico; zasnova ploščice je prikazana na sliki 12. Za določitev celične proliferacije smo uporabili reagent MTT.



Slika 12: Tloris ploščice za analizo celične proliferacije po izpostavitvi celic rHuEPO

Figure 12: Cell proliferation assays investigating rHuEPO effects: plate design

3.4.2 Testi klonigenosti

Test konigenosti je bil izveden v skladu s protokolom 3.3. Celice smo v ustrezni koncentraciji nacepili na ploščice za gojenje celičnih kultur s 6 luknjicami. Delovna koncentracija celic je

bila zelo nizka in se je razlikovala glede na tip celične linije, ki smo jo v poskusu uporabili (preglednica 7).

Preglednica 7: Koncentracije celic, uporabljene pri testih klonigenosti

Table 7: Cell concentrations used in the clonogenic assays

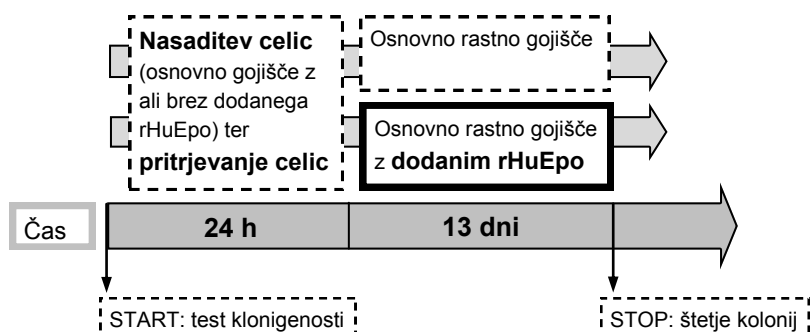
celična linija	koncentracija
MCF-7	50 celic/ml
MDA-MB-231	
Hs578T	
RAMA 37	25 celic/ml
RAMA37-28	

Postopek:

Po nacepiti celic na ploščice smo osnovno rastno gojišče nadomestili s svežim, z ali brez dodanega rHuEPO. Sposobnost klonigenosti smo torej testirali pri celicah, ki so bile z rHuEPO (5 U/ml) tretirane 13 dni oziroma so rasle v mediju brez dodanega rHuEPO. Zasnova eksperimenta je prikazana na sliki 13. Izračunali smo učinkovitost nacepiti celic *PE* (angl. Plating Efficiency). *PE* predstavlja odstotek nacepljenih celic, ki so po nacepiti tvorile kolonije.

$$PE = \frac{n}{N} * 100\% \quad (3)$$

V en. (3) predstavlja *PE* učinkovitost nacepiti celic, *n* število prešteti kolonij in *N* število vseh nacepljenih celic.



Slika 13: Shema poskusa za analizo klonigenosti po tretiranju z rHuEPO

Figure 13: Schematic representation of clonogenic assays investigating rHuEPO effects

3.4.3 Analiza celične signalizacije na proteinskem nivoju

Celične linije raka dojke (preglednica 3, brez UT7/EPO) smo tretirali z rHuEPO (5 in 25 U/ml) v različnih časovnih intervalih in analizirali aktivacijo signalnih poti MAPK, PI3K ter JAK2/STAT5. Celice UT7/EPO, ki so od EPO odvisna celična linija, so nam služile kot pozitivna kontrola za aktivacijo omenjenih signalnih poti. Celice smo v koncentraciji 2×10^5 celic/ml nacepili na ploščice za gojenje celičnih kultur s 6 luknjicami ter jih pustili v kulturi 24 h, da so se pritrdile na površino. Naslednji dan smo osnovno rastno gojišče zamenjali z gojiščem brez dodanega FBS ter celice inkubirali 24 h. Celice smo nato tretirali z rHuEPO za 0, 5, 10, 15, 30, 60 in 120 min, jih 2-krat sprali s PBS ter zamrznili v tekočem dušiku. Proteinsko signalizacijo smo analizirali z metodo prenosa po westernu, ki je opisana v 3.9.4.

3.4.4 Statistična analiza

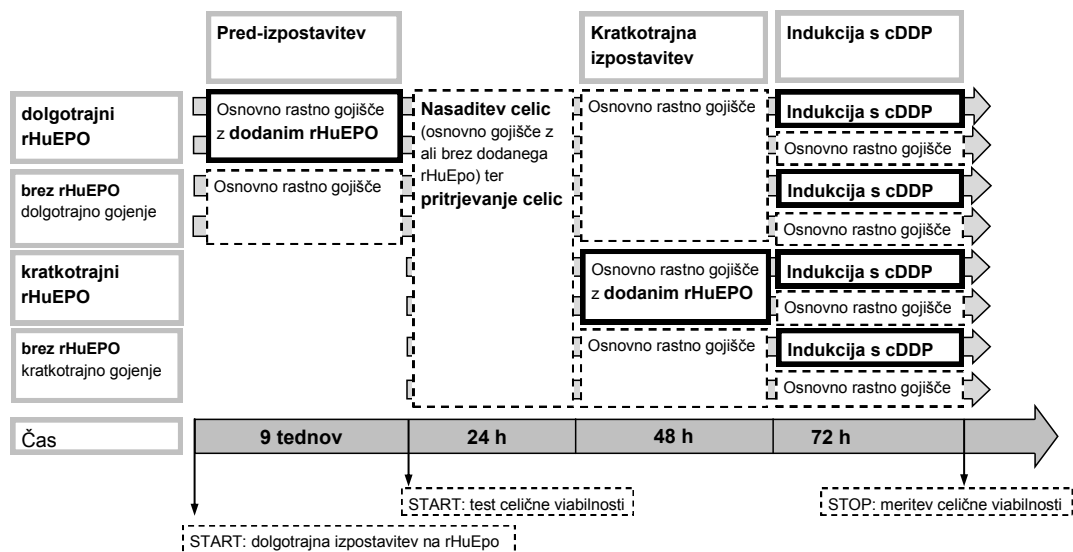
Statistično analizo meritev celične proliferacije smo izvedli s pomočjo programa Microsoft Office Excel 2007 ter programskega okolja R (programski paket limma). Razlike v hitrosti proliferacije celic med posameznimi tretmaji smo določili s pomočjo dvosmerne ANOVE. Spremenljivki sta bili tretiranje z rHuEPO (0, 5, 25 U/ml) ter koncentracija dodanega FBS (1 in 10 %). Kot statistično značilno različne smo upoštevali le tiste rezultate s $p < 0.05$. Pri testiranju multiplih primerjav smo upoštevali popravek FDR (angl. False Discovery Rate).

3.5 TRETIRANJE CELIC Z rHuEPO IN CISPLATINOM

Celični liniji MCF-7 in MDA-MB-231 smo tretirali z rHuEPO (Neorecormon, Roche) v koncentraciji 5 U/ml za 24 h (kratkotrajna izpostavitve) oziroma za 9 tednov (dolgotrajna izpostavitve). Paralelno smo gojili tudi celice brez dodanega rHuEPO v gojišču. Vse celice smo inducirali s cDDP v različnih koncentracijah (0-200 μ M) ter med skupinami celic primerjali celično viabilnost. Tekom dolgotrajne izpostavitve (t.i. pred-izpostavitve) smo celice gojili v T-25 steklenicah za gojenje celičnih kultur ter jih 2-krat tedensko precepljali. Pri precepljanju smo uporabili osnovno rastno gojišče z dodanim rHuEPO. Paralelno smo gojili tudi celice brez dodanega rHuEPO v gojišču. Tudi te celice smo precepljali 2-krat tedensko.

3.5.1 Testi celične proliferacije

Zasnova poskusa je prikazana na sliki 14. Celice smo nacepili na ploščice za gojenje celičnih kultur s 96 luknjicami v koncentraciji 40000 celic/ml. Za nacepljanje smo uporabili osnovno



Slika 14: Shema poskusa za analizo celične viabilnosti po izpostavitvi rHuEPO in tretiranju s cDDP

Figure 14: Schematic representation of cell viability assays after exposure to rHuEPO and cDDP

rastno gojišče (100 μ l) z ali brez dodanega rHuEPO in celice pustili, da so se pritrdile (24 h). Naslednji dan smo celicam zamenjali gojišče. Dolgotrajno tretiranim celicam (rastejo v gojišču z dodanim rHuEPO) smo gojišče zamenjali z osnovnim, medtem ko smo ostalim celicam v gojišče dodali rHuEPO za 24 h (kratkotrajno tretiranje). Po 48 h od nacepitve smo izvedli tretiranje s cDDP v različnih koncentracijah (0, 1, 3, 10, 30, 60, 100, 120, 150, 180, 200 μ M). Celice, ki so ostale netretirane, so nam služile kot kontrola za analizo učinkov cDDP na celično viabilnost. Tretiranje s cDDP smo izvajali 24 h ter nato izmerili celično viabilnost z reagentom WST-1.

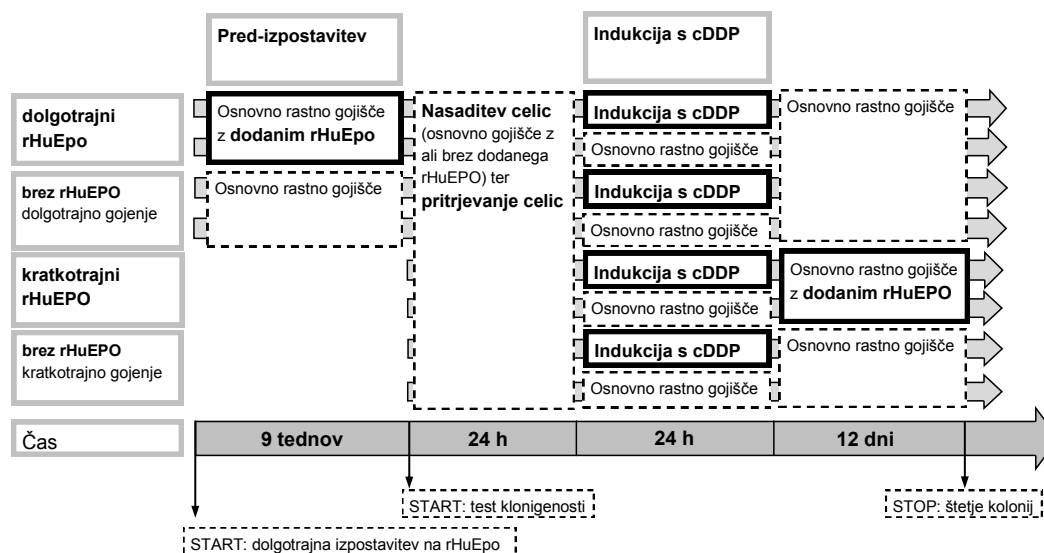
3.5.2 Testi klonigenosti

Testi klonigenosti so bili izvedeni v skladu s protokolom 3.3. Celice MCF-7 in MDA-MB-231 smo v koncentraciji 100 celic/ml nacepili na ploščice za gojenje celičnih kultur s 6 luknjicami in pustili, da se pritrdijo (24 h). Naslednji dan smo celice tretirali s cDDP v različnih koncentracijah (0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 6, 10, 12, 18, 20 μ M). Tretiranje smo izvajali 24 h, potem pa celice 3-krat sprali s PBS ter jim dodali osnovno rastno gojišče z ali brez dodanega rHuEPO. Zasnova poskusa je prikazana na sliki 15. Za vsak vzorec smo pri posamezni koncentraciji cDDP izračunali učinkovitost nasaditve celic *PE*. Izračunane *PE* so nam služile za izračun deleža preživetja celic *SF* (angl. Surviving Fraction).

$$SF_i = \frac{PE_c}{PE_n} \quad (4)$$

V en. (4) predstavlja *SFi* delež preživetja celic glede na rHuEPO izpostavitve, *i* tip izpostavitve (brez, 12 dni in 9 tednov), *PE_c* predstavlja *PE* za celice, tretirane s cDDP in *PE_n* predstavlja *PE* za netretirane celice.

Iz izračunanih *SF* smo narisali krivulje preživetja glede na rHuEPO izpostavitve.



Slika 15: Shematski prikaz testa klonogenosti po izpostavitvi rHuEPO in cDDP

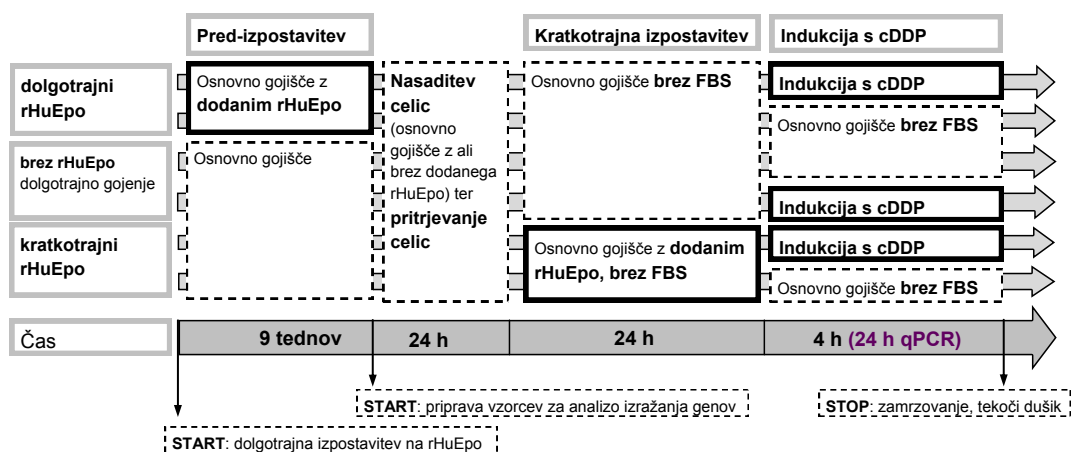
Figure 15: Schematic representation of clonogenic assays after exposure to rHuEPO and cDDP

3.5.3 Analiza izražanja tarčnih genov

Celice MCF-7 in MDA-MB-231 smo izpostavili cDDP in analizirali aktivacijo genov signalne poti p53 glede na tretiranje z rHuEPO. Zasnova poskusa je prikazana na sliki 16, la da je bila izpostavitve cDDP daljša (24 h). Celice smo v koncentraciji 2×10^5 celic/ml nacepili na ploščice za gojenje celičnih kultur s 6 luknjicami ter jih pustili v kulturi 24 h, da se pritrdile na površino. Naslednji dan smo celicam zamenjali gojišče. Dolgotrajno tretiranim celicam (v gojišču imajo dodan rHuEPO) smo gojišče zamenjali z osnovnim, medtem ko smo ostalim celicam v gojišče dodali rHuEPO za 24 h (kratkotrajno tretiranje). Sledilo je tretiranje s cDDP za 24 h; 10 μ M pri MCF-7 ter 60 μ M pri MDA-MB-231, spiranje s PBS (2-krat) ter zamrzovanje v tekočem dušiku. Izražanje genov smo analizirali z metodo kvantitativne polimerazne verižne reakcije v realnem času (qPCR).

3.5.4 Analiza celične signalizacije na proteinskem nivoju

Celice MCF-7 in MDA-MB-231 smo inducirali s cDDP in analizirali aktivacijo signalnih poti MAPK, PI3K ter JAK2/STAT5 glede na tretiranje z rHuEPO. Celice UT7/EPO, ki so od EPO odvisna celična linija, so nam služile kot pozitivna kontrola za aktivacijo omenjenih signalnih poti. Zasnova eksperimenta je prikazana na sliki 16. Celice smo v koncentraciji 2×10^5 celic/ml nacepili na ploščice za gojenje celičnih kultur s 6 luknjicami ter jih pustili v kulturi 24 h, da so se pritrdile na površino. Naslednji dan smo celicam zamenjali gojišče. Dolgotrajno tretiranim celicam (v gojišču imajo dodan rHuEPO) smo gojišče zamenjali z osnovnim, medtem ko smo ostalim celicam v gojišče dodali rHuEPO za 24 h (kratkotrajno tretiranje). Sledilo je tretiranje s cDDP za 4 h; 30 in 60 μ M pri MCF-7 ter 60 in 120 μ M pri MDA-MB-231. Celice smo po tretiranju s cDDP sprali s PBS (2-krat) ter zamrznili v tekočem dušiku. Proteinsko signalizacijo smo analizirali z metodo prenosa western.



Slika 16: Shematski prikaz priprave vzorcev za analizo aktivacije signalnih poti in izražanja tarčnih genov po tretiranju z rHuEPO in cDDP

Figure 16: Schematic representation of sample preparation for the analysis of signaling pathways activation and gene expression upon exposure to rHuEPO and cDDP

3.5.5 Statistična analiza

Statistično analizo na rezultatih celične viabilnosti smo izvedli s pomočjo programa Microsoft Office Excel 2007 ter programskega okolja R (programski paket limma). Razlike v viabilnosti celic med posameznimi vzorci smo določili s pomočjo dvosmerne ANOVE. Kot spremenljivki smo uporabili tretiranje z rHuEPO (brez, kratkotrajno, dolgotrajno) ter izpostavitve cDDP (različne koncentracije). Kot statistično značilno različne smo upoštevali le tiste rezultate s $p < 0.05$. Pri testiranju multiplih primerjav smo upoštevali tudi popravek

FDR.

3.6 DETEKCIJA SENESENCE

Ločimo dva tipa senescence, replikacijsko in tisto, ki je posledica delovanja citotoksičnih agensov. Zanimalo nas je, kakšen vpliv ima rHuEPO na razvoj senescence pri celicah MCF-7, tretiranih s cDDP. Celice MCF-7 smo v ustreznem rastnem gojišču nacepili na ploščice s 96 luknjicami v koncentraciji 1×10^5 celic/ml ter jih gojili kot je prikazano na sliki 14. Uporabili smo štiri koncentracije cDDP (0, 10, 60 in 100 μM) ter celice tretirali 24 h. Kot kontrolo smo uporabili celice, ki niso bile tretirane z rHuEPO. Sledila je analiza senescence.

Reagenti:

- ploščice za gojenje celičnih kultur s 96 luknjicami,
- komplet reagentov za histokemijsko določevanje aktivnosti β -galaktozidaze (Sigma, CS0030),
- invertni mikroskop Olympus IX71.

Postopek:

Postopek smo izvedli v skladu s priporočili proizvajalca. Celice smo najprej sprali s PBS (1-krat) ter jih nato fiksirali (6-7 min) z raztopino za fiksacijo celic. Raztopina je vsebovana v kompletu reagentov v obliki 10-kratne založne raztopine. Nato smo pripravili raztopino za barvanje celic: v ustreznem razmerju, kot ga priporoča proizvajalec, smo zmešali dH₂O, barvilo, reagenta A in B ter raztopino X-gal. V tako pripravljeni raztopini smo celice inkubirali 4 h na 37 °C v inkubatorju z normalno atmosfero. Po inkubaciji smo celice sprali s PBS (3-krat) ter jih prekrili s 70 % raztopino glicerola, ki nam omogoča shranjevanje preparatov za daljše obdobje. Preparate smo analizirali z uporabo invertnega mikroskopa, število senescentnih celic smo določili s štetjem; prešteli smo vse obarvane in neobarvane celice ter za vsak posamezni vzorec določili delež obarvanih celic. Vsak vzorec smo pripravili v treh ponovitvah, pregledali smo 5 vidnih polj na vzorec.

3.7 DETEKCIJA APOPTOZE

Določili smo vpliv kratkotrajnega in dolgotrajnega tretiranja z rHuEPO na nivo apoptoze pri celični liniji MCF-7, tretirani s cDDP. Celice smo nacepili na ploščice s 96 luknjicami

v koncentraciji 10^5 celic /ml in jih gojili na enak način kot je opisano v 3.6. Po indukciji s cDDP (24 in 48 h) smo določili nivo apoptoze in nekroze v vzorcih.

Reagenti:

- ploščice za gojenje celičnih kultur s 96 luknjicami,
- komplet reagentov ELISApplus (Roche, 1 774 425).

Postopek:

Postopek smo izvedli v skladu s priporočili proizvajalca. Najprej smo previdno aspirirali gojišče ter celicam na ploščici s 96 luknjicami dodali 200 μ L pufra za lizo celic (iz kompleta reagentov). Aspirirano gojišče smo uporabili za detekcijo nekroze, zato smo ga do analize shranili na 4 °C. Lizo celic smo izvajali 30 min pri temperaturi 15-25 °C. Sledilo je centrifugiranje pri 200 g, 10 min. Tekom inkubacije smo po navodilih proizvajalca pripravili imuno-reagent; inkubacijskemu pufu smo dodali reagenta anti-histon-biotin in anti-DNA-POD, oba v razmerju 1:20. Po končani inkubaciji smo po 20 μ L lizata oziroma aspiriranega medija prenesli v luknjice ploščice ELISA, prekrite s streptavidinom (iz kompleta reagentov) ter jim dodali 80 μ L predhodno pripravljenega imuno-reagenta. Lizat netretiranih celic nam je služil kot negativna kontrola, raztopino s kompleksi DNA-histoni (iz kompleta reagentov) smo uporabili kot pozitivno kontrolo. Ploščico smo nato prekrili s folijo ter jo ob stalnem stresanju (300 obratov/min) inkubirali 2 h pri temperaturi 15-25 °C. Po končani inkubaciji smo ploščico aspirirali ter jo 3-krat sprali z inkubacijskim pufrom (iz kompleta reagentov). V vsako izmed luknjic smo dodali 100 μ L raztopine ABTS ter ploščico stresali pri 250 obratih/min vse dokler se ni razvilo dovolj barve za spektrofotometrično meritev (absorbnost pozitivne kontrole > 600). Reakcijo smo prekinili z dodatkom raztopine ABST stop ter nato izmerili absorbanco pri 405 in 490 nm. Meritev smo izvedli na spektrofotometru EPOCH.

3.8 qPCR-KVANTITATIVNA VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU

Izražanje tarčnih genov smo preverjali z metodo PCR v realnem času (qPCR). Začetne oligonukleotide smo načrtovali tako, da smo zagotovili pomnoževanje le želenega prepisa. Za vsak par oligonukleotidnih začetnikov smo preverili uspešnost delovanja ter določili količnik učinkovitosti (angl. efficiency coefficient). Slednjega smo uporabljali za izračun relativnega izražanja tarčnih genov. Izražanje tarčnih genov smo normalizirali z izražanjem najbolj stabilnih genov (t.i. referenčnih genov) v poskusih izpostavitve celic rHuEPO in cDDP.

3.8.1 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov

Začetne oligonukleotide smo načrtovali s pomočjo programske opreme PrimerExpress (Applied BioSystems) ter njihovo specifičnost preverili z algoritmom BLAST. Pri načrtovanju začetnih oligonukleotidov smo se držali priporočila, da se prilegajo na dva sosednja eksona. Tako smo preprečili pomnoževanje genomske DNA. Sintezo začetnih oligonukleotidov smo naročili pri podjetju Eurogentec (preglednica 8).

Preglednica 8: Oligonukleotidni začetniki
(SM) smiselna orientacija; (PSM) protismiselna orientacija.

Table 8: qPCR primers
(SM) sense; (PSM) antisense primer orientation.

Tarčni geni		
gen	ID gena	zaporedje oligonukleotidnih začetnikov
FOS	2353	SM: 5'-CTACCACTCACCCGACACT-3'; PSM: 5'-AGGTCCGTGCAGAAGTCCT-3'
JUN	3725	SM: 5'-CCAAAGGATAGTGCAGTGT-3'; PSM: 5'-CTGTCCCTCTCCACTGCAAC-3'
NFKB1	4790	SM: 5'-GGTGCTCTAGTGAAAAGAACAA-3'; PSM: 5'-GCTGGTCCCACATAGTTGCA-3'
TP53	7157	SM: 5'-CCCCAGCCAAAGAAGAAAC-3'; PSM: 5'-AACATCTCGAAGCGCTCAC-3'
BAD	572	SM: 5'-GAGTGACGAGTTTGTGGACTCCTT-3'; PSM: 5'-TGTGCCCCGCGCTCTTC-3'
BAX	581	SM: 5'-ATGTTTCTGACGGCAACTTC-3'; PSM: 5'-ATCAGTTCCGGCACCTTG-3'
BBC3	27113	SM: 5'-GACCTCAACGCACAGTACGA-3'; PSM: 5'-GAGATTGTACAGGACCCTCCA-3'
BCL2	596	SM: 5'-TCCCTCGCTGCACAAATACTC-3'; PSM: 5'-ACGACCCGATGGCCATAGA-3'
BCL2L1	598	SM: 5'-CTTTGTGGAAGCTCTATGGGAACA-3'; PMS: 5'-CAGCGGTTGAAGCGTTCCT-3'
CASP3	836	SM: 5'-GCCTACAGCCCATTTCTCCAT-3'; PSM: 5'-GCGCCCTGGCAGCAT-3'
CASP9	842	SM: 5'-GGAAGCCCAAGCTCTTTTTC-3'; PSM: 5'-AAGTGGAGGCCACCTCAA-3'
PMAIP1	5366	SM: 5'-GGAGATGCCTGGGAAGAAG-3'; PSM: 5'-CCTGAGTTGAGTAGCACACTCG-3'
EPOR	2057	SM: 5'-TTGGAGGACTTGGTGTGTTTC-3'; PSM: 5'-AGCTTCCATGGCTCATCCT-3'
EGR1	1958	SM: 5'-AGCCCTACGAGCACCTGAC-3'; PSM: 5'-GGTGGTGGGGTAACTG-3'
FOSL1	8061	SM: 5'-AACCGGAGGAAGAACTGAC-3'; PSM: 5'-CTGCAGCCCAGATTCTCAT-3'
Referenčni geni		
gen	ID gena	zaporedje oligonukleotidnih začetnikov
RPLP0	6175	SM: 5'-TCTACAACCCTGAAGTGCTTGAT-3'; PSM: 5'-CAATCTGCAGACAGACACTGG-3'
GAPDH	2597	SM: 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'; PSM: 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'
PPIA	5478	SM: 5'-ATGCTGGACCCAACACAAAT-3' PSM: 5'-TCTTTCACCTTGCCAAACACC-3'
YWHAZ	7534	SM: 5'-GATCCCCAATGCTTCACAAG-3' PSM: 5'-TGCTTGTTGTGACTGATCGAC-3'
HPRT1	3251	SM: 5'-TGACCTTGATTTATTTTGCATACC-3' PSM: 5'-CGAGCAAGACGTTCACTCCT-3'
ACTB	60	SM: 5'-CCAACCGCGAGAAGATGA-3' PSM: 5'-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3'

Za TaqMan analizo smo pri podjetju Applied Biosystems naročili specifične komercialno dostopne sonde (preglednica 9). Probe so načrtovane tako, da se vežejo na dva sosednja eksona, torej preprečujejo pomnoževanje genomske DNA. Proizvajalec ne razkriva nukleotidnega zaporedja sond, pač pa ima vsaka sonda svojo identifikacijsko številko (angl. assay ID).

Preglednica 9: Probe TaqMan
(assay ID) kataloška številka proizvajalca Applied Biosystems

Table 9: TaqMan probes
(assay ID) Applied Biosystems catalogue number

Tarčni geni		
gen	ID gena	proba (assay ID)
<i>ESR1</i>	2099	Hs00174860_ml
<i>ESR2</i>	2100	Hs00230957_ml
<i>PGR</i>	5241	Hs00172183_ml
<i>EPOR</i>	2057	Hs00959427_ml
<i>EPO</i>	2056	Hs01071097_ml
<i>GP1B1</i>	2852	Hs00173506_ml
<i>GP1B2</i>	2852	Hs01116133_ml
<i>EPHB4</i>	2050	Hs00174752_ml
<i>CSF2RB</i>	1439	Hs00166144_ml
Referenčni geni		
gen	ID gena	proba (assay ID)
<i>PPIA</i>	5478	Hs99999904_ml

3.8.2 Preverjanje uspešnosti delovanja začetnih oligonukleotidov

Reagenti:

- cDNA,
- začetni oligonukleotidi (100 μ M, Eurogentec),
- SybrGreen Master Mix (Roche, 04913914001),
- dH₂O.

Postopek:

Meritve izražanja genov smo opravili na aparaturah LightCycler 480 (Roche) in ABI 7900HT Sequence detection System (Applied BioSystems). Pri preverjanju učinkovitosti oligonukleotidnih začetnikov smo uporabili cDNA, v kateri pričakujemo visoko izražanje tarčnega

Preglednica 10: Temperaturni profil verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR)

Table 10: The temperature profile of the real-time polymerase chain reaction (qPCR)

št. ciklov	postopek	T (°C)	čas	merjenje fluorescence
1	pred-inkubacija	95	10 min	
35	pomnoževanje	95	10 s	
		60	20 s	
		72	20 s	da
1	talilna krivulja	95		
		postopno hlajenje		da
		65		

gena. Pripravili smo redčitveno vrsto cDNA; v prvo luknjico mikrotitrskega traku smo na-pipetirali neredčeno cDNA ter jo v vsaki naslednji luknjici 5-krat redčili. Končna redčitev cDNA v osmi luknjici je bila tako 3125-krat. V 1.5 ml mikrocentrifugirki smo pripravili delovno raztopino začetnega oligonukleotida s koncentracijo 2.5 μ M (12.5 μ l smiselnega, 12.5 μ l protismiselnega začetnega oligonukleotida, 475 μ l dH₂O). Za vsak začetni oligonu-kleotid smo pripravili osnovno reakcijsko raztopino, ki je vsebovala 41.1 μ l dH₂O, 90 μ l (2x) SyberGreen Master Mixa ter 21.6 μ l delovne raztopine začetnih oligonukleotidov. Po 17 μ l osnovne reakcijske raztopine smo dodali k 3 μ l cDNA iz prej pripravljene redčitvene vrste, vse skupaj dobro premešali na vibracijskem mešalniku ter prenesli v mikrotitrsko ploščico s 384 luknjicami. Volumen končne reakcijske mešanice na ploščici je bil 5 μ l. Za vsak vzorec smo naredili 3 tehnične ponovitve in reakcijo izvedli pri pogojih, kot so navedeni v preglednici 10.

Po končani meritvi smo določili točko preseka *C_p* (angl. crossing point), ki predstavlja naj-večjo spremembo v fluorescenčnem signalu. Na podlagi redčitvene vrste cDNA smo določili učinkovitost pomnoževanja *E* (angl. efficiency) ter določili specifičnost začetnih oligonukle-otidov. S pomočjo linearne regresije vrednosti *C_p* pri posameznih redčitvah cDNA smo konstruirali premico, iz katere smo izračunali učinkovitost pomnoževanja. Naklon premice -3.333 predstavlja popolno (100 %) pomnoževanje oziroma *E* = 2.00. Specifičnost začetnih oligonukleotidov smo preverili na talilni krivulji. V primeru, da smo potrdili nespecifičnost ali tvorbo dimerov začetnih oligonukleotidov, smo začetnike zavrgli in načrtovali nove.

3.8.3 Izolacija RNA iz celičnih linij raka dojke

Postopek priprave celičnih vzorcev po izpostavitvi celic rHuEPO ter tretiranju s cDDP je opisan v 3.5.3.

Reagenti:

- TRI Reagent (Sigma, T9424),
- kloroform,
- izopropanol,
- etanol.

Postopek smo izvedli v skladu s priporočili proizvajalca. Celice smo s pomočjo strgalca odstranili iz površine ploščice za gojenje celičnih kultur s 6 luknjicami in jih z dodatkom 250 μ l TRI reagenta prenesli v 1.5 mL centrifugirke. Vzorcem smo dodali 50 μ l kloroforma, jih stresali 5 min ter jih nato 2 min pustili na sobni temperaturi. Sledilo je 15 min centrifugiranje pri 4 °C in radialnemu pospešku 13.000 g. V vsakem vzorcu smo dobili tri faze; zgornjo vodno fazo, v kateri je RNA, smo prenesli v novo mikrocentrifugirko. V vzorce smo dodali 125 μ l izopropanola, jih dobro premešali na vibracijskem mešalniku ter jih 10 min inkubirali na sobni temperaturi. Sledilo je ponovno centrifugiranje pri 4 °C in radialnemu pospešku 13.000 g ter 3-kratno spiranje s 75 % etanolom. Oborino RNA smo nato posušili na zraku in raztopili v vodi.

3.8.4 Meritev koncentracije izolirane RNA ter analiza njene kvalitete

Koncentracijo RNA smo preverili na spektrofotometru NanoDrop-1000 (Thermo Scientific), prav tako tudi njeno čistost (razmerje 260/230 in 260/280). Z bioanalizatorjem Agilent 2100 (Agilent) smo preko stopnje razgrajenosti RNA določili njeno kvaliteto. Stopnjo razgrajenosti opišemo z vrednostjo RIN (angl. RNA Integrity Number).

3.8.5 Priprava vzorcev cDNA

Reagenti:

- encim reverzna transkriptaza SuperScript III in pufer (Invitrogen, 18080-051),
- rekombinantni inhibitor ribonukleaz- RNaseOUT (Invitrogen, 10777-019),
- naključni heksamerni oligonukleotidi (Promega, C1181),
- ditiotritol (DTT; Invitrogen 18080-051),

Preglednica 11: Priprava osnovnih raztopin za obdelavo vzorcev RNA z DNazo in sintezo cDNA

Table 11: Preparation of DNase solution for the processing of RNA samples and cDNA synthesis

Osnovna raztopina za obdelavo z DNazo (1 vzorec)	
DNaza I	1.0 µl
10x pufer	1.5 µl
inkubacija v aparatu PCR	10 min na 30°C
	10 min na 75°C
Osnovna reakcijska raztopina za sintezo cDNA (1 vzorec)	
100 mM DTT	1.25 µl
10 mM dNTP raztopina	1.25 µl
naključni začetni oligonukleotidi	0.65 µl
SuperScript III	0.50 µl
5x pufer	5.00 µl
RNazeOUT	0.50 µl
dH2O	0.85
Σ	25 µl
inkubacija v aparatu PCR	5 min na 25°C
	60 min na 50°C
	5 min na 70°C

- deoksinukleotidi (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) (Promega, U1205, U1235, U1215, U1225),
- encim DNaza in pufer (Roche, 04716728001),
- dH₂O.

V mikrotiterske trakove smo prenesli po 1 µg vzorcev RNA ter jih obdelali z DNazo. Priprava osnovnih raztopin ter protokol za obdelavo z DNazo sta opisana v preglednici 11. Med inkubacijo z DNazo smo pripravili reakcijsko raztopino za sintezo cDNA (preglednica 11), jo dodali vzorcem RNA ter izvedli verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Temperaturni profil reakcije PCR je prikazan v preglednici 11. Sintezo cDNA smo opravili na Bio-Radovem aparatu PCR (preglednica 11). Po končani reakciji sinteze cDNA smo dobljeno cDNA še ustrezno redčili z vodo (k 30 µl cDNA smo dodali 30 µl dH₂O).

3.8.6 Meritev izražanja tarčnih genov

Meritve s qPCR smo v večini primerov naredili na aparaturi LightCycler 480 (Roche) v mikrotiterskih ploščicah s 384 luknjicami in končnim volumnom reakcije 5 µl. Na aparaturi ABI 7900HT Sequence Detection System (Applied BioSystems) smo meritve izvedli v

mikrotiterskih ploščicah s 384 luknjicami ter končnim reakcijskim volumnom 10 μ l. Za zaznavanje prepisov smo v večini primerov uporabili barvilo SybrGreen. Pri analizi izražanja genov za različne celične receptorje smo uporabljali fluorescenčno označene sonde TaqMan.

Meritve izražanja genov s tehnologijo SybrGreen

Reagenti:

- cDNA,
- začetni oligonukleotidi (2.5 μ M),
- SybrGreen Master Mix (2x),
- dH₂O.

Postopek smo izvedli v skladu s priporočili proizvajalca. V 1.5 ml mikrocentrifugirkah smo najprej pripravili osnovno reakcijsko raztopino za vsak posamezni par oligonukleotidnih začetnikov. Sestava osnovne reakcijske raztopine za en vzorec je prikazana v preglednici 12. 17 μ l tako pripravljene raztopine smo dodali k 3 μ l ustrezne tarčne cDNA ter vse skupaj dobro premešali na vibracijskem mešalniku. Vzorce smo nato v 3 tehničnih ponovitvah (3 x 5 μ l) napipetirali v mikrotitersko ploščico s 384 luknjicami. Temperaturni program meritve na aparatu qPCR je bil enak kot v primeru meritve učinkovitosti oligonukleotidnih začetnikov (preglednica 10).

Preglednica 12: Priprava osnovne reakcijske raztopine za reakcijo qPCR s tehnologijo SybrGreen (en vzorec)

Table 12: Preparation of qPCR reaction solution using SybrGreen technology (one sample)

1 vzorec (3 tehnične ponovitve)	
Reagent	V (μ l)
dH ₂ O	4.60
SybrGreen Master Mix (2x)	10.00
začetni oligonukleotidi (2.5 μ M)	2.40
Σ	17

Meritve izražanja genov s qPCR mrežami StellarArray

qPCR mreže StellarArray (Lonza) omogočajo meritve izražanja tarčnih genov preko tehnologije SybrGreen. Meritev smo izvedli na aparaturi ABI 7900HT Sequence Detection System

(Applied BioSystems). Za eno mikrotitersko ploščico StellarArray s 384 luknjicami smo potrebovali 1500 ng cDNA.

Reagenti:

- mikrotiterska ploščica StellarArray z liofiliziranimi oligonukleotidnimi začetniki za gene signalne poti p53 (Priloga A) (Lonza, 00188319),
- SybrGreen Master Mix (2x),
- cDNA,
- dH₂O.

Postopek smo izvedli v skladu s priporočili proizvajalca. V 1.5 ml mikrocentrifugirki smo najprej pripravili osnovno reakcijsko raztopino za reakcijo qPCR. Njena sestava za en vzorec je prikazana v preglednici 13. 4013 μ l tako pripravljene raztopine smo dodali k 211 μ l tarčne cDNA in celotno reakcijsko zmes dobro premešali na vibracijskem mešalniku. V eno luknjico na mikrotiterski ploščici StellarArray smo prenesli po 10 μ l vzorca. Temperaturni program meritve na aparatu qPCR je prikazan v preglednici 14.

Preglednica 13: Priprava osnovne reakcijske raztopine za reakcijo qPCR na mikrotiterskih ploščicah StellarArray (1x ploščica s 384 luknjicami)

Table 13: Preparation of the qPCR reaction solution using StellarArray microtiter plates (1x 384-well plate)

Reagent	V (μ l)
SyberGreen Master Mix (2x)	2112
dH ₂ O	1996

Preglednica 14: Temperaturni profil verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR) za analizo mikrotiterskih ploščic StellarRay

Table 14: The temperature profile for the real-time polymerase chain reaction (qPCR) using StellarRay technology

št. ciklov	postopek	T (°C)	čas	merjenje fluorescence
1	pred-inkubacija	50	2 min	
1	aktivacija	95	10 min	
40	pomnoževanje	95	15 s	da
		60	1 min	
1	talilna krivulja	95	10 s	da
		55	1 min	
		95		
1	hlajenje	40	30 s	

Meritve izražanja genov s tehnologijo TaqMan

Reagenti:

- cDNA,
- fluorescenčno označena sonda in začetni oligonukleotidi (Applied BioSystems),
- Universal PCR Master Mix (Applied BioSystems, 4304437),
- dH₂O.

Postopek smo izvedli v skladu s priporočili proizvajalca. V 1.5 ml mikrocentrifugirkah smo najprej pripravili osnovno reakcijsko raztopino za vsak posamezni par oligonukleotidnih začetnikov. Sestava osnovne reakcijske raztopine za en vzorec je prikazana v preglednici 15. 19 µl tako pripravljene raztopine smo dodali k 1 µl ustrezne tarčne cDNA ter vse skupaj dobro premešali na vibracijskem mešalniku. Vzorce smo nato v 3 tehničnih ponovitvah (3 x 5 µl) napipetirali v mikrotitersko ploščico s 384 luknjicami. Temperaturni program meritve na aparatu qPCR je bil enak kot v primeru meritve učinkovitosti oligonukleotidnih začetnikov (preglednica 10).

Preglednica 15: Priprava osnovne reakcijske raztopine za reakcijo qPCR s tehnologijo TaqMan (en vzorec)

Table 15: Preparation of qPCR reaction solution using TaqMan technology (one sample)

Reagent	V (μ l)
dH ₂ O	4
universal PCR Master Mix (2x)	10
sonda	5
Σ	19

3.8.7 Izračun relativnih vrednosti izražanja genov ter njihova normalizacija

Vse rezultate, pridobljene z analizo s qPCR, smo normalizirali na enak način, ne glede na uporabljeno tehnologijo (SyberGreen, TaqMan oziroma ploščice StellARray). Za normalizacijo rezultatov izražanja genov smo izbrali referenčne gene, katerih izražanje se je v poskusnih pogojih izkazalo kot najbolj stabilno. Pri tem smo uporabili program geNorm. Vrednosti C_p smo preko učinkovitosti pomnoževanja E pretvorili v relativne vrednosti izražanja. Iz vrednosti za referenčne gene smo določili normalizacijski faktor (NF) ter z njim delili vrednosti izražanja za vse tarčne gene (Vandesompele in sod., 2002). NF smo določili preko enačb:

$$dA_{ij} = \frac{A_{ij}}{\max A_i} \quad (5)$$

V en. (5) i predstavlja posamezni referenčni gen, j posamezni vzorec, A_{ij} izražanje referenčnega gena v vzorcu j in dA_{ij} delež izražanja posameznega referenčnega gena v vzorcu j , glede na največjo vrednostjo izražanja tega gena med vsemi vzorci ($\max A_i$).

$$B_j = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \log(dA_{ij}) \quad (6)$$

V en. (6) i predstavlja posamezni referenčni gen, N število vseh referenčnih genov in B_j aritmetično sredino logaritmiranih vrednosti deležev izražanja referenčnih genov v vzorcu j .

$$C = \frac{1}{P} \sum_{j=1}^P B_j \quad (7)$$

V en. (7) j predstavlja posamezni vzorec, P število vseh vzorcev in C aritmetično sredino B_j .

$$NF_j = \frac{B_j}{C} \quad (8)$$

V en. (8) NF_j predstavlja normalizacijski faktor za vzorec j .

3.8.8 Statistična analiza podatkov

Statistično analizo smo izvedli s pomočjo programa Microsoft Office Excel 2007 ter programskega okolja R (programski paket limma). Razlike v izražanju genov med posameznimi vzorci smo določili s pomočjo dvosmerne ANOVE. Kot spremenljivki smo uporabili tretiranje z rHuEPO (brez, kratkotrajni, dolgotrajni) ter indukcijo s cDDP (različne koncentracije). Kot statistično značilno različne smo upoštevali le tiste rezultate s $p < 0.05$. Pri testiranju multiplih primerjav smo upoštevali tudi popravek FDR.

3.9 IZOLACIJA PROTEINOV IN ZAZNAVANJE TARČNIH PROTEINOV

3.9.1 Izolacija celokupnih proteinov iz celičnih linij

Reagenti:

- pufer PBS,
- pufer za lizo celic v sestavi:
 - 20 mM Tris, pH 7.5,
 - 150 mM NaCl,
 - 1 % NP-40,
 - 10 % glicerol,
 - 5 mM EDTA,
 - 1 mM Na_2VO_4^* ,
 - 10 mM β -glicerol fosfat*,
 - 50 mM NaF^* ,
 - 1 mM PMSF*,
 - proteazni inhibitorji Complete* (1 tableta/10 ml; Roche, 11 836 170 001).
- nanašalni pufer NuPAGE 4x (Invitrogen, NP0007)

Postopek:

Priprava vzorcev za analizo proteinov je opisana v točkah 3.4.3 in 3.5.4. Fosfatazne in proteazne inhibitorje (*) smo v pufer za lizo celic dodali tik pred uporabo. Na ploščice s celicami smo dodali 120 μ l pufera za lizo celic ter jih prenesli v 1.5 ml mikrocentrifugirke. Delali smo na ledu. Vzorce smo dobro premešali na vibracijskem mešalniku in jih 10 min inkubirali na ledu. Celični lizat smo nato 10 min centrifugirali na 4 °C in radialnem pospešku 12.000 obratov/min. Raztopino s proteini smo prenesli v svežo mikrocentrifugirko; 75 μ l te raztopine smo takoj zmešali s 25 μ l 4-kratnega nanašalnega pufera z dodanim β -merkaptetanolom ter jih inkubirali 10 min na 70 °C. Tako pripravljene proteinske vzorce smo do analize shranili na -20 °C. Preostanek celičnega lizata (45 μ l) smo uporabili za določitev koncentracije proteinov z metodo BCA (glej 3.9.2).

3.9.2 Določevanje koncentracije proteinov po metodi BCA

Reagenti:

- komplet reagentov BCA za detekcijo proteinov (Thermo Scientific, 23227),
- mikrotiterska ploščica s 96 luknjicami,
- inkubator.

Postopek smo izvedli v skladu s priporočili proizvajalca. Iz založne raztopine s koncentracijo proteinov 2 mg/ml smo najprej pripravili vrsto proteinskih standardov: 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 in 1.2 mg/ml. Po 25 μ l vsakega izmed standardov smo v dveh ponovitvah napipetirali na mikrotitersko ploščico. Pufer za lizo celic smo uporabili kot prazno kontrolo, preko katere smo določili absorbnost ozadja. Na mikrotitersko ploščico smo v dveh ponovitvah napipetirali tudi po 25 μ l proteinskih vzorcev. Sledila je priprava reakcijske raztopine; v razmerju 50:1 smo zmešali reagenta A in B iz kompleta reagentov BCA za detekcijo proteinov. Po 200 μ l tako pripravljene reakcijske raztopine smo dodali k standardom oziroma vzorcem, vse skupaj dobro premešali na rotacijskem mešalniku za mikrotiterske ploščice ter 30 min inkubirali na 37 °C. Po končani inkubaciji smo s spektrofotometrom EPOCH izmerili absorbanco pri 562 nm. S pomočjo umeritvene krivulje standardov smo določili koncentracijo proteinov v posameznem vzorcu.

3.9.3 Ločevanje proteinov na poliakrilamidenm gelu

Reagenti:

- akrilamid/bis-akrilamid, 40 % (Sigma, A2792),
- 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8,
- 1 M Tris-HCl, pH 6.8,
- raztopina NaDS, 10 % (w/v) ,
- polimerizacijski reagent APS, 10 % (w/v) ,
- polimerizacijski reagent TEMED,
- dH₂O.

Postopek:

Najprej smo po navodilih proizvajalca Bio-Rad sestavili stekelca za pripravo poliakrilamidnih gelov iz aparature Mini-PAGE. Sledila je priprava raztopine ločevalnega gela kot je prikazano v preglednici 16. Po dodatku polimerizacijskih reagentov smo 8 ml raztopine gela s serološko pipeto prenesli med stekelca. Na vrh gela smo dolili vodo in pustili gel na sobni temperaturi, da je polimeriziral. Potem smo pripravili še raztopino koncentracijskega gela, kot je opisano v preglednici 16. Iz površine koncentracijskega gela smo najprej odstranili plast vode, potem pa dolili koncentracijski gel. Dodali smo še glavniček za oblikovanje žepkov.

Preglednica 16: Sestava ločevalnega in koncentracijskega poliakrilamidnega gela za ločevanje proteinov

Table 16: Preparation of the stacking and the resolving polyacrilamid gels for the protein separation

Reagenti	10 % ločevalni gel (10 ml)	5 % koncentracijski gel (10 ml)
akrilamid/bis-akrilamid (40 %, 37.5:1)	2 ml	1.275 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2 ml	/
1 M Tris-HCl, pH 6.8	/	1.25 ml
10 % (w/v) NaDS	0.08 ml	0.1 ml
10 % (w/v) APS	0.08 ml	0.1 ml
TEMED	3.2 µl	10 µl
dH ₂ O	3.84 ml	7.275 ml

Stekelca s poliakrilamidnim gelom smo vstavili v aparaturo Mini-PAGE ter vanjo vlili pufer za ločevanje proteinov. Iz gela smo odstranili glavniček, žepke smo sprali ter vanje nanesli proteinske vzorce z dodanim nanašalnim pufrom. Na gel smo nanesli enako količino proteinov za vse vzorce; izračunali smo jo iz prej določene koncentracije. V enega izmed žepkov smo dodali še lestvico proteinskih standardov PageRuler z znano molekulsko maso (Fermentas, 26616). Aparaturo Mini-PAGE smo priključili na izvor napetosti; najprej smo pri konstantni napetosti vzorce koncentrirali 15 min na 50 V. Ko so vzorci prestopili iz koncentracijskega v ločevalni gel smo napetost povečali na 80 V in ločevanje proteinov izvajali 3 h. Potovanje vzorcev smo spremljali s pomočjo barvila, ki je sicer prisotno v nanašalnem pufru.

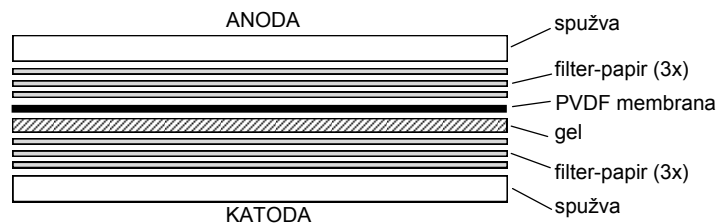
3.9.4 Metoda prenosa western: mokri prenos

Reagenti:

- poliakrilamidni gel (PAGE) z ločenimi proteini,
- membrana PVDF (Millipore, IPVH00010),
- metanol,
- prenašalni pufer,
- filter-papir.

Postopek:

Po končanem ločevanju proteinov smo PAGE najprej 15 min inkubirali v prenašalnem pufru. Med inkubacijo gela smo pripravili membrano PVDF; z 1 min inkubacijo v metanolu smo membrano aktivirali, jo nato sprali v vodi ter do prenosa inkubirali v prenašalnem pufru. V prenašalnem pufru smo namočili tudi filter-papir in spužve iz kompleta aparature Mini-PAGE. Nato smo sestavili "sendvič" za prenos proteinov iz gela na membrano, pri čemer smo pazili, da se med posamezne plasti niso ujeli mehurčki zraka, ki bi na tem mestu onemogočali prenos. Priprava sendviča je prikazana na sliki 17. Sestavili smo aparaturo Mini-PAGE, vanjo dodali vložek z ledom, dolili prenašalni pufer in priključili na izvor napetosti. Prenos smo izvajali 90 min na 4 °C pri konstantni napetosti 90 V.



Slika 17: Shema "sendviča" za prenos proteinov iz gela na membrano

Figure 17: Schematic representation of "the sandwich" used for the transfer of proteins from the gel to the membrane

3.9.5 Zaznava tarčnih proteinov

Reagenti:

- nemastno mleko v prahu (Bio-Rad),
- goveji serumski albumin (BSA; Sigma, A3294),
- pufer PBST - pufer PBS z dodatkom 0.1 % detergenta Tween 20 (Sigma, P7949),
- raztopina primarnih protiteles (preglednica 17),
- raztopina sekundarnih protiteles, konjugiranih s peroksidazo (preglednica 17),
- substrat za encim peroksidazo - ECL (Thermo Scientific, 32106).

Postopek:

Po končanem prenosu smo iz "sendviča" odstranili membrano ter jo 1 h inkubirali v 5 % raztopini nemastnega mleka v pufru PBST oziroma v 5 % raztopini BSA v pufru PBST. Slednjo smo uporabljali v primeru, ko smo delali s fosforiliranimi proteini. Z inkubacijo smo preprečili nespecifično vezavo primarnih protiteles na membrano. Nato smo membrano prenesli v 5 % raztopino mleka ali BSA v pufru PBST, v katero smo dodali primarna protitelesa v redčitvi kot jo predlaga proizvajalec (preglednica 17). V tej raztopini smo membrane inkubirali na 4 °C približno 16 h (preko noči). Sledilo je spiranje membran s pufrom PBST (3-krat po 10 min). Membrano smo nato prenesli v 5 % raztopino mleka ali BSA v PBST, v katero smo dodali sekundarna protitelesa, konjugirana z encimom peroksidazo. Membrane smo v tej raztopini inkubirali 1 h na sobni temperaturi. Po inkubaciji je sledilo ponovno spiranje s pufrom PBST. Za detekcijo proteinov smo na membrano nanесли substrat ECL (400 µl) ter s pomočjo kamere s fotopomnoževalko Las 4000 (Fuji Film) izvedli meritev luminiscence in

slikali membrano. Velikost proteinov smo določili glede na lego lise v primerjavi z lestvico proteinskih standardov z znano molekularno maso.

Preglednica 17: Seznam primarnih in sekundarnih protiteles, uporabljenih pri prenosu western

Table 17: The list of primary and secondary antibodies, used in the western blot analysis

protitelo	končna redčitev	specifičnost	proizvajalec	kataloška številka	tip protitelesa
STAT5	1:600	zajec	Cell Signaling	CST 9363	primarno
pSTAT5				CST 9351	
Akt				CST 9272	
pAkt				CST 9271	
ERK1/2	CST 9101				
pERK1/2	CST 9102				
EPOR (M-20)	1:1000		Santa Cruz	sc-697	sekundarno
β-aktin	1:400		Sigma	A2066	
anti-Rabbit-IgG	1:2000		Sigma	A0545	primarna
pH2AX (Ser139)	1:5000		Cell Signaling	CST 9718	
p21 Waf1/Cip1				CST 2847	
BAD				CST 9239	
pBAD (Ser112)				CST 5284	
PUMA				CST 4976	
pBCL2 (Ser70)				CST 2827	
ERα (F-10)	1:1000	miš	Santa Cruz	sc-8002	sekundarno
ERβ (H-150)	1:2000			sc-8974	
GP63	1:1000	zajec	Sigma	HPA027052	
anti-Rabbit-IgG	1:500			koza	Jackson ImmunoResearch
anti-Mouse-IgG		Laboratories Inc. ZDA	115-035-068		

3.9.6 Ocena količine proteinov

Jakost lise za tarčni protein, ki smo jo dobili s pomočjo fotopomnoževalke, smo delili z jakostjo lise za β -aktin. Slednjega smo v poskusu uporabili kot referenčni protein, katerega izražanje v celici je konstantno in nam je tako služil kot kontrola za enakomernost nanosa vzorcev. Pri analizah fosforilacije proteinov smo jakost lise za fosforilirano obliko tarčnega proteina delili z jakostjo lise za nefosforilirani protein. Dobljeno razmerje nam je služilo za primerjavo količine proteinov oziroma fosforilacije med posameznimi vzorci. Pri analizi smo si dodatno pomagali s programom ImageJ (razvit na Nacionalnem Inštitutu za Zdravje, Bethesda, MD, ZDA) (Abramoff in sod., 2004).

3.10 KLONIRANJE IN DELO Z BAKTERIJAMI

3.10.1 Priprava bakterijskega gojišča

Reagenti:

Sestava 1 liter gojišča je prikazana v preglednici 18.

Preglednica 18: Sestava LB gojišča za gojenje bakterijskih kultur

Table 18: The composition of the LB bacterial culture media

reagent	masa (g)
bakterijski pepton (Biolife, 4122592)	10
kvasni ekstrakt (Biolife, 412220)	5
NaCl	10
agar	15

Reagente iz preglednice 18 smo raztopili v 1 litru bidestilirane vode (bdH₂O). Za pripravo trdnega gojišča smo raztopini dodali tudi agar. Steklenice z raztopljenimi reagenti smo avtoklavirali, potem pa jih pustili, da so se ohladile na približno 50 °C. V gojišče smo dodali še antibiotik ampicilin; končna delovna koncentracija ampicilina je bila 100 µg/ml. Trdno gojišče smo pripravili tako, da smo še tekoče gojišče razlili v sterilne petri plošče ter jih potem pustili, da so se ohladile na sobno temperaturo in se strdile.

3.10.2 Pomnoževanje plazmidov

Reagenti:

- željeni plazmid (10-100 ng),
- kompetentne bakterijske celice DH5α,
- tekoče bakterijsko gojišče,
- petri plošče s trdnim bakterijskim gojiščem in dodanim ampicilinom.

Postopek:

Kompetentne celice smo na ledu počasi odmrznili. Potem smo jim dodali 1-4 µl ohlajenega plazmida (10-100 ng), vse skupaj dobro premešali in inkubirali na ledu 15 min. Izvedli

smo toplotni šok: mikrocentrifugirko smo za 45 sekund postavili v termoblok na 42 °C ter jih takoj za tem postavili nazaj na led za 30 min. Dodali smo ogreto tekočo bakterijsko gojišče LB ter jih 1 h inkubirali na 37 °C. Med inkubacijo smo bakterije stresali in jih potem razmazali na petri plošče s trdnim bakterijskim gojiščem z dodanim ampicilinom (seleksijski marker).

3.10.3 Izolacija plazmidne DNA

Reagenti:

- komplet za izolacijo plazmidov - GenElute HP Plasmid MiniPrep kit (Sigma, NA0150)

Postopek smo izvedli v skladu z navodili proizvajalca. Iz prekonočne kulture bakterij smo odvzeli 5 ml, bakterije posedli s centrifugiranjem pri radialnem pospešku 12.000 g za 1 min ter odstranili gojišče. S priloženimi pufri smo bakterije resuspendirali, jih lizirali in nevtralizirali. Nevtralizirani bakterijski lizat smo ponovno centrifugirali pri radialnem pospešku 12.000 g za 10 min. Usedlino smo zavrgli, iz supernatanta pa smo po dodatku natrijevega acetata, izopropanola ter etanola izolirali plazmidno DNA. Količino in čistost plazmida smo preverili na spektrofotometru NanoDrop (Thermo Scientific).

3.10.4 Prekloniranje gena za *EPOR* v ekspresijski plazmid pcDNA3.1/V5-His TOPO

Reagenti:

- plazmid pcDNA3.1(+) *EPOR*wt z zapisom za divji tip gena za eritropoetinski receptor (*EPOR*),
- plazmid pcDNA3.1/V5-His TOPO (Invitrogen, K4899-01)
- začetni oligonukleotidi (Preglednica 19),
- kompetentne celice DH5 α ,
- encim *Taq* polimeraza (Fermentas, EP0402),
- encim T4 DNA ligaza (Promega, M1801),
- restrikcijski encim *Xho*I (Promega, R616A),
- lestvica DNA standardov O'GeneRuler (1 kbp) (Fermentas, SM1163).

Postopek:

Plazmid pcDNA3.1(+) *EPOR*wt smo dobili od J. Y. Jeong iz LCMB/BIDMC, Harvard Medical School iz Bostona. Plazmid smo najprej transformirali v bakterijski sev DH5 α ter ga nagojili. Z metodo PCR smo preko ustreznih začetnih oligonukleotidov pomnožili zaporedje gena *EPOR*. Temperaturni program pomnoževanja s PCR je prikazan v preglednici 20. Produkta reakcije PCR smo ločili s pomočjo agarozne gelske elektroforeze, jih izrezali iz gela, očistili in dodali k pcDNA3.1/V5-His TOPO. Zlepljanje koncev vektorja smo izvedli z encimom T4 DNA ligazo v skladu z navodili proizvajalca. Tako pripravljen vektor smo namnožili v kompetentnem bakterijskem sevu DH5 α in ga izolirali. Uspešnost vgraditve fragmenta v vektor in njegovo ustrezno orientacijo smo preverili s pomočjo restrikcijskih encimov; po ločitvi na agaroznem gelu smo ocenili velikosti fragmentov ter preko njih sklepali na orientacijo fragmentov v vektorju.

Preglednica 19: Zaporedje začetnih nukleotidov, uporabljenih pri prekloniranju gena *EPOR* (SM) smiselna; (PSM) protismiselna orientacija

Table 19: Primer sequence used for the cloning of *EPOR* gene (SM) sense; (PMS) antisense orientation

gen	ID gena	orientacija	zaporedje začetnega oligonukleotida (5'-3')	velikost produkta
<i>EPOR</i>	2057	SM	ATCATGGACCACCTCGGGGCGT	1526 bp
		PMS	AGAGCAAGCCACATAGCTGGG	

Preglednica 20: Temperaturni program verižne reakcije s polimerazo (PCR) za pomnoževanje gena *EPOR* iz plazmidne DNA

Table 20: The temperature profile of the polymerase chain reaction (PCR) to amplify *EPOR* gene from the plasmid DNA

št. ciklov	T (°C)	čas
1	95	2 min
35	95	30 s
	71.4	30 s
	72	1 min
1	72	10 min

3.10.5 Transfekcije

Reagenti:

- transfekcijski reagent DOTAP (Roche, 06365752001),
- transfekcijski reagent X-tremeGENE HP (Roche, 06365752001),
- gojišči EMEM in RPMI 1640.

Za transfekcije smo uporabili celice MCF-7 in T-47D. Celice smo nacepili na ploščice za gojenje celičnih kultur s 6 luknjicami ter počakali, da so prerasle 80 % površine (t.i. 80 % konfluentnost) ter izvedli transfekcijo s plazmidom pcDNA3.1(+) *EPOR*wt oziroma pcDNA3.1/V5-His *EPOR*wt. Transfekcije s plazmidom pcDNA3.1(+) *EPOR*wt smo naredili z reagentom DOTAP, za plazmid pcDNA3.1/V5-His *EPOR*wt smo uporabili transfekcijski reagent X-tremeGENE HP.

Transfekcijski reagent DOTAP

Željeno količino plazmidov (2.5 µg) smo zmešali s pufrom HBS in reagentom DOTAP (15 µl) v razmerju 1:6 ter zmes inkubirali 10 do 15 min na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo zmesi dodali še 6 mL rastnega gojišča, pri čemer smo pazili, da nismo presegle razmerja 30 µl reagenta DOTAP na 1 ml rastnega medija. Tako pripravljeno mešanico smo dodali na celice za 6 h ter jo po navedenem času zamenjali z osnovnim rastnim gojiščem. Ko so celice dosegle 100 % konfluentnost, smo jih precepili v nove ploščice. V gojišče smo jim dodali antibiotik geneticin (G418), ki deluje kot selekcijski marker. Na plazmidu pcDNA3.1(+) *EPOR*wt je namreč zapis za rezistenco na G418. Na takšen način smo izvedli selekcijo klonov celic z dodatnimi zapisi za *EPOR*.

Transfekcijski reagent X-tremeGENE HP

Željeno količino plazmidov (2 µg) smo zmešali z brez serumskim medijem in transfekcijskim reagentom X-tremeGENE HP (6 µl) v razmerju 1:3. Tako pripravljeno mešanico smo inkubirali 15 min na sobni temperaturi ter jo po končani inkubaciji počasi dodali celicam v rastno gojišče. Celice smo v prisotnost kompleksov DNA:X-tremeGENE HP gojili še 48 h. Celice smo nato precepili, pri čemer smo za nacepljanje uporabili medij z dodanim G418. Na plazmidu pcDNA3.1/V5-His *EPOR*wt je zapis za odpornost na G418. Na takšen način smo izvedli selekcijo klonov celic z dodatnimi zapisi za *EPOR*.

3.10.6 Selekcija klonov celic s povečanim izražanjem EPOR

Reagenti:

- ploščice za gojenje celičnih kultur s 96 luknjicami,
- antibiotik geneticin (G418).

Po transfekcijah smo celice gojili v gojišču z dodanim G418; 400 $\mu\text{g/ml}$ pri MCF-7 in 300 $\mu\text{g/ml}$ pri T-47D. Celice, ki plazmida niso vključile v svoj genom, so zaradi neodpornosti ne G418 začele odmirati. Postopno so se v populaciji celic izoblikovale celične kolonije, ki so normalno rasle tudi v prisotnosti G418, torej so sprejele dodani plazmid. Dodatno selekcijo klonov z bolj ali manj povečanim izražanjem EPOR smo izvedli po metodi klonalnega razrasta ene celice (angl. single cell cloning). Celice smo po tripsinizaciji razredčili do koncentracije 14 celic/ml ter jih nacepili na ploščice. Pri nacepljanju smo uporabili osnovno rastno gojišče z dodanim G418. Tako nizko koncentracijo celic smo uporabili zato, da smo na eno luknjico na ploščici imeli le 1 celico. Celice smo gojili približno 14 dni dokler niso postale konfluentne. Uspešnost transfekcije oziroma nivo izražanja EPOR smo preverili z metodama qPCR (genski nivo) in prenosom western (proteinski nivo).

3.10.7 Identifikacija klonov s povišanim izražanjem EPOR

Po selekciji klonov z metodo klonalnega razrasta ene celice smo identificirali klone s povišanim izražanjem EPOR. Z metodo qPCR smo preverili izražanje *EPOR* na nivoju mRNA. Pri qPCR analizi smo uporabili oligonukleotidne začetnike *EPOR*, opisane v preglednici 19. Princip izvedbe poskusa qPCR je opisan v 3.5.3. Izražanje EPOR smo preverili tudi na nivoju proteina z metodo prenosa western. Za detekcijo EPOR smo uporabili protitelesa anti-EPOR, opisana v preglednici 17. Princip metode je opisan v 3.9.4.

3.11 ANALIZA ODZIVNOSTI CELIC NA TRETIRANJE S TAMOKSIFENOM

Pri celičnih linijah RAMA 37, RAMA 37-28, T-47D in T-47D^{EPOR+} (celice T-47D s povišanim izražanjem EPOR) smo analizirali vpliv povišanega izražanja EPOR na odzivnost celic na tretiranje s tamoksifenom (TAM). Analizo celične viabilnosti po tretiranju s TAM smo opravili na aparatu XCELLigence (Roche), princip metode pa je opisan v točki 3.2.3.

Reagenti:

- ploščice za gojenje celičnih kultur s 16 luknjicami in dnom prekritim s platino (Roche),
- (Z)-4-hidroksi tamoksifen (Sigma, H7904),
- aparat XCELLigence (Roche).

Postopek:

Celice smo nacepili v ploščice v ustrezni koncentraciji (preglednica 21) in jih v kulturi pustili 48 h, da so se pritrdile. Naslednji dan smo celice tretirali s 4-hidroksi tamoksifenom (4-OH-TAM) v različnih koncentracijah (150, 100, 75, 50, 37 in 25 μ M) ter nadaljnjih 5 dni spremljali celično rast. Viabilnost celic z visokim izražanjem EPOR smo po tretiranju s 4-OH-TAM primerjali z viabilnostjo izvornih celic, brez visokega izražanja EPOR ter narisali krivulje preživetja. Založno raztopino 4-OH-TAM (25.8 mM) smo pripravili z raztapljanjem v etanolu. V poskus smo zato vključili tudi celice, tretirane z etanolom (končna koncentracija 2.5 %), ki so nam tako služile kot kontrola za vpliv topila na celično rast.

Preglednica 21: Koncentracija celic za analizo viabilnosti po tretiranju s TAM

Table 21: Cell concentrations used in the viability studies after TAM exposure

celična linija	koncentracija celic
RAMA 37	1250 celic/ml
RAMA 37-28	
T-47D	1 x 10 ⁵ celic/ml
T-47D^{EPOR+}	

3.12 ANALIZA IZRAŽANJA PROTEINOV ESR, PGR IN GPER PRI CELIČNIH LINIJAH RAMA 37 IN RAMA 37-28

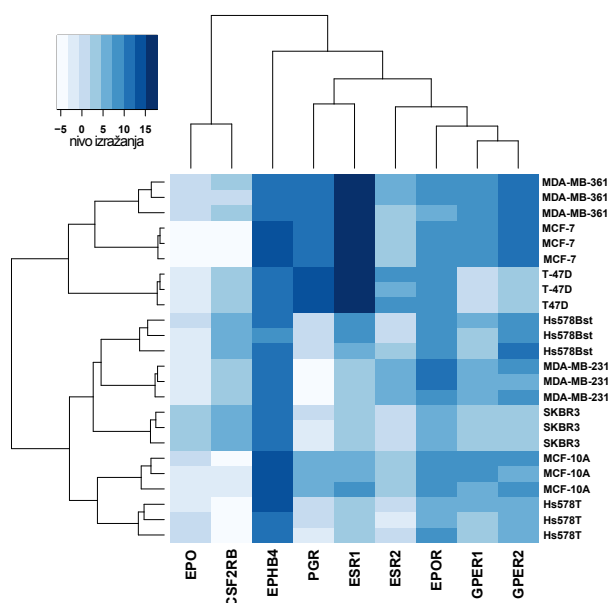
Pri celičnih linijah RAMA 37 in RAMA 37-28 smo z metodo prenosa western preverili izražanje proteinov ESR, PGR in GPER. Princip metode je opisan v točki 3.9.4. Za detekcijo proteinov smo uporabili protitelesa (ESR1, ESR2 in GPER), opisana v preglednici 17.

4 REZULTATI

4.1 IZRAŽANJE RECEPTORJEV ZA RASTNE FAKTORJE

V celičnih linijah MCF-7, T-47D, MDA-MB-361, MDA-MB-231, SKBR3, Hs578T, Hs578-Bst in MCF-10A smo na genskem nivoju analizirali izražanje receptorjev za estrogene (*ESR*) in progesteron (*PGR*), *EPOR*, membransko vezan receptor za estrogene (*GPER*), receptor za efrin 4 (*EPHB4*) in receptor β (*CSF2RB*). Dodatno smo preverili tudi izražanje gena *EPO*. Za normalizacijo rezultatov smo uporabili referenčni gen *PPIA*, ki se je v danih pogojih izkazal za najbolj stabilnega.

Med izbranimi celičnimi linijami obstajajo znatne razlike v izražanju genov za *ESR1*, *ESR2*, *PGR*, *GPER* in *CSF2RB* (sliki 18 in 19).

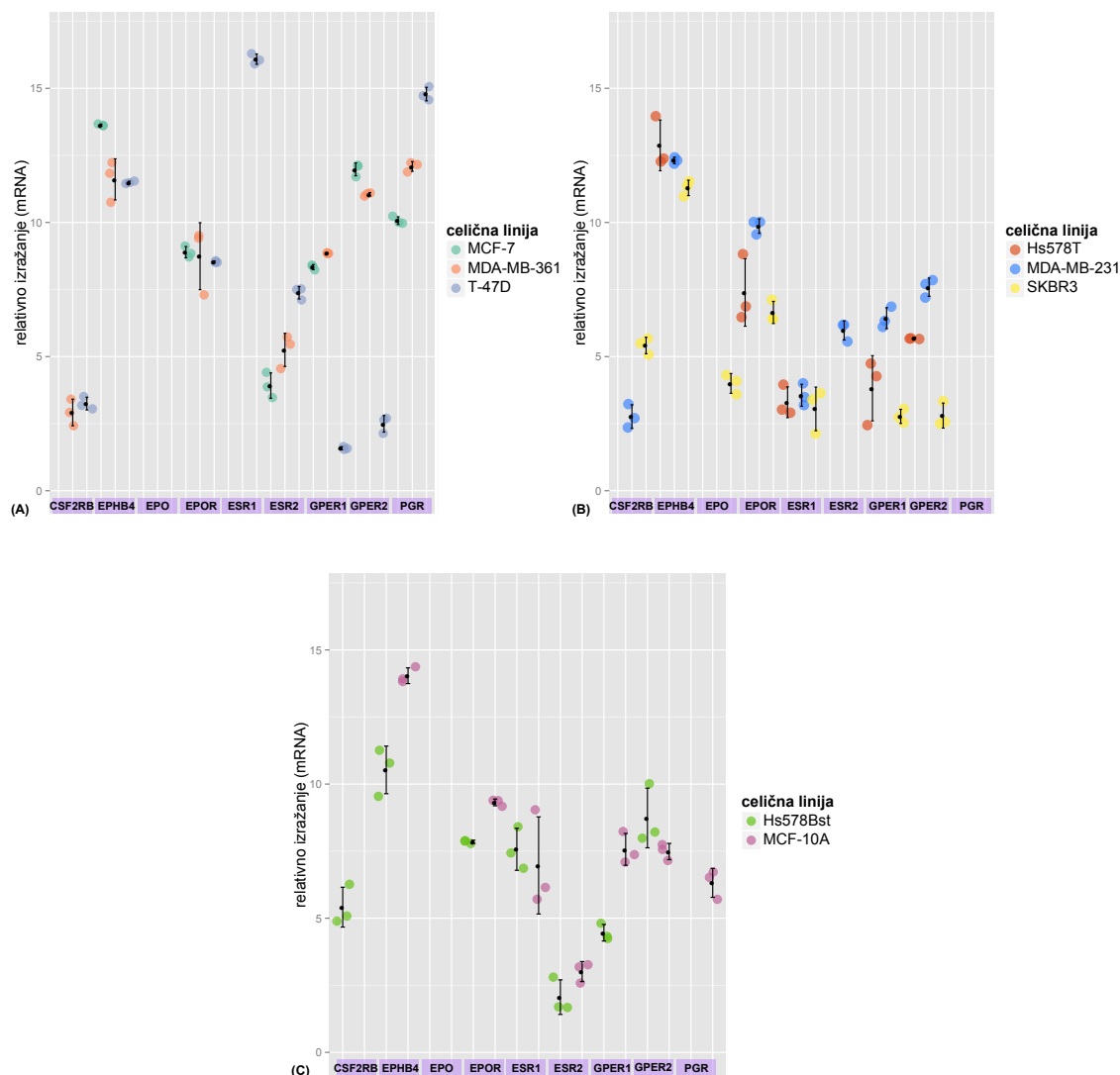


Slika 18: Diagram Heatmap

Diagram prikazuje vrednosti za izražanje genov *EPO*, *CSF2RB*, *HPHB4*, *PGR*, *ESR1*, *ESR2*, *EPOR* ter *GPER* (izooblike *GPER1* in *GPER2*) v celičnih linijah MDA-MB-361, MCF-7, T-47D, Hs578Bst, MDA-MB-231, SKBR3, MCF-10A in Hs578T. Barvna lestvica prikazuje nivo izražanja, od nizkega nivoja izražanja (bela) do visokega izražanja (temno modra).

Figure 18: Heatmap

Figure represents expression values of *EPO*, *CSF2RB*, *HPHB4*, *PGR*, *ESR1*, *ESR2*, *EPOR* and *GPER* (isoforms *GPER1* and *GPER2*) genes in the MDA-MB-361, MCF-7, T-47D, Hs578Bst, MDA-MB-231, SKBR3, MCF-10A and Hs578T cell lines. Colour legend represents the level of expression with white colour representing the lowest level and dark blue representing the highest level of expression.

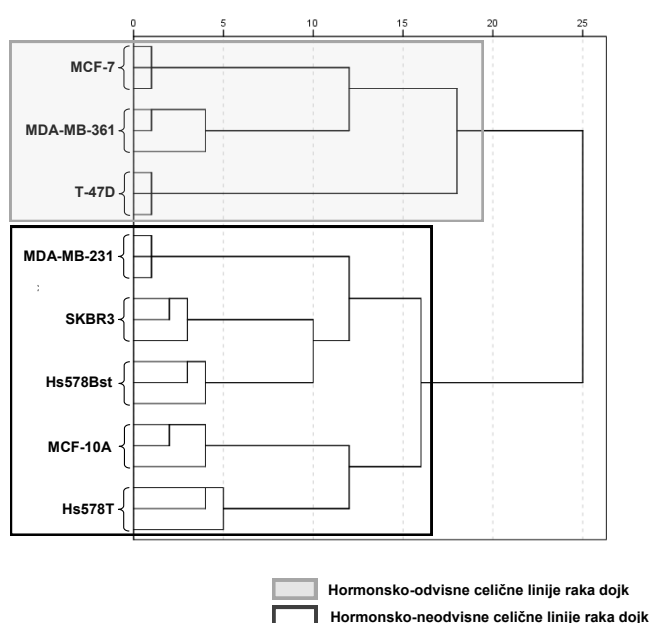


Slika 19: Izražanje genov za *EPOR*, *EPHB4*, *CSF2RB*, *ESR1*, *ESR2*, *PGR*, *GPER* (izooblike *GPER1* in *GPER2*) in *EPO* v celičnih linijah raka dojke
(A) Celične linije MCF-7, MDA-MB-361 in T-47D; (B) celične linije Hs578T, MDA-MB-231 in SKBR3; (C) celični liniji Hs578Bst in MCF-10A. Napaka je predstavljena v enotah standardne napake (SD).

Figure 19: Expression of *EPOR*, *EPHB4*, *CSF2RB*, *ESR1*, *ESR2*, *PGR*, *GPER* (isoforms *GPER1* and *GPER2*) and *EPO* genes in the cohort of analyzed breast cancer cell lines
(A) MCF-7, MDA-MB-361 and T-47D cell lines; (B) Hs578T, MDA-MB-231 and SKBR3 cell lines; (C) Hs578Bst and MCF-10A cell lines. Error bars represent standard deviation (SD).

Celične linije MCF-7, MDA-MB-361 in T-47D izražajo receptorje *ESR1*, *ESR2* in *PGR*, torej predstavljajo hormonsko-odvisno obliko raka dojke. Poleg tega, celice MCF-7 in MDA-MB-361 visoko izražajo tudi *GPER*, medtem ko je izražanje tega receptorja v celicah T-47D nizko. Vse ostale celične linije kažejo določeno mero hormonske-neodvisnosti. *EPOR* in *EPHB4* sta izražena v vseh celičnih linijah. Nivo izražanja *EPHB4* je precej višji od *EPOR*,

sicer pa je njuno izražanje med celičnimi linijami primerljivo. Izražanje gena *EPO* smo potrdili le v celični liniji SKBR3. Na podlagi rezultatov analize izražanja genov smo izvedli analizo hierarhičnosti, pri čemer so se izbrane celične linije ločile v dve glavni gruči, ki predstavljata hormonsko-odvisne in hormonsko-neodvisne celične linije (slika 20). Znotraj gruči so se celice še dodatne razdelile na 5 podskupin, ki predstavljajo tipe raka dojk z delno hormonsko neodvisnostjo, saj celice ne izražajo določenih receptorjev.



Slika 20: Hierarhično gručenje celičnih linij

Pri gručenju smo uporabili podatke iz analize izražanja genov za *EPOR*, *EPHB4*, *CSF2RB*, *ESR1*, *ESR2*, *PGR*, *GPOR* (izooblike *GPOR1* in *GPOR2*) in *EPO*. Rezultat gručenja sta dve glavni gruči, ki predstavljata hormonsko-odvisne (sivi okvir) in hormonsko-neodvisne (črni okvir) celične linije. Posamezna celična linija je predstavljena s tremi vzorci. Za izračun razdalj med vzorci smo uporabili Evklidovo razdaljo.

Figure 20: Hierarchical clustering of cell lines

Data for the expression of *EPOR*, *EPHB4*, *CSF2RB*, *ESR1*, *ESR2*, *PGR*, *GPOR* (isoforms *GPOR1* and *GPOR2*) and *EPO* genes were used to perform clustering analysis. Depending on the gene expression cells cluster in the two main cluster, representing hormonally-dependent (grey frame) and hormonally-independent (black frame) cell lines. The expression of 3 samples per cell line is shown. Dendrogram was constructed using Euclidian distance.

Na podlagi rezultatov izražanja genov smo naredili korelacijsko analizo in izračunali Pearsonove korelacijske koeficiente (r) za izražanje med posameznimi geni. Za izražanje genov iz nabora smo potrdili več korelacij, ki so prikazane v preglednici 22.

Preglednica 22: Pearsonovi korelacijski koeficienti (r), izračunani za izražanje receptorjev v celičnih linijah (N) je število vzorcev, uporabljenih za izračun r ; (*) statistična značilnost za napako Tipa I $\alpha < 0.05$; (°) mejna statistična značilnost za napako Tipa I $0.05 < \alpha < 0.08$.

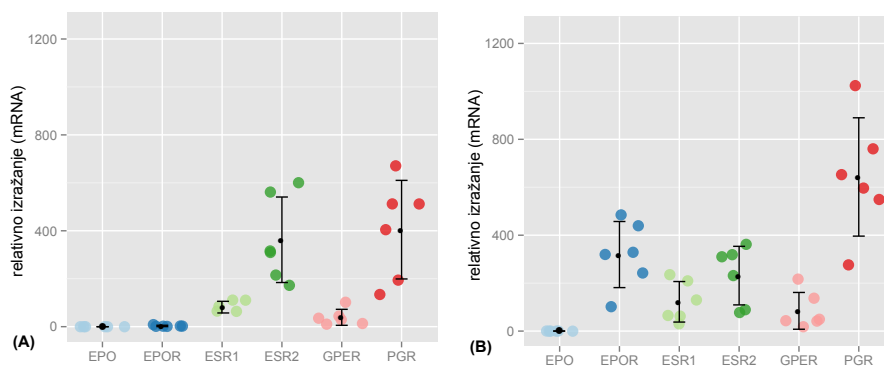
Figure 22: Pearson correlation coefficients (r) for the receptor expression in the analyzed cell lines (N) sample number; (*) statistical significance for Type 1 error $\alpha = 0.05$; (°) marginal statistical significance for Type 1 error $0.05 < \alpha < 0.08$.

			geni							
			<i>EPOR</i>	<i>EPHB4</i>	<i>CSF2RB</i>	<i>ESR1</i>	<i>ESR2</i>	<i>PGR</i>	<i>GPER1</i>	<i>GPER2</i>
geni	<i>EPOR</i>	r	1	0.385°	-0.708*	0.275	0.276	-0.404	0.549*	0.426*
		p value		0.064	0.003	0.194	0.268	0.193	0.006	0.038
		N	24	24	15	24	18	12	24	24
	<i>EPHB4</i>	r		1	-0.541*	0.014	-0.144	-0.871*	0.468*	0.285
		p value			0.037	0.949	0.569	0.000	0.021	0.177
		N		24	15	24	18	12	24	24
	<i>CSF2RB</i>	r			1	-0.277	-0.742*	0.465	-0.195	-0.039
		p value				0.317	0.006	0.352	0.486	0.891
		N			15	15	12	6	15	15
	<i>ESR1</i>	r				1	0.301	0.754*	0.361	0.443*
		p value					0.224	0.005	0.083	0.03
		N				24	18	12	24	24
	<i>ESR2</i>	r					1	0.945*	-0.356	-0.499*
		p value						0.000	0.148	0.035
		N					18	12	18	18
	<i>PGR</i>	r						1	-0.539°	-0.368
		p value							0.071	0.239
		N						12	12	12
	<i>GPER1</i>	r							1	0.884*
		p value								0.000
		N							24	24
	<i>GPER2</i>	r								1
		p value								
		N								24

Glede na rezultate gručanja in korelacijske analize smo izbrali 5 modelnih celičnih linij, na katerih smo nadalje analizirali vlogo rHuEPO. Celični liniji MCF-7 in T-47D smo izbrali kot model hormonsko-odvisne oblike raka dojke. Pri obeh celičnih linijah smo pokazali visoko izražanje *ESR* in *PGR*, pomembne razlike pa se pojavijo v izražanju *GPER*. V celicah MCF-7 je izražanje tega proteina visoko, medtem ko je v celicah T-47D nizko. Celice MDA-MB-231 z izraženim receptorjem za estrogen, a brez *PGR* smo izbrali kot model delne hormonske-odvisnosti, SKBR3 in Hs578T pa predstavljata hormonsko-neodvisno obliko raka dojke. Dodatni razlog za izbor celične linije SKBR3 je bil endogeno izražanje *EPO*.

4.1.1 Izražanje genov *EPOR*, *EPO*, *ESR*, *PGR* in *GPER* v celičnih linijah RAMA 37 in RAMA 37-28

V celičnih linijah RAMA 37 in RAMA 37-28 smo preverili nivo izražanja genov za *EPOR*, *EPO*, *ESR*, *PGR* in *GPER* (slika 21). Z analizo smo želeli potrditi, da so celice RAMA 37-28 zares klon RAMA 37 s povišanjem izražanjem *EPOR*. Izražanje genov za *ESR*, *PGR* in *GPER* smo preverili zaradi sledečih poskusov s tamoksifenom (TAM). Celični odgovor na tretiranje s TAM lahko analiziramo le pri celicah z izraženimi *ESR*.



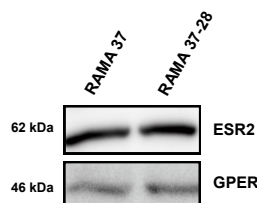
Slika 21: Izražanje genov *EPOR*, *EPO*, *ESR*, *PGR* in *GPER* v celičnih linijah RAMA 37 in RAMA 37-28
(A) celična linija RAMA 37; (B) celična linija RAMA 37-28.

Figure 21: Expression of *EPOR*, *EPO*, *ESR*, *PGR* and *GPER* genes in RAMA 37 and RAMA 37-28 cell lines
(A) RAMA 37 cells; (B) RAMA 37-28 cells.

Analiza izražanja *EPOR* je potrdila višje izražanje tega gena pri celični liniji RAMA 37-28. Izražanje v celicah RAMA 37-28 je približno 350-krat višje v primerjavi z izražanjem v RAMA 37. Obe celični liniji izražata *ESR*, *PGR* in *GPER*, izražanja *EPO* pa nismo potrdili v nobeni izmed obeh celičnih linij.

4.1.2 Izražanje proteinov ESR in GPER v celičnih linijah RAMA 37 in RAMA 37-28

V celičnih linijah RAMA 37 in RAMA 37-28 smo preverili izražanje ESR in GPER tudi na proteinskem nivoju. V obeh celičnih linijah smo uspeli potrditi izražanje ESR2 in GPER, medtem ko nam izražanja ESR1 ni uspelo potrditi (slika 22).

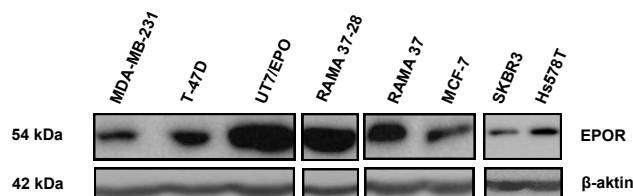


Slika 22: Izražanje proteinov ESR2 in GPER v celičnih linijah RAMA 37 in RAMA 37-28
Analiza je bila narejena v sodelovanju z dr. N. Hevir in skupino prof. dr. T. Lanišnik-Rižner.

Figure 22: ESR2 and GPER protein expression in RAMA 37 and RAMA 37-28 cell lines
The analysis was performed in the collaboration with dr. N. Hevir and prof. dr. T. Lanišnik-Rižner.

4.1.3 Izražanje EPOR na proteinskem nivoju

Izražanje EPOR v celičnih linijah RAMA 37, RAMA 37-28, MCF-7, T-47D, MDA-MB-231, SKBR3 in Hs578T smo preverili tudi na nivoju proteinov (slika 23).



Slika 23: Izražanje proteina EPOR
V celičnih linijah RAMA 37, RAMA 37-28, MCF-7, T-47D, MDA-MB-231, SKBR3 in Hs578T smo preverili izražanje proteina EPOR. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili celično linijo UT7/EPO, ki je od EPO odvisna celična linija.

EPOR protein expression

The RAMA 37, RAMA 37-28, MCF-7, T-47D, MDA-MB-231, SKBR3 and Hs578T cell lines were analysed for the expression of EPOR protein. The EPO-dependent UT7/EPO cells were used as positive controls for EPOR expression.

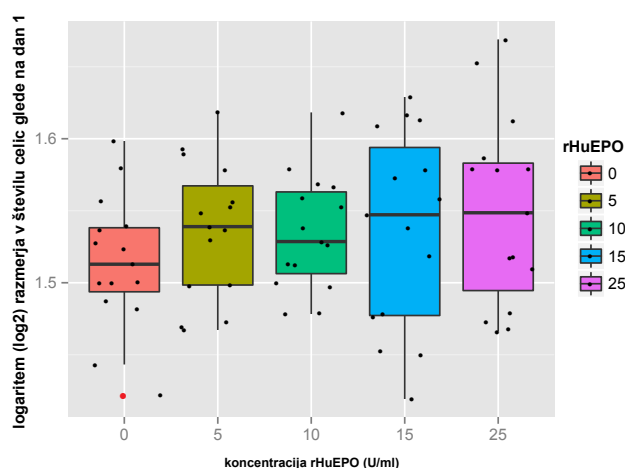
Z metodo prenosa western smo zaznali signal pri 54 kDa, za katerega predpostavljamo, da je EPOR.

4.2 VPLIV TRETIRANJA Z rHuEPO NA PROLIFERACIJO IN KLONIGENOST CELIC RAKA DOJK

4.2.1 Vpliv rHuEPO na celično proliferacijo

Primerjava rezultatov direktnega štetja celic in posredne določitve s kalorimetrično meritvijo (reagent MTT oz. WST-1) kaže na primerljivost obeh metod. Standardna napaka je bila nekoliko večja v primeru direktnega štetja celic z avtomatskim števcem ADAM, zato smo se odločili za analizo z uporabo reagentov MTT oziroma WST-1.

Najprej smo testirali odzivnost celic na tretiranje z rHuEPO. Celice (7500 celic/ml) smo izpostavili različnim koncentracijam rHuEPO (0, 5, 10, 15 in 25 U/ml) in po 24 h določilo njihovo število. Izračunali smo prirastek celic glede na točko nacepitve. Slednji je bil približno enak, ne glede na uporabljen koncentracijo rHuEPO in je ostal v mejah standardne napake (slika 24). Za nadaljnje delo smo izbrali 2 koncentraciji rHuEPO, 5 in 25 U/ml.

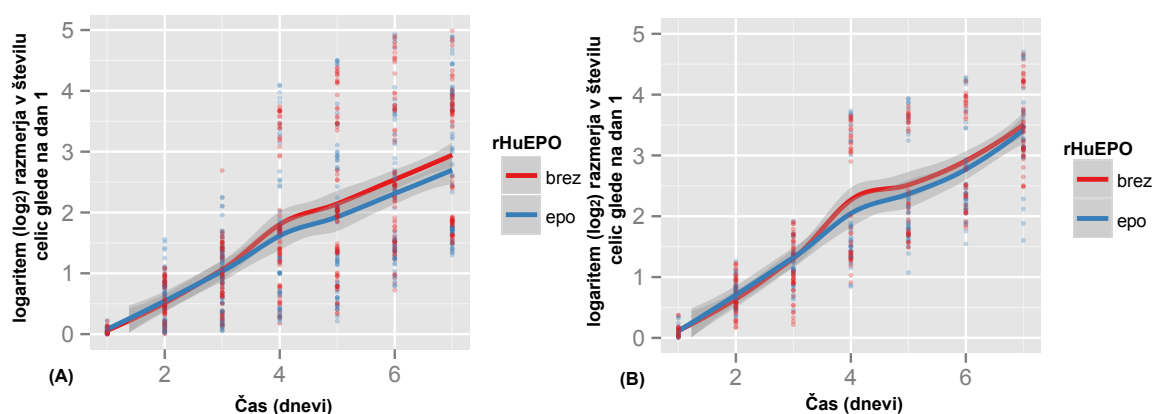


Slika 24: Določitev delovne koncentracije rHuEPO; titracijska krivulja za celično linijo MCF-7

Figure 24: Establishing working concentration for rHuEPO: titration curve for MCF-7 cell line

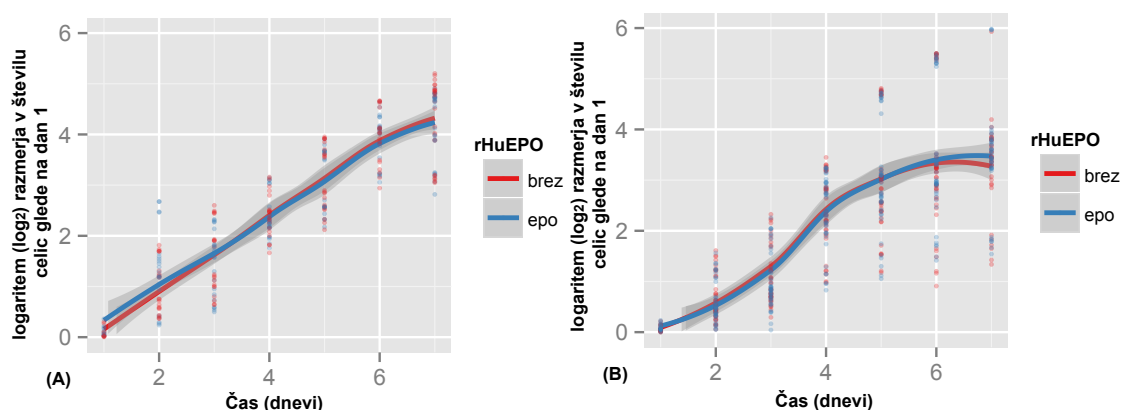
Celične linije MCF-7, T-47D, MDA-MB-231, SKBR3, Hs578T, RAMA 37 in RAMA 37-28 smo izpostavili rHuEPO (5 in 25 U/ml) ter določili njegov vpliv na proliferacijski potencial celic. Celični liniji RAMA 37 in RAMA 37-28 smo v študijo vključili naknadno; celice so sicer podganjega izvora, v analizo pa smo jih vključili zato, ker RAMA 37-28 prekomerno izražajo EPOR. Pridobljene so bile s transfekcijo divjega tipa gena *EPOR* v genom izvirne celične linije RAMA 37. Za gojenje celic smo uporabili rastna gojišča z različnimi koncentracijami dodanega FBS (1 ali 10 %), saj smo želeli ovrednotiti morebitni sinergistični učinek rHuEPO in rastnih faktorjev iz dodanega FBS. Celice smo nacepili na ploščice za gojenje celičnih kultur na način kot je prikazan na sliki 12. Celično proliferacijo smo merili 7

zaporednih dni. Vse poskuse smo ponovili vsaj 3-krat. Rezultati analize celične proliferacije za 5 U/ml rHuEPO so prikazani na slikah 25, 26, 27, 28, 30, 29 in 31. Celična proliferacija po izpostavitvi na 25 U/ml rHuEPO je bila primerljiva tisti pri 5 U/ml (rezultati niso prikazani). V primeru celične linije T-47D (slika 26) smo analizo proliferacije izvedli na aparatu XCELLigence, ki omogoča spremljanje celične rasti v realnem času. Analizo smo izvedli 2-krat.



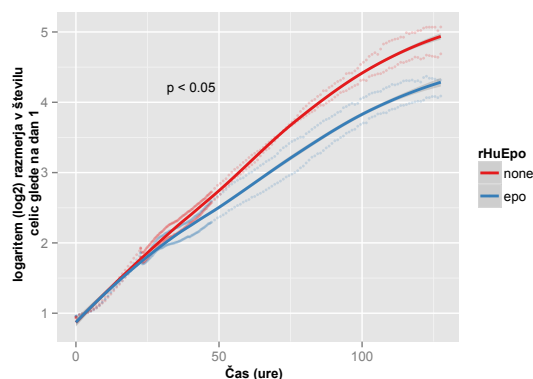
Slika 25: Proliferacija celic MCF-7 v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO (5 U/ml)
Proliferacija celic v rastnem gojišču z (A) 10 % in (B) 1 % FBS. Napaka meritve je prikazana v enotah standardne napake (SD).

Figure 25: MCF-7 cell proliferation in response to rHuEPO (5 U/ml) treatment
Growth media, supplemented with (A) 10 % or (B) 1 % FBS. Error bars represent standard deviations (SD) in fold change ratios.



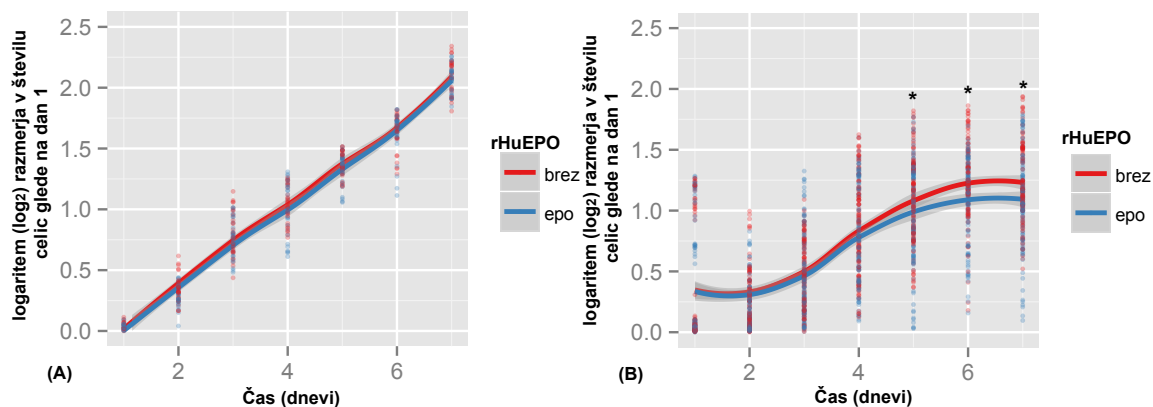
Slika 27: Proliferacija celic MDA-MB-231 v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO (5 U/ml)
Proliferacija celic v rastnem gojišču z (A) 10 % in (B) 1 % FBS. Napaka meritve je prikazana v enotah standardne napake (SD).

Figure 27: MDA-MB-231 cell proliferation in response to rHuEPO (5U/ml) treatment
Growth media, supplemented with (A) 10 % or (B) 1 % FBS. Error bars represent standard deviations (SD) in fold change ratios.



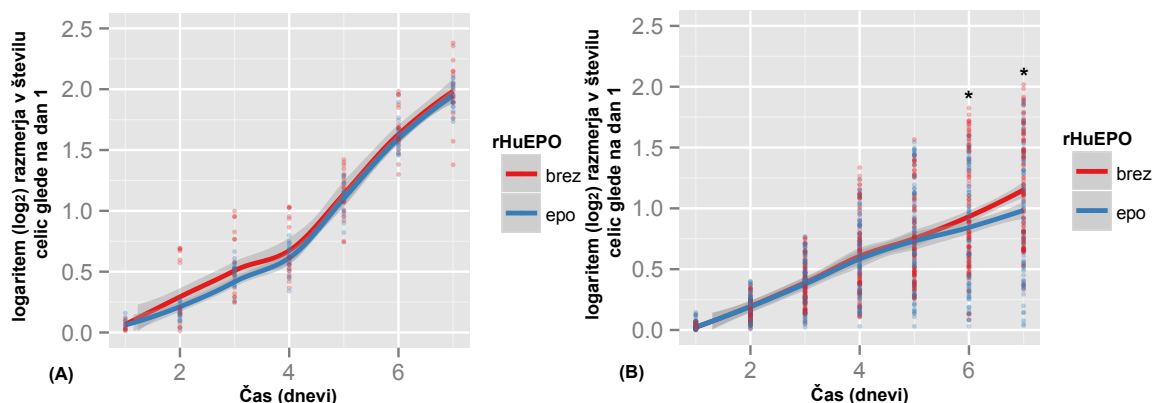
Slika 26: Proliferacija celic T-47D v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO (5 U/ml)
Proliferacija celic v rastnem gojišču z 10 % FBS. Na sliki sta prikazana dva neodvisna poskusa (krivulji svetlejšje barve); polna črta (močnejše barve) predstavlja povprečje obeh meritev.

Figure 26: T-47D cell proliferation in response to rHuEPO (5 U/ml) treatment
Growth media, supplemented with 10 % FBS. Figure represents two independent measurements, each of them is represented with a dotted line (light color). Full line (dark color) represents the average of two experiments.



Slika 28: Proliferacija celic Hs578T v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO (5 U/ml)
Proliferacija celic v rastnem gojišču z (A) 10 % in (B) 1 % FBS. Napaka meritve je prikazana v enotah standardne napake (SD). (*) statistično značilna razlika $p < 0.05$.

Figure 28: Hs578T cell proliferation in response to rHuEPO (5 U/ml) treatment
Growth media, supplemented with (A) 10 % or (B) 1 % FBS. Error bars represent standard deviations (SD) in fold change ratios. (*) statistically significant difference for Type 1 error $\alpha = 0.05$.

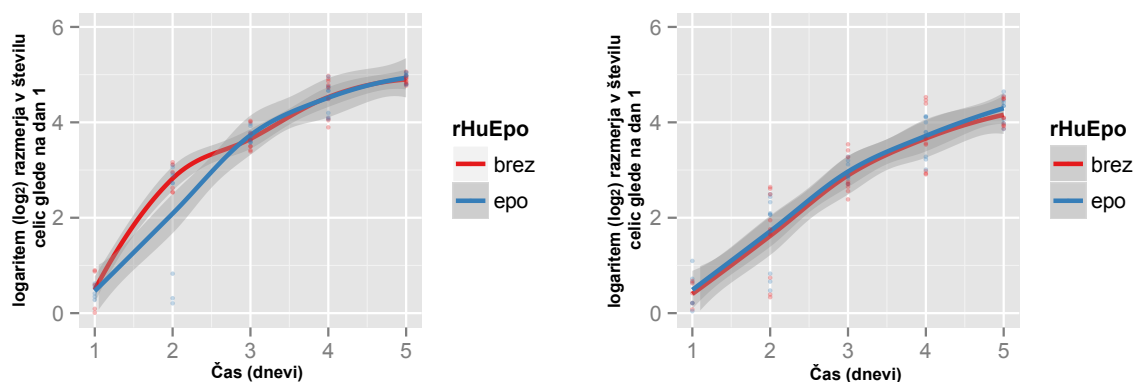


Slika 29: Proliferacija celic SKBR3 v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO (5 U/ml)

Proliferacija celic v rastnem gojišču z (A) 10 % in (B) 1 % FBS. Napaka meritve je prikazana v enotah standardne napake (SD). (*) statistično značilna razlika $p < 0.05$.

Figure 29: SKBR3 cell proliferation in response to rHuEPO (5U/ml) treatment

Growth media, supplemented with (A) 10 % or (B) 1 % FBS. Error bars represent standard deviations (SD) in fold change ratios. (*) statistically significant difference for Type 1 error $\alpha = 0.05$.

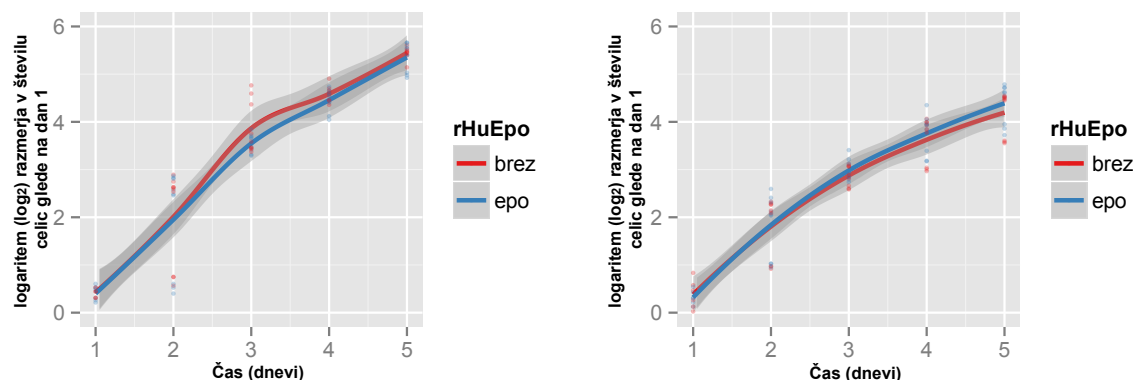


Slika 30: Proliferacija celic RAMA 37 v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO (5 U/ml)

Proliferacija celic v rastnem gojišču z (A) 10 % in (B) 1 % FBS. Napaka meritve je prikazana v enotah standardne napake (SD).

Figure 30: RAMA 37 cell proliferation in response to rHuEPO (5 U/ml) treatment

Growth media, supplemented with (A) 10 % or (B) 1 % FBS. Error bars represent standard deviations (SD) in fold change ratios.

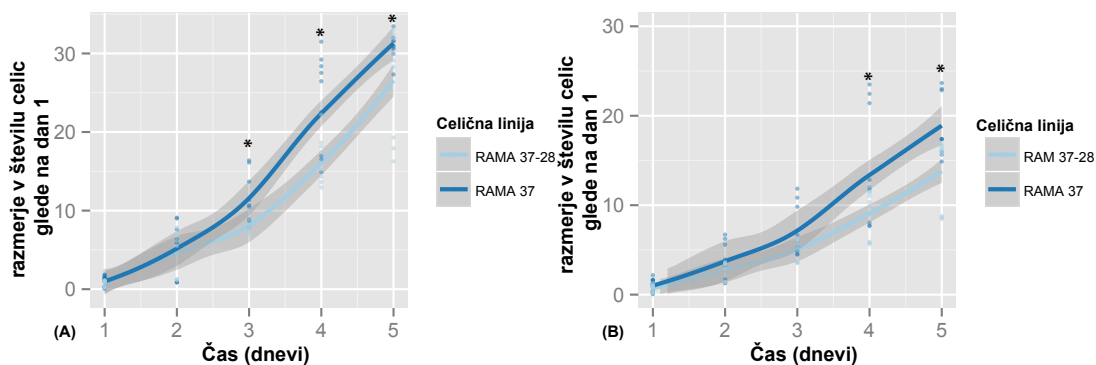


Slika 31: Proliferacija celic RAMA 37-28 v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO (5 U/ml)
Proliferacija celic v rastnem gojišču z (A) 10 % in (B) 1 % FBS. Napaka meritve je prikazana v enotah standardne napake (SD).

Figure 31: RAMA 37-28 cell proliferation in response to rHuEPO (5 U/ml) treatment
Growth media, supplemented with (A) 10 % or (B) 1 % FBS. Error bars represent standard deviations (SD) in fold change ratios.

V danih pogojih rHuEPO ne vpliva na proliferacijo celic MCF-7, MDA-MB-231, RAMA 37 in RAMA 37-28 (slike 25, 27, 30 in 31). Pri celičnih linijah Hs578T (slika 28) in SKBR3 (slika 29) rHuEPO statistično značilno ($p < 0.05$) zniža nivo proliferacije v pogojih nizke koncentracije seruma v rastnem gojišču (1 % FBS). Pri celični liniji T-47D (slika 26) rHuEPO statistično značilno zniža ($p < 0.05$) nivo proliferacije že v osnovnem gojišču (10 % FBS). Pri vseh celičnih linijah ima FBS znatno večji vpliv od tretiranja z rHuEPO.

Tretiranje z rHuEPO ne vpliva na proliferacijo celic RAMA 37 (slika 30) in RAMA 37-28 (slika 31), obe celični liniji pa se razlikujeta v proliferacijskem potencialu (slika 32). Proliferacija celične linije RAMA 37 je statistično značilno višja od proliferacije celične linije RAMA 37-28, ne glede na koncentracijo FBS (1 ali 10 %) v gojišču. Celice RAMA 37-28 so klon RAMA 37 s povišanim izražanjem EPOR, tako je moč sklepati, da visoko izražanje EPOR zmanjša proliferativni potencial celic.

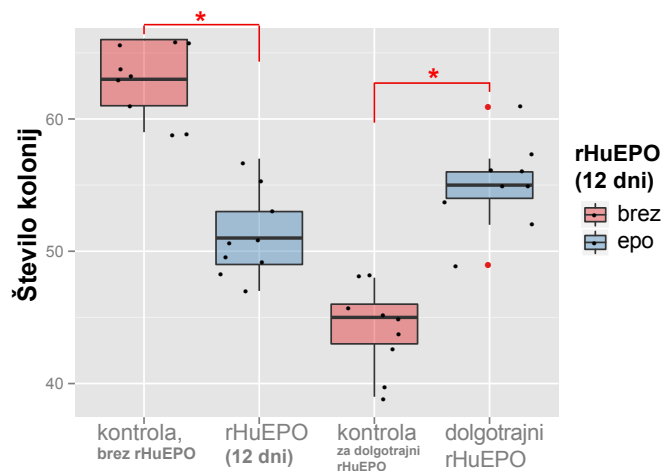


Slika 32: Primerjava hitrosti proliferacije za celični liniji RAMA 37 in RAMA 37-28
Proliferacija celic v rastnem gojišču z (A) 10 % in (B) 1 % FBS. Napaka meritve je prikazana v enotah standardne napake (SD). (*) statistično značilna razlika $p < 0.05$.

Figure 32: Differences in proliferation rates between RAMA 37 and RAMA 37-28 cell lines
Growth media, supplemented with 10 % FBS or (B) 1 % FBS. Error bars represent standard deviations (SD).
(*) statistically significant difference for Type 1 error $\alpha = 0.05$.

4.2.2 Testi klonigenosti

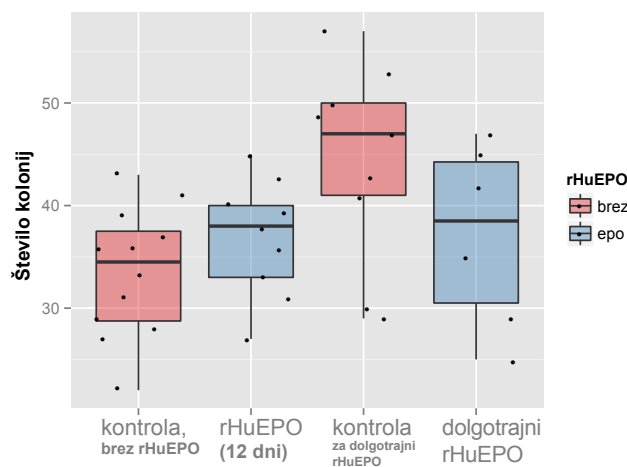
Najprej smo preverili sposobnost celic za tvorbo kolonij. Ugotovili smo, da so klonigene le celične linije MCF-7, MDA-MB-231, Hs578T, RAMA 37 in RAMA 37-28, ki smo jih nadalje uporabili v testih klonigenosti. Celice smo v nizki koncentraciji nacepili na ploščice za gojenje celičnih kultur ter jih izpostavili rHuEPO. Po 14 dnevih gojenja v osnovnem rastnem gojišču oziroma ob dodanem rHuEPO (5 U/ml) smo določili število in velikost celičnih kolonij ter izračunali učinkovitost nacepovitve (*PE*). Enak test smo izvedli tudi za celice MCF-7 in MDA-MB-231, ki smo jih pred tem dolgotrajno (pred-)tretirali z rHuEPO (9 tednov). Dolgotrajno tretirane celice smo torej še dodatno izpostavili rHuEPO za 12 dni ter njihovo klonigenost primerjali s klonigenostjo ustreznih kontrolnih celic (dolgotrajno gojenih v gojišču brez dodanega rHuEPO). Rezultati štetja kolonij za 3 neodvisne poizkuse so prikazani na slikah 33, 34, 35, 36.



Slika 33: Testi klonigenosti za celično linijo MCF-7: število kolonij v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO
Napaka meritve je prikazana v enotah standardne napake (SD). (*) statistično značilna razlika $p < 0.05$.

Figure 33: Clonogenic assay using MCF-7 cell line: colony number in response to rHuEPO treatment

Error bars represent standard deviations (SD). (*) statistically significant difference for Type 1 error $\alpha = 0.05$.



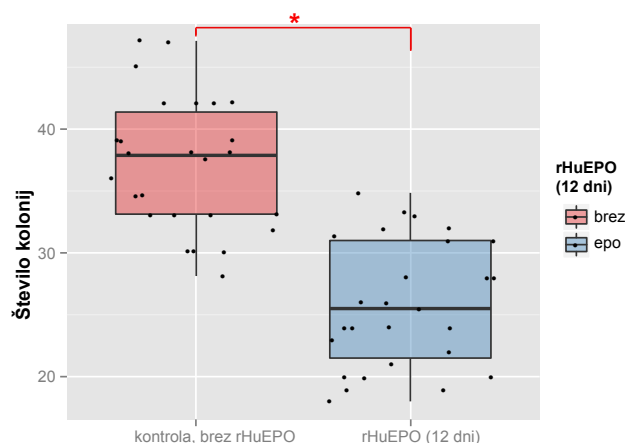
Slika 34: Testi klonigenosti za celično linijo MDA-MB-231: število kolonij v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO

Napaka meritve je prikazana v enotah standardne napake (SD).

Figure 34: Clonogenic assay using MDA-MB-231 cells: colony number in response to rHuEPO

Error bars represent standard deviations (SD).

Klonigenost celic MCF-7 se statistično značilno zmanjša po 12 dnevnem tretiranju z rHuEPO v primerjavi s kontrolnimi celicami, ki so rasle v rastnem gojišču brez dodanega rHuEPO. Ravno nasprotno imajo celice, kontinuirano gojene v prisotnosti rHuEPO (9 tednov + 12 dni) statistično značilno višji klonigeni potencial v primerjavi z ustreznimi kontrolnimi celicami, ki so ves čas rasle v gojišču brez rHuEPO (slika 33). rHuEPO nima statistično značilnega učinka na klonigenost celic MDA-MB-231, razviden pa je trend, ki kaže na višji klonigeni potencial celic, ki so bile kratkotrajno tretirane z rHuEPO (slika 34, 1. in 2. okvir z ročaji) oziroma na nižji klonigeni potencial celic, ki so bile dolgotrajno tretirane z rHuEPO (slika 34, 3. in 4. okvir z ročaji)

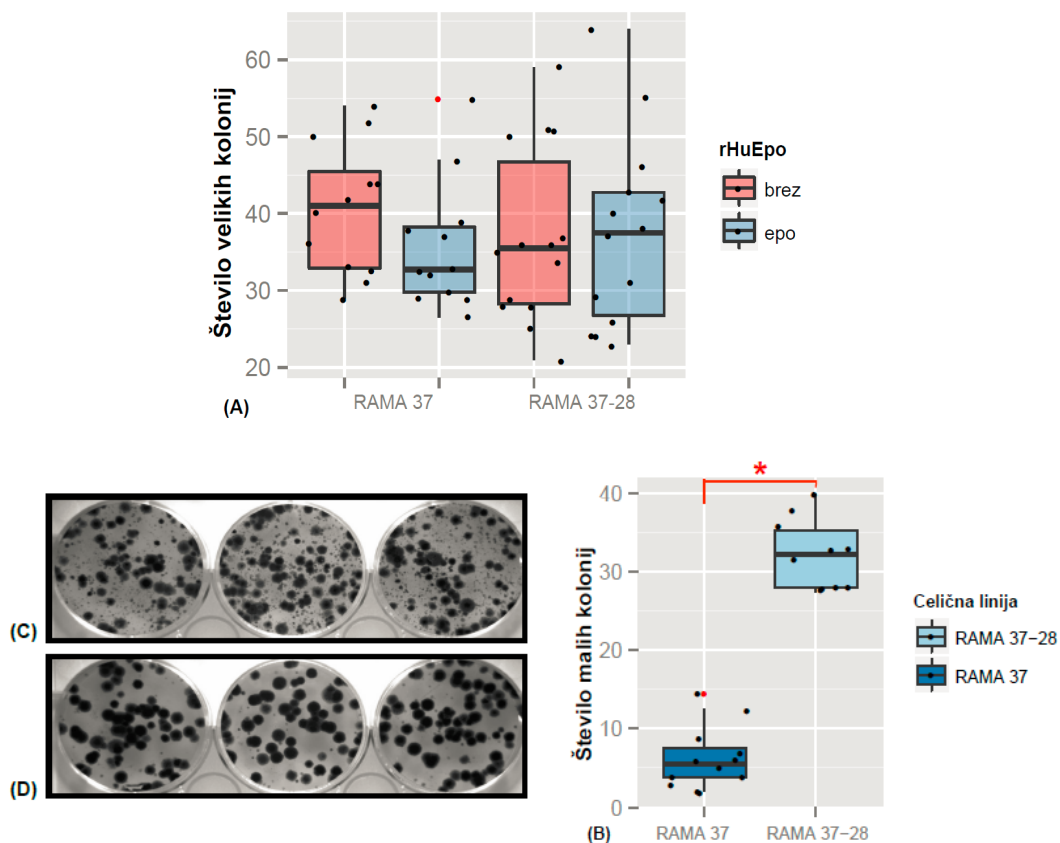


Slika 35: Testi klonigenosti za celično linijo Hs578T: število kolonij v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO
Napaka meritve je prikazana v enotah standardne napake (SD). (*) statistično značilna razlika $p < 0.05$.

Figure 35: Clonogenic assay using Hs578T cell line: colony number in response to rHuEPO treatment
Error bars represent standard deviations (SD). (*) statistically significant difference for Type 1 error $\alpha = 0.05$.

Klonigeni potencial celic Hs578T je po tretiranju z rHuEPO (12 dni) nižji od tistega pri netretiranih celicah. Razlika v številu kolonij je statistično značilna ($p < 0.05$, slika 35).

Celice RAMA 37-28 imajo povečano izražanje EPOR, vendar pa kljub temu tretiranje z rHuEPO ne vpliva na njihov klonigeni potencial. Število kolonij pri celicah RAMA 37-28 je primerljivo številu kolonij pri celicah RAMA 37 (slika 36 A). Pri celicah RAMA 37 je vpliv rHuEPO nekoliko bolj opazen in kaže ne negativne učinke rHuEPO tretiranja na klonigenost omenjenih celic. Opažen trend ni statistično značilen (slika 36 A). Razlika v številu majhnih kolonij med celicami RAMA 37-28 in RAMA 37 je statistično značilna (slika 36 B, C in D), iz česar lahko sklepamo, da prekomerno izražanje EPOR poveča klonigeni potencial celic RAMA 37-28. Velikost kolonij pri celični liniji RAMA 37 je večja v primerjavi s celicami RAMA 37-28 (slika 36 C in D), torej je proliferacija celic RAMA 37 nekoliko hitrejša v



Slika 36: Testi klonigenosti za celični liniji RAMA 37 in RAM 37-28: število kolonij v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO

(A) število velikih kolonij; (B) število majhnih kolonij; (C) test klonigenosti za celice RAMA 37-28; (D) test klonigenosti za celice RAMA 37. Napaka meritve je prikazana v enotah standardne napake (SD). (*) statistično značilna razlika $p < 0.05$.

Figure 36: Clonogenic assays using RAMA 37 and RAMA 37-28 cell lines: colony number in response to rHuEPO treatment

(A) number of big colonies; (B) number of small colonies; (C) clonogenic assay for RAMA 37-28 cells; (D) clonogenic assay for RAMA 37 cells. Error bars represent standard deviations (SD). (*) statistically significant difference for Type 1 error $\alpha = 0.05$.

primerjavi s proliferacijo celic RAMA 37-28. Višji proliferacijski potencial celic RAMA 37 smo potrdili tudi s testi metabolne aktivnosti (slika 32).

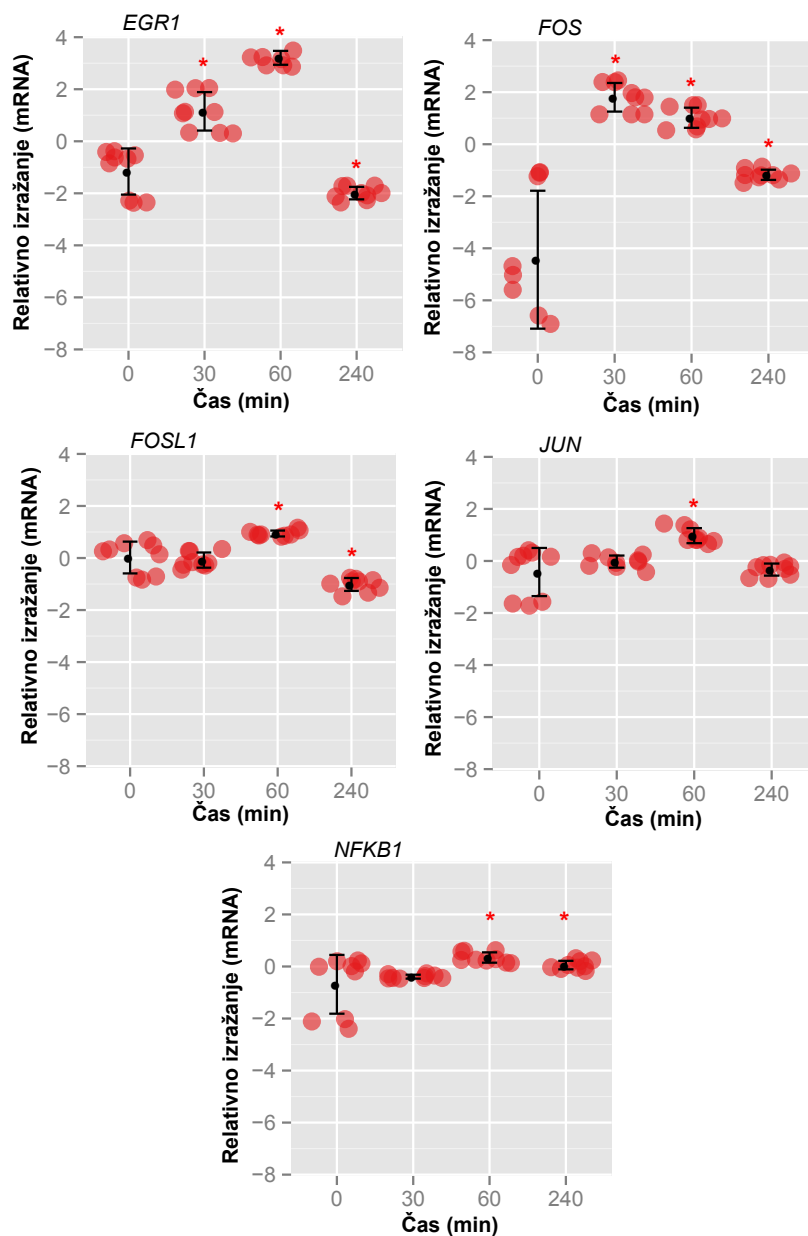
4.3 VPLIV rHuEPO NA IZRAŽANJE GENOV ZGODNJEGA ODZIVA

Geni zgodnjega odziva so tisti geni, ki se aktivirajo kot primarni odgovor na veliko število celičnih signalov. Predstavljajo mehanizem celičnega odgovora, ki se sproži na transkripcijski ravni, še preden pride do prevajanja proteinov. Geni zgodnjega odziva običajno sodelujejo v regulaciji procesov celične rasti in diferenciacije, med njimi pa so najbolj poznani *JUN*, *FOS* in *MYC*. Celične linije MCF-7, T-47D, MDA-MB231, SKBR3 in Hs578T smo izpostavili rHuEPO (5 U/ml) v različnih časovnih intervalih (30, 60, 240 min) ter preverili njegov vpliv na izražanje genov zgodnjega odziva: *FOS*, *FOSL1*, *JUN*, *NFKB1* in *EGR1*. Izražanje genov smo primerjali s kontrolnimi celicami, brez dodanega rHuEPO. V vseh analiziranih celičnih linijah smo potrdili aktivacijo genov zgodnjega odziva, največje spremembe smo opazili pri genih *FOS* in *EGR1* in sicer po 30 min tretiranja z rHuEPO. Rezultati so prikazani na slikah 37, 40, 38, 39, 40, 41. Pri analizi smo kot referenčna gena uporabili *GAPDH* in *RPLP0*, saj sta se v danih pogojih izkazala kot najbolj stabilna.

4.4 ANALIZA CELIČNE PROLIFERACIJE NA PROTEINSKEM NIVOJU

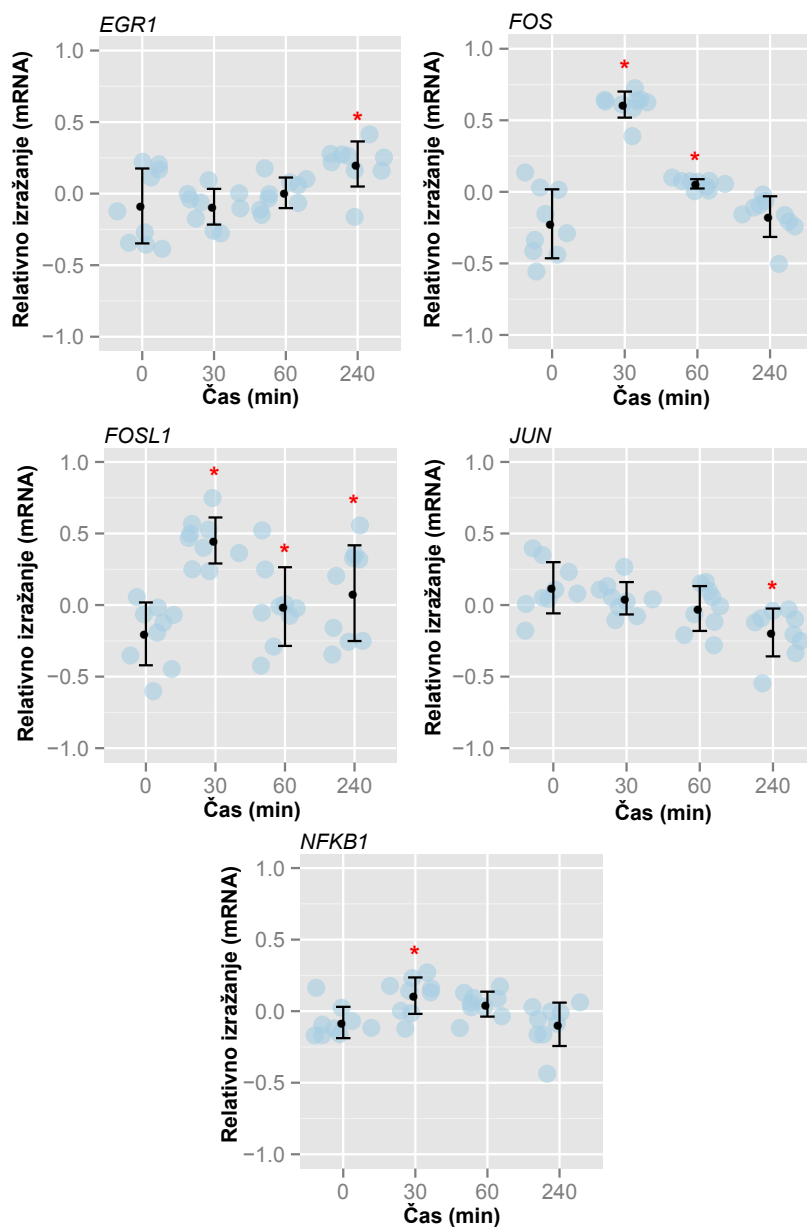
Celične linije MCF-7, T-47D, MDA-MB-231, SKBR3 in Hs578T smo izpostavili rHuEPO v različnih koncentracijah (5, 25 U/ml) ter v izbranih časovnih točkah (0, 5, 10, 15, 30, 60 in 120 min) preverili aktivacijo signalnih poti MAPK(ERK), PI3K(AKT) in JAK2/STAT5 (STAT5).

V analiziranih celičnih linijah smo najprej preverili nivo izražanja proteinov ERK, AKT in STAT5. Iz slike 42 je razvidno, da je protein ERK izražen v vseh celičnih linijah. Podobno, vse celične linije izražajo AKT, medtem ko smo izražanje STAT5 uspeli potrditi le pri celični liniji SKBR3. rHuEPO nima močnega vpliva na fosforilacijo proteinov ERK, AKT in STAT5, saj smo za celične linije MDA-MB-231, MCF-7, SKBR3 in Hs578T uspeli pokazati le rahlo spremembo v nivoju fosforilacije. rHuEPO zviša nivo fosforilacije ERK in AKT pri celicah SKBR3 in MDA-MB-231, medtem ko je učinek na celice Hs578T ravno nasproten. Pri celicah MDA-MB-231 in SKBR3 rHuEPO zviša nivo fosforilacije ERK neodvisno od uporabljene koncentracije. Povečan nivo fosforilacije AKT smo pokazali za celice MCF-7 po tretiranju s 25 U/ml rHuEPO. Fosforilacijo STAT5 smo uspeli potrditi le pri celični liniji SKBR3.



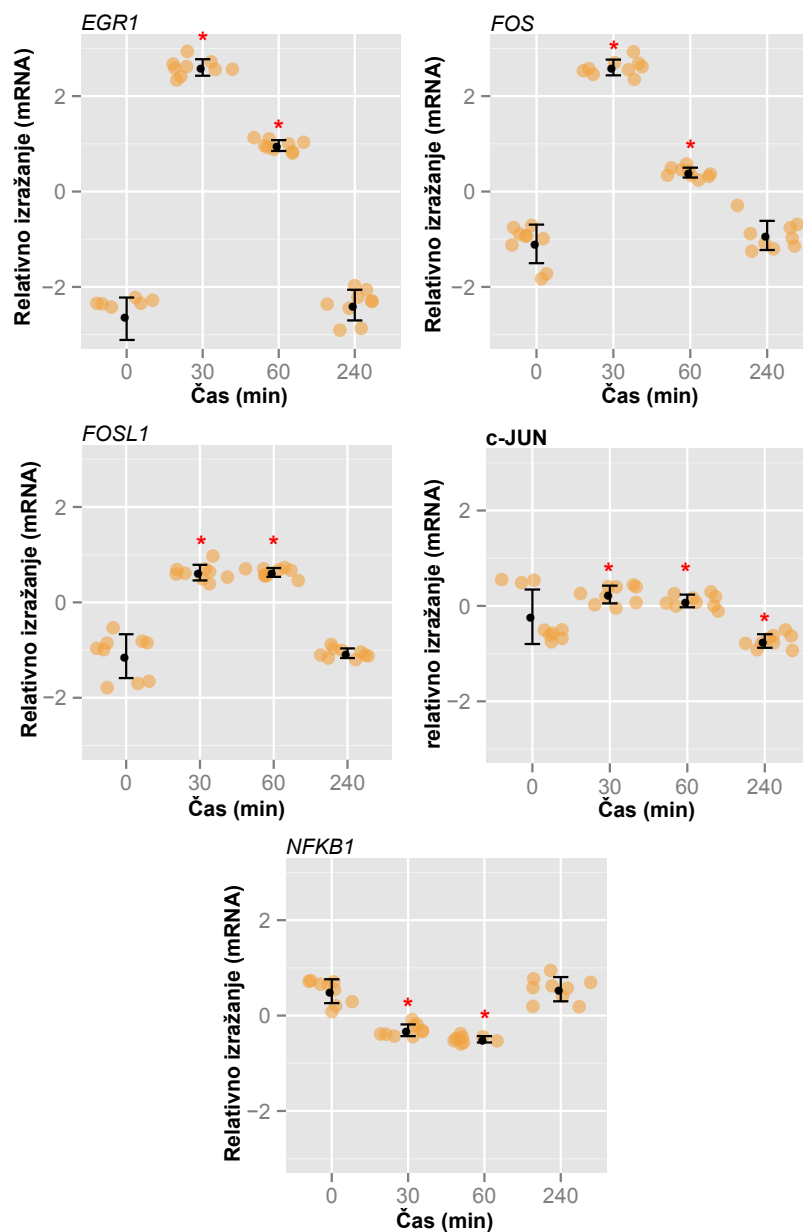
Slika 37: Izražanje genov zgodnjega odziva pri celični liniji MCF-7 po tretiranju z rHuEPO
Izražanje genov po tretiranju z rHuEPO (30, 60, 240 min) smo normalizirali z izražanjem pri kontrolnih, netretiranih vzorcih (0 min). Napaka meritve je prikazana v enotah standardne napake (SD). (*) statistično značilna razlika $p < 0.05$.

Figure 37: Early gene response in MCF-7 cells upon rHuEPO treatment
Early gene response at different time points (30, 60, 240 min) of rHuEPO treatment, normalized to non-treated control samples (0 min). Error bars represent standard deviations (SD). (*) statistically significant difference for Type 1 error $\alpha = 0.05$.



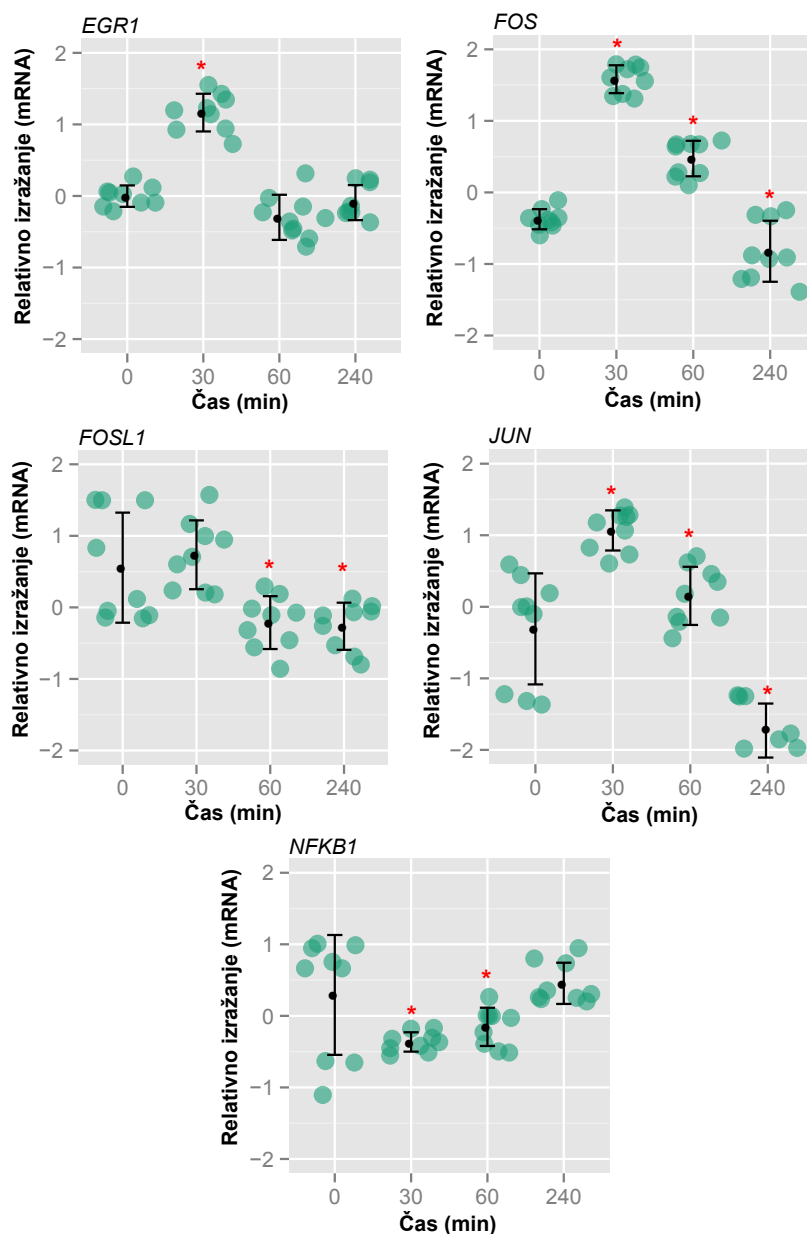
Slika 38: Izražanje genov zgodnjega odziva pri celični liniji T-47D po tretiranju z rHuEPO
Izražanje genov po tretiranju z rHuEPO (30, 60, 240 min) smo normalizirali z izražanjem pri kontrolnih, netretiranih vzorcih (0 min). Napaka meritve je prikazana v enotah standardne napake (SD). (*) statistično značilna razlika ($p < 0.05$) glede na kontrolne vzorce.

Figure 38: Early gene response in T-47D cells upon rHuEPO treatment
Early gene response at different time points (30, 60, 240 min) of rHuEPO treatment, normalized to non-treated control samples (0 min). Error bars represent standard deviations (SD). (*) statistically significant difference for Type 1 error $\alpha = 0.05$.



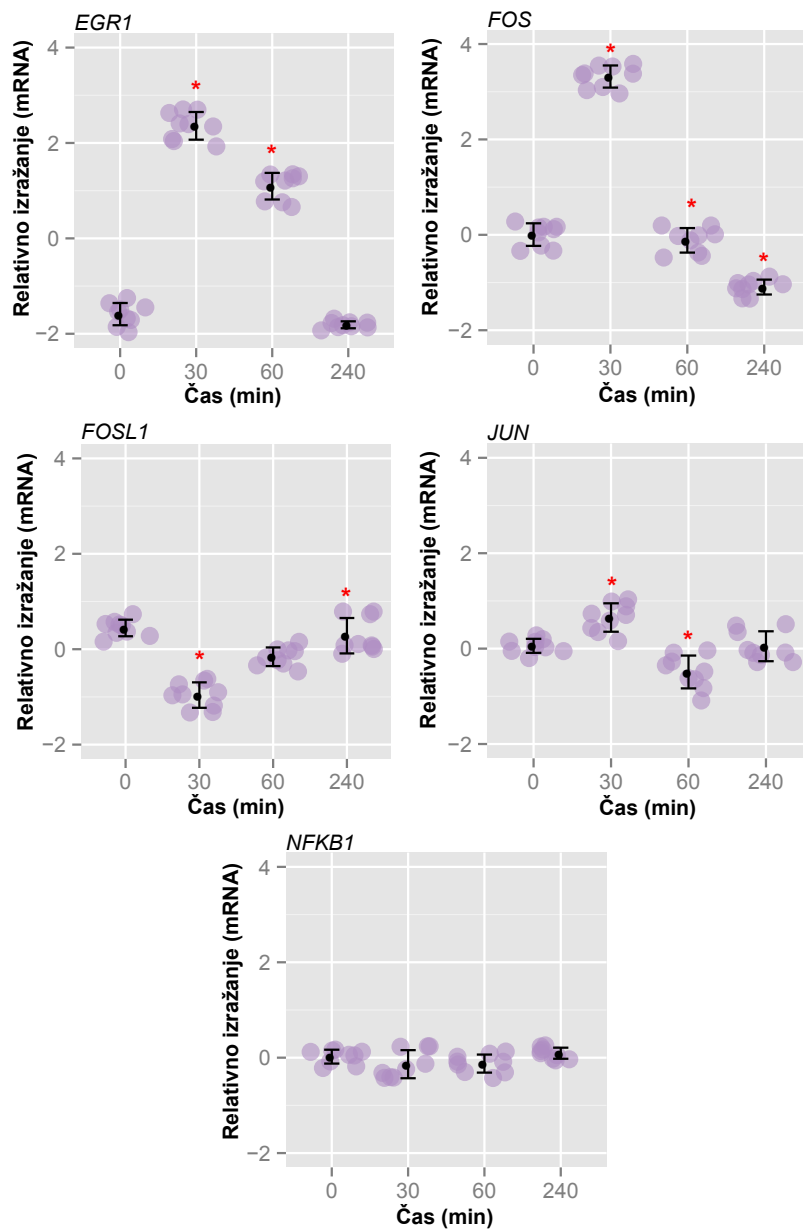
Slika 39: Izražanje genov zgodnjega odziva pri celični liniji MDA-MB-231 po tretiranju z rHuEPO
Izražanje genov po tretiranju z rHuEPO (30, 60, 240 min) smo primerjali z izražanjem pri kontrolnih, netretiranih vzorcih (0 min). Napaka meritve je prikazana v enotah standardne napake (SD). (*) statistično značilna razlika ($p < 0.05$) glede na kontrolne vzorce.

Figure 39: Early gene response in MDA-MB-231 cells upon rHuEPO treatment
Early gene response at different time points (30, 60, 240 min) of rHuEPO treatment, normalized to non-treated control samples (0 min). Error bars represent standard deviations (SD). (*) statistically significant difference for Type 1 error $\alpha = 0.05$.



Slika 40: Izražanje genov zgodnjega odziva pri celični liniji SKBR3 po tretiranju z rHuEPO
Izražanje genov po tretiranju z rHuEPO (30, 60, 240 min) smo primerjali z izražanjem pri kontrolnih, netretiranih vzorcih (0 min). Napaka meritve je prikazana v enotah standardne napake (SD). (*) statistično značilna razlika ($p < 0.05$) glede na kontrolne vzorce.

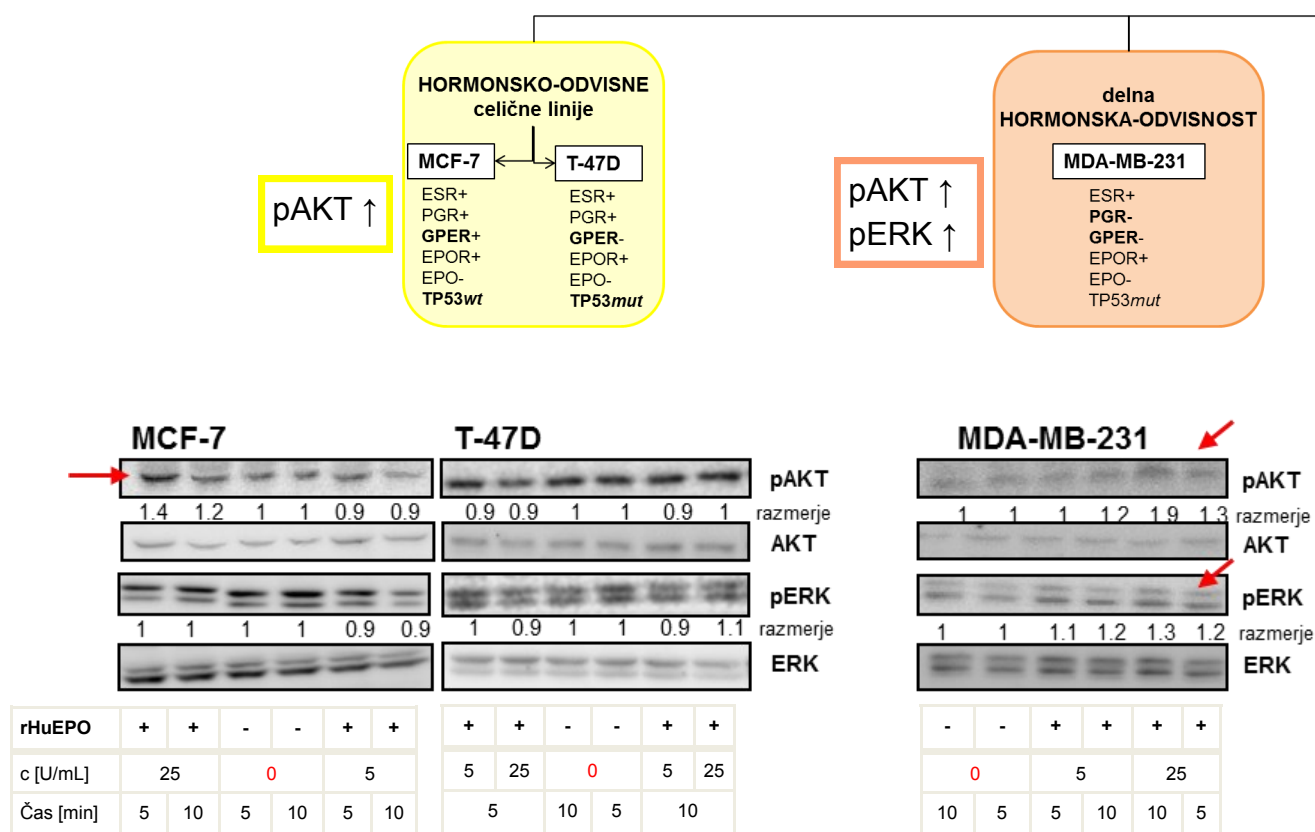
Figure 40: Early gene response in SKBR3 cells upon rHuEPO treatment
Early gene response at different time points (30, 60, 240 min) of rHuEPO treatment, normalized to non-treated control samples (0 min). Error bars represent standard deviations (SD). (*) statistically significant difference for Type 1 error $\alpha = 0.05$.



Slika 41: Izražanje genov zgodnjega odziva pri celični liniji Hs578T po tretiranju z rHuEPO
Izražanje genov po tretiranju z rHuEPO (30, 60, 240 min) smo primerjali z izražanjem pri kontrolnih, netretiranih vzorcih (0 min). Napaka meritve je prikazana v enotah standardne napake (SD). (*) statistično značilna razlika ($p < 0.05$).

Figure 41: Early gene response in Hs578T cells upon rHuEPO treatment
Early gene response at different time points (30, 60, 240 min) of rHuEPO treatment, normalized to non-treated control samples (0 min). Error bars represent standard deviations (SD). (*) statistically significant difference for Type 1 error $\alpha = 0.05$.

rHuEPO in aktivacija signalnih poti JAK2 / STAT5, MA



rHuEPO vpliva na nivo fosforilacije proteinov ERK in AKT ter tudi STAT

Trošt N, Hevir N, Rižner TL, Debeljak N. 2013. Correlation between erythropoietin receptor and different breast cancer cell lines. International journal of molecular medicine, 31: 3, 717-723

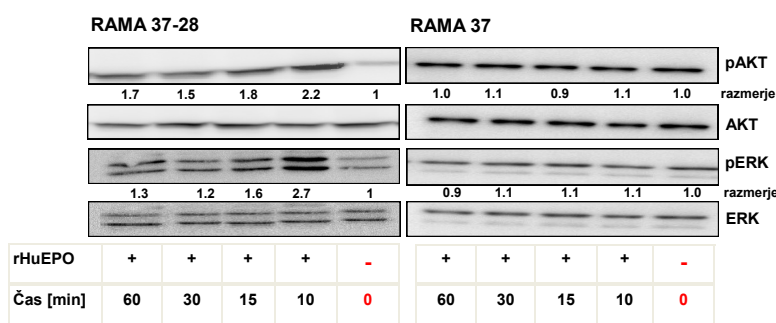
Slika 42: Fosforilacija proteinov ERK (pERK), AKT (pAKT) in STAT5 (pSTAT5) po izpostavitvi celic rHuEPO

Slika prikazuje nivo pERK, pAKT in pSTAT5 po 5 in 10 min tretiranja z rHuEPO (5 in 25 U/ml). Na sliki so prikazana razmerja med fosforilirano in nefosforilirano obliko proteina. Določili smo jih s kvantitativno analizo denzitometričnih vrednosti, pri čemer smo vrednost za posamezno liso normalizirali z vrednostjo ustreznega kontrolnega vzorca. (+) celice tretirane z rHuEPO; (-) kontrolne celice brez rHuEPO.

Figure 42: ERK (pERK), AKT (pAKT) and STAT5 (pSTAT5) phosphorylation upon rHuEPO treatment

Figure shows pERK, pAKT and pSTAT5 levels after 5 and 10 min of rHuEPO treatment (5 and 25 U/ml). Ratios represent quantitative analysis of densitometric values of specific band intensities normalized to the

Pri celicah RAMA 37-28, ki povečano izražajo EPOR, smo potrdili aktivacijo signalnih poti MAPK in PI3K. rHuEPO zviša nivo fosforilacije ERK in AKT, medtem ko proteinov STAT5 oziroma njihove fosforilirane oblike v izbranih pogojih nismo uspeli potrditi. Največje razlike v nivoju fosforilacije ERK in AKT smo opazili po 10 minutah tretiranja z rHuEPO. Rezultati so prikazani na sliki 43. Nadalje, v izbranih pogojih nismo uspeli potrditi aktivacije signalnih poti MAPK, PI3K in JAK2/STAT5 pri celicah RAMA 37 po tretiranju z rHuEPO.



Slika 43: Fosforilacija proteinov ERK (pERK) in AKT (pAKT) po tretiranju celic RAMA 37 in RAMA 37-28 z rHuEPO

Slika prikazuje nivo pERK in pAKT po 10, 15, 30 in 60 min tretiranja z rHuEPO (5 U/ml). Na sliki so prikazana razmerja med fosforilirano in nefosforilirano obliko proteina. Določili smo jih s kvantitativno analizo denzitometričnih vrednosti, pri čemer smo vrednost za posamezno liso normalizirali z vrednostjo ustreznega kontrolnega vzorca. (+) celice tretirane z rHuEPO; (-) kontrolne celice brez rHuEPO.

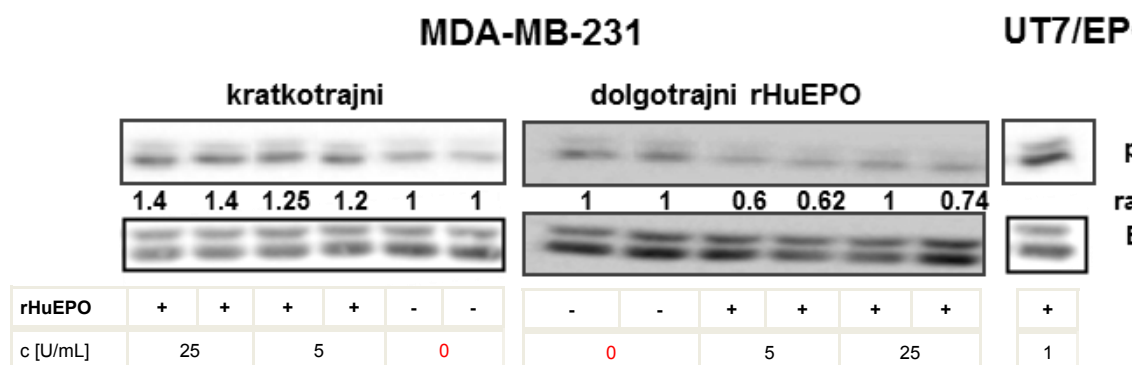
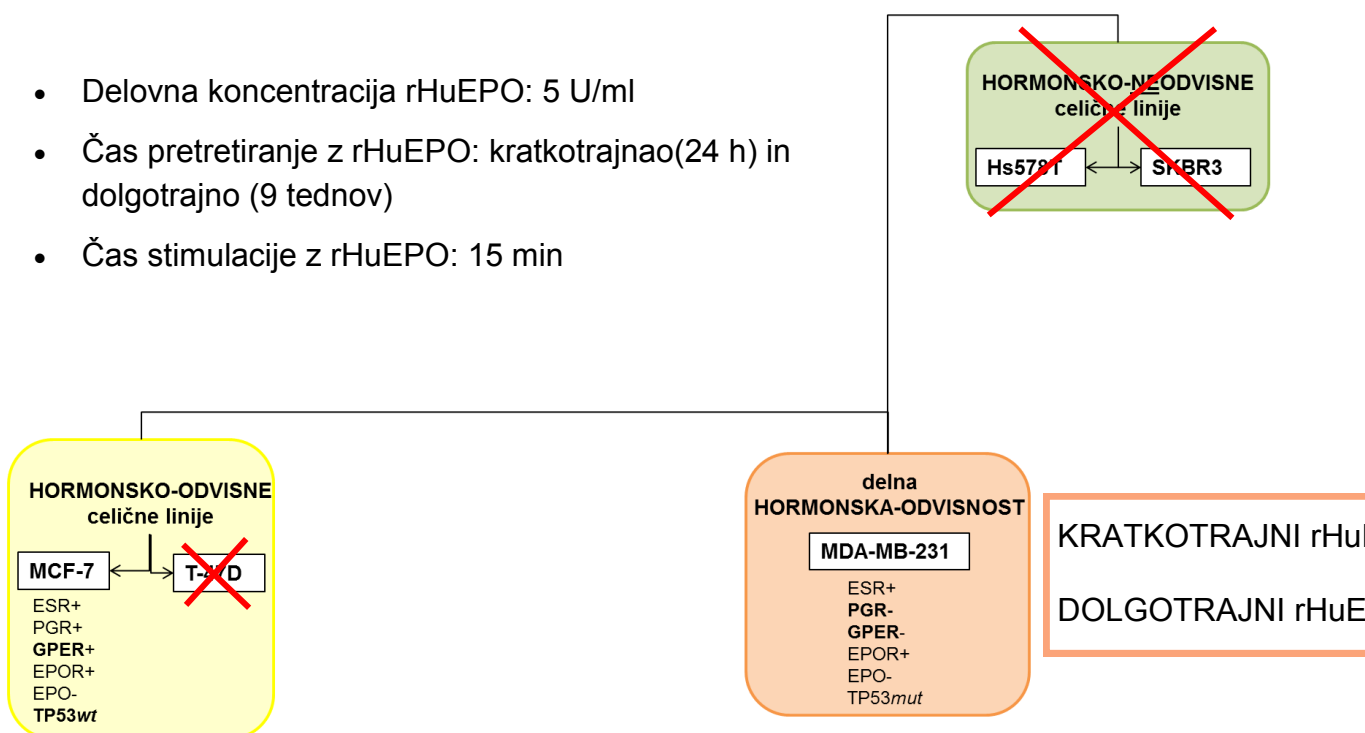
Figure 43: ERK (pERK), AKT (pAKT) and STAT5 (pSTAT5) phosphorylation upon rHuEPO treatment

Figure shows pERK, pAKT and pSTAT5 levels after 10, 15, 30 and 60 min of rHuEPO treatment (5 U/ml). Ratios represent quantitative analysis of densitometric values of specific band intensities normalized to the value of the corresponding untreated controls, which was arbitrarily set to 1. (+) rHuEPO treatment; (-) no treatment.

Preverili smo tudi vpliv kratkotrajnega (24 h) in dolgotrajnega (9 tednov) tretiranja z rHuEPO na fosforilacijo ERK pri celicah MCF-7 in MDA-MB-231. Celice smo po nasaditvi najprej 24 h gojili v mediju brez dodanega FBS, nato pa akutno stimulirali z rHuEPO (5, 25 U/ml) za 15 min. Pri celicah MCF-7 nismo uspeli potrditi fosforilacije ERK, medtem ko rHuEPO izzove fosforilacijo proteina ERK v celicah MDA-MB-231 (slika 44). Dolgotrajno tretirane celice MDA-MB-231 postanejo manj občutljive na stimulacijo z rHuEPO, saj je nivo fosforiliranega ERK približno 2.5-krat nižji v primerjavi s kratkotrajno tretiranimi celicami.

DOLGOTRAJNO vs KRATKOTRAJNO TRETIRANJE

- Delovna koncentracija rHuEPO: 5 U/ml
- Čas pretretiranja z rHuEPO: kratkotrajno (24 h) in dolgotrajno (9 tednov)
- Čas stimulacije z rHuEPO: 15 min



Slika 44: Fosforilacija proteinov ERK (pERK) po tretiranju celic MDA-MB-231 z rHuEPO
Slika prikazuje nivo izražanja proteinov ERK in pERK v lizatu celic MDA-MB-231 glede na dolžino (pred-)tretiranja z rHuEPO. Z denzitometrično analizo smo določili razmerje med pERK in ERK (pERK/ERK) za posamezni vzorec in ga primerjali s kontrolnim. V preglednici so prikazana razmerja pERK/ERK.

Figure 44: ERK (pERK) phosphorylation upon rHuEPO treatment of MDA-MB-231 cells
The level of ERK and pERK expression in MDA-MB-231 cells after short and long-term rHuEPO treatments. Table shows pERK/ERK ratios which represent quantitative analysis of densitometric values of specific band intensities normalized to the value of the corresponding untreated controls, which was arbitrarily set to 1.

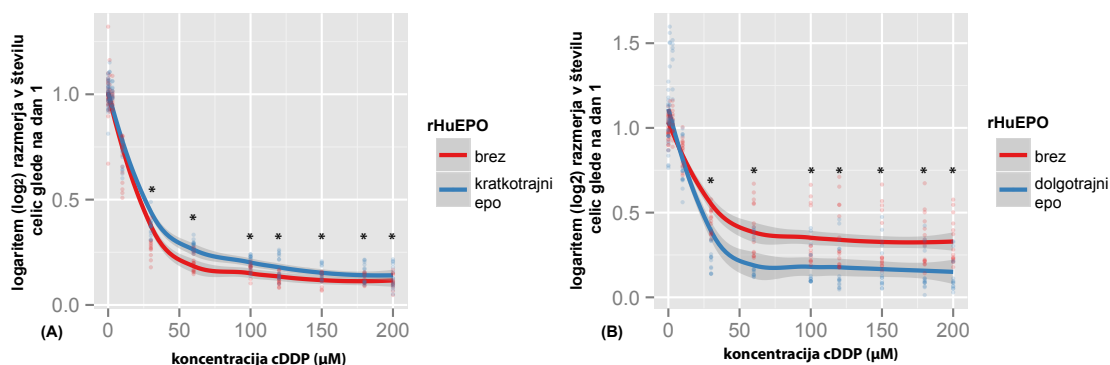
4.5 TRETIRANJE CELIC Z rHuEPO IN CISPLATIN

Kot model za študije vpliva rHuEPO na citotoksičnost cDDP smo uporabili celični liniji MCF-7 in MDA-MB-231. Celični liniji smo izbrali na podlagi funkcionalnosti gena *TP53* (oziroma njegovega proteinskega produkta p53) ter na podlagi izražanja receptorjev za estrogen (ESR) in progesteron (PGR). Protein p53 namreč regulira celični odgovor na cDDP. V celični liniji MDA-MB-231 je gen *TP53* mutiran, zato celice ne izražajo funkcionalnega proteina p53. Nasprotno, celice MCF-7 izražajo funkcionalen protein p53. Obe celični liniji se medsebojno razlikujeta še v receptorskem statusu; celice MCF-7 predstavljajo hormonsko odvisno obliko raka dojke z izraženima ESR in PGR. Celice MDA-MB-231 ne izražajo PGR in predstavljajo model za ESR(+)/PGR(-) obliko raka dojke. Izguba PGR vodi v razvoj agresivnejših tipov raka dojke (Cui in sod., 2005).

4.5.1 Vpliv rHuEPO na viabilnost celic po tretiranju s cisplatinom

Celice MCF-7 in MDA-MB-231 smo kratkotrajno (24 h) in dolgotrajno (9 tednov) izpostavili rHuEPO (5 U/ml) ter jih nato inducirali s cDDP (0, 3, 10, 30, 60, 100, 120, 150, 180 in 200 μ M). Shema tretiranja je prikazana na sliki 14. Najprej smo določili srednjo letalno koncentracijo cDDP (LC_{50} , angl. lethal concentration), ki učinkovito prizadene 50 % vseh celic v populaciji. Ugotovili smo, da LC_{50} koncentracija cDDP ni odvisna od dolžine izpostavljenosti rHuEPO (brez, kratkotrajna ali dolgotrajna) in je za celice MCF-7 10-30 μ M ter za celice MDA-MB-231 60-100 μ M. Za analizo celične viabilnosti smo uporabili kalorimetrično metodo z reagentom WST-1. Rezultati so prikazani na slikah 45 in 46.

Rezultati kažejo, da je vpliv rHuEPO na viabilnost celic MDA-MB-231 in MCF-7 časovno odvisen. Kratkotrajno tretiranje celic z rHuEPO (24 h) poveča njihovo viabilnost v primerjavi s kontrolnimi celicami, ki niso bile tretirane (sliki 45 A, 46 A). Nasprotno, je cDDP veliko bolj toksičen za dolgotrajno tretirane (9 tednov) celice MCF-7 kot za kontrolne celice brez rHuEPO (slika 45 B). Na celično linijo MDA-MB-231 dolgotrajno tretiranje z rHuEPO nima vpliva, saj je viabilnost teh celic primerljiva z viabilnostjo netretiranih celic.

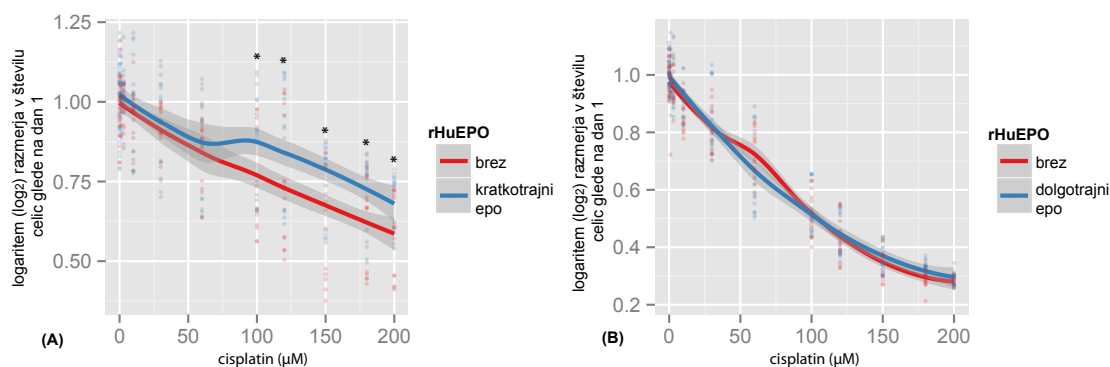


Slika 45: Vpliv rHuEPO na viabilnost celic MCF-7 po tretiranju s cisplatinom

Celice smo kratkotrajno (A) in dolgotrajno (B) tretirali z rHuEPO (5 U/ml) ter jih nato izpostavili cDDP v različnih koncentracijah. Viabilnost rHuEPO tretiranih celic (modra krivulja) smo primerjali z viabilnostjo kontrolnih celic (rdeča krivulja), ki niso bile tretirane z rHuEPO. Koncentracija LC₅₀ za cDDP za celice MCF-7 je $10 \leq LC_{50} \leq 30 \mu M$. (*) statistično značilna razlika ($p < 0.05$) v viabilnosti rHuEPO tretiranih in netretiranih celic.

Figure 45: The effect of rHuEPO treatment on the viability of MCF-7 cells, exposed to cisplatin

Cells were treated with rHuEPO (5 U/ml) short (A) and long-term (B) and exposed to different concentrations of cDDP. Viability of rHuEPO treated cells (blue line) was compared with the viability of corresponding controls (red line). LC₅₀ concentration for cDDP in MCF-7 cells is $10 \leq LC_{50} \leq 30 \mu M$. (*) statistically significant difference for Type 1 error $\alpha = 0.05$.



Slika 46: Vloga rHuEPO na viabilnost celic MDA-MB-231 po tretiranju s cisplatinom

Celice smo kratkotrajno (A) in dolgotrajno (B) tretirali z rHuEPO (5 U/ml) ter jih nato izpostavili cDDP v različnih koncentracijah. Viabilnost rHuEPO tretiranih celic (modra krivulja) smo primerjali z viabilnostjo kontrolnih celic (rdeča krivulja), ki niso bile tretirane z rHuEPO. Koncentracija LC₅₀ za cDDP za celice MDA-MB-231 je $60 \leq LC_{50} \leq 100 \mu M$. (*) statistično značilna razlika ($p < 0.05$) v viabilnosti rHuEPO tretiranih in netretiranih celic.

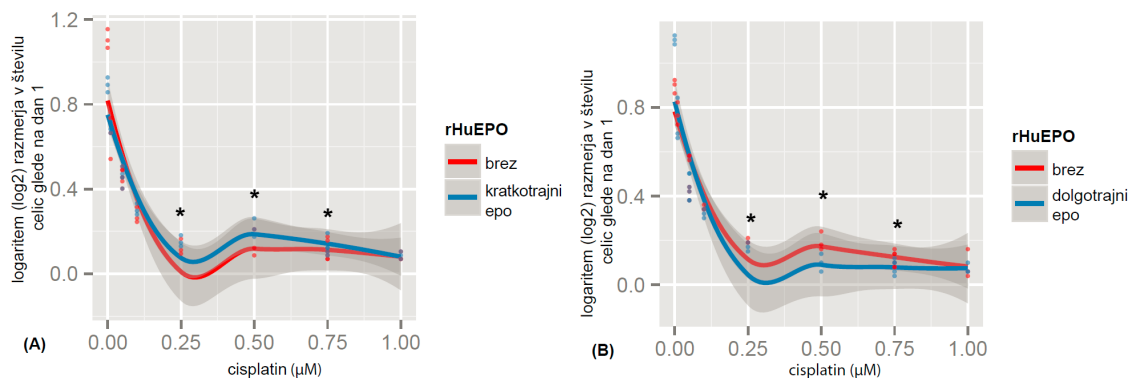
Figure 46: The effect of rHuEPO treatment on the viability of MDA-MB-231 cells, exposed to cisplatin

Cells were treated with rHuEPO (5 U/ml) short (A) and long-term (B) and exposed to different concentrations of cDDP. Viability of rHuEPO treated cells (blue line) was compared with the viability of corresponding controls (red line). LC₅₀ concentration for cDDP in MDA-MB-231 cells is $60 \leq LC_{50} \leq 100 \mu M$. (*) statistically significant difference for Type 1 error $\alpha = 0.05$.

4.5.2 Testi klonigenosti

Za indukcijo celic smo uporabili različne koncentracije cDDP: 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 6, 10, 12, 18, 20 μM . Po 14 dnevih smo prešteli število kolonij ter določili učinkovitost nacepitve (PE) in delež preživetja (SF). Rezultati so prikazani na slikah 47 in 48.

12 dnevno tretiranje celic MCF-7 z rHuEPO deluje zaščitno pred citotoksičnostjo cDDP, medtem ko dolgotrajno tretiranje poveča njegovo citotoksično delovanje. Rezultati testov klonigenosti so torej v skladu z rezultati testov metabolne aktivnosti (reagent WST-1) (slika 47). 12 dnevna izpostavitve celic MDA-MB-231 na rHuEPO zveča citotoksično delovanje cDDP, zato sta viabilnost in klonigeni potencial kratkotrajno tretiranih celic nižja v primerjavi s kontrolnimi. Viabilnost in klonigeni potencial dolgotrajno tretiranih in kontrolnih celic MDA-MB-231 sta po indukciji s cDDP primerljiva (slika 48).

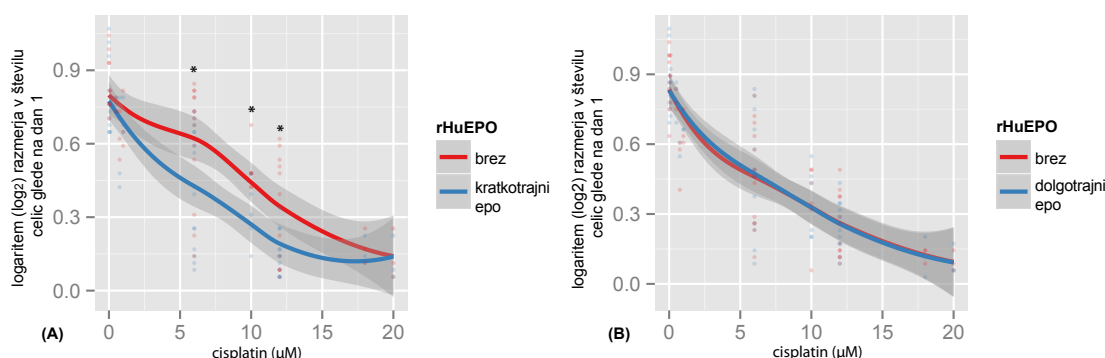


Slika 47: Testi klonogenosti: Delež preživetja celic MCF-7 glede na tretiranje z rHuEPO in izpostavitvev cisplatinu

(A) Deleži preživetja za celice, ki smo jih po izpostavitvi cDDP 12 dni tretirali z rHuEPO (modra krivulja) oziroma so ostale netretirane (rdeča krivulja). (B) Deleži preživetja dolgotrajno tretiranih (modra krivulja) in netretiranih celic (rdeča krivulja) po izpostavitvi cDDP. Koncentracija LC₅₀ za cDDP za celice MCF-7 je $0.1 \leq LC_{50} \leq 0.5 \mu M$. (*) statistično značilna razlika ($p \leq 0.05$) v odstotku preživetja med rHuEPO tretiranimi oziroma netretiranimi celicami.

Figure 47: Clonogenic assays: Surviving fraction of MCF-7 cells after exposure to cisplatin in regards to rHuEPO treatments

(A) Surviving fraction of 12 days rHuEPO treated cells (blue line) when compared to non-treated cells (red line). (B) Surviving fraction of long-term rHuEPO treated cells (blue line) when compared to corresponding controls (red line). LC₅₀ concentration for cDDP in MCF-7 cells is $0.1 \leq LC_{50} \leq 0.5 \mu M$. (*) statistically significant difference for Type 1 error $\alpha = 0.05$.



Slika 48: Testi klonogenosti: Delež preživetja MDA-MB-231 celic glede na tretiranje z rHuEPO in izpostavitve cisplatinu

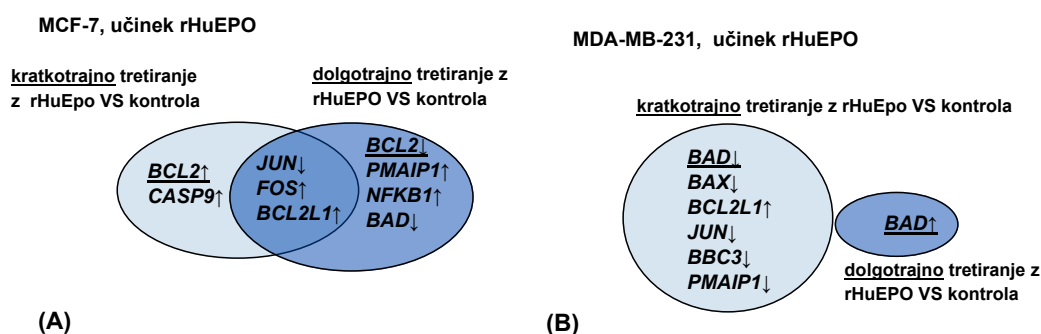
(A) Deleži preživetja za celice, ki smo jih po izpostavitvi cDDP 12 dni tretirali z rHuEPO (modra krivulja) oziroma so ostale netretirane (rdeča krivulja). (B) Delež preživetja dolgotrajno tretiranih (modra krivulja) in netretiranih celic (rdeča krivulja) po izpostavitvi cDDP. Koncentracija LC50 za cDDP za celice MDA-MB-231 je $6 \leq LC50 \leq 10 \mu M$. (*) statistično značilna razlika ($p \leq 0.05$) v odstotku preživetja med rHuEPO tretiranimi oziroma netretiranimi celicami.

Figure 48: Clonogenic assays: Surviving fraction of MDA-MB-231 cells after exposure to cDDP in regards to rHuEPO treatments

(A) Surviving fraction of 12 days rHuEPO treated cells (blue line) when compared to non-treated cells (red line). (B) Surviving fraction of long-term rHuEPO treated cells (blue line) when compared to corresponding controls (red line). LC50 concentration for cDDP in MDA-MB-231 cells is $6 \leq LC50 \leq 10 \mu M$. (*) statistically significant difference for Type 1 error $\alpha = 0.05$.

4.5.3 Analiza izražanja genov signalne poti p53

Celice MCF-7 in MDA-MB-231 smo tretirali z rHuEPO oziroma jih izpostavili cDDP ter preverili izražanje od p53-odvisnih genov. Glede na rastne krivulje po tretiranju z rHuEPO in cDDP smo predpostavljali, da rHuEPO modulira izražanje genov, udeleženih v procese apoptoze, regulacije celičnega cikla ter popravljanje DNA. V preliminarjem poskusu smo tako najprej analizirali izražanje genov *BCL2*, *BCL2L1*, *BAX*, *BAD*, *PMAIP1*, *BBC3*, *CASP3*, *CASP9*, *TP53*, *FOS*, *JUN* in *NFKB1*. Pri analizi smo kot referenčna gena uporabili *GAPDH* in *RPLP0*, saj sta se v danih pogojih izkazala kot najbolj stabilna. Med posameznimi skupinami vzorcev smo poiskali diferencialno izražene gene ($p < 0.05$) ter jih prikazali z Vennovimi diagrami. Na sliki 49 so prikazani diferencialno izraženi geni med vzorci po kratkotrajnem (24 h) in dolgotrajnem (9 tednov) tretiranju z rHuEPO.



Slika 49: Diferencialno izraženi geni glede na rHuEPO tretiranje

Izražanje genov pri posameznem rHuEPO tretmaju (kratkotrajni in dolgotrajni) smo najprej normalizirali z izražanjem genov pri netretiranih vzorcih (brez rHuEPO). Vennovi diagrami predstavljajo razlike v diferencialno izraženih genih po kratkotrajni in dolgotrajni izpostavitvi celic rHuEPO: (A) celice MCF-7; (B) celice MDA-MB-231. (↑) izražanje gena v vzorcu je povečano v primerjavi s kontrolo; (↓) izražanje gena v vzorcu je znižano v primerjavi s kontrolo. Smer spremembe pri podčrtanih genih je različna.

Figure 49: Differential gene expression upon rHuEPO treatment

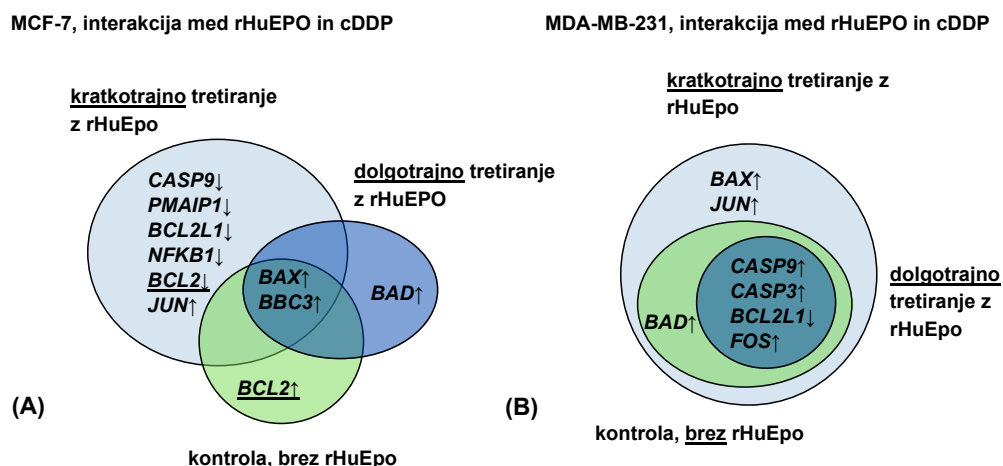
Gene expression for particular rHuEPO treatment (short, long-term) was normalized with gene expression in non-treated controls (no rHuEPO). Venn' diagrams represent differential gene expression at different rHuEPO treatments when compared to non-treated cells: (A) MCF-7 cells; (B) MDA-MB-231 cells. (↑) up-regulation; (↓) down-regulation; (underlined) genes with non-matching direction of change.

Pri celični liniji MCF-7 je zvišano izražanje genov *FOS* in *BCL2L1* ter znižano izražanje gena *JUN* neodvisno od dolžine tretiranja z rHuEPO. Največjo spremembo smo pri tej celični liniji opazili v izražanju gena *BCL2*, ki je zvišano po kratkotrajni izpostavitvi oziroma je znižano pri celicah, ki so bile dolgotrajno izpostavljene rHuEPO. Pri kratkotrajno izpostavljenih vzorcih smo pokazali še zvišano izražanje gena *CASP9*, medtem ko dolgotrajna izpostavitvev zviša izražanje genov *PMAIP1* in *NFKB1* oziroma zniža izražanje gena *BAD* (slika 49 A).

Kratkotrajno tretiranje celic MDA-MB-231 z rHuEPO poviša izražanje gena *BCL2L1* ter zniža izražanje več pro-apoptotskih genov (*BAD*, *BAX*, *JUN*, *BBC3* in *PMAIP1*). Po 9 tednih gojenja v prisotnosti rHuEPO postanejo celice MDA-MB-231 precej neodzivne na rHuEPO, saj smo pri teh celicah opazili le povečano izražanje gena *BAD* (slika 49 B).

Na sliki 50 so prikazani diferencialno izraženi geni po indukciji celic s cDDP, v odvisnosti od dolžine tretiranja z rHuEPO. Pri celicah MCF-7 cDDP zviša izražanje genov *BAX* in *BBC3*, neodvisno od tipa tretiranja z rHuEPO. Poleg tega zviša izražanje gena *BCL2* pri celicah, ki niso bile izpostavljene rHuEPO. Kratkotrajno tretiranje ter sledeča izpostavitve cDDP znižata izražanje *CASP9*, *PMAIP1*, *BCL2L1*, *BCL2* in *NFKB1* ter povišata izražanje gena *JUN*, medtem ko kombinacija dolgotrajnega tretiranja in izpostavitve cDDP zviša le izražanje gena *BAD* (slika 50 A). Celice MDA-MB-231 so manj odzivne na rHuEPO, tako

je diferencialno izražanje odvisno predvsem od izpostavitve cDDP. Slednji zviša izražanje genov *CASP9*, *CASP3*, *BAD* in *FOS* ter zniža izražanje gena *BCL2L1*. Kratkotrajno tretiranje z rHuEPO poviša izražanje genov *BAX* in *JUN*, torej so njegovi učinki precej manjši kot pri celični liniji MCF-7 (slika 50 B).



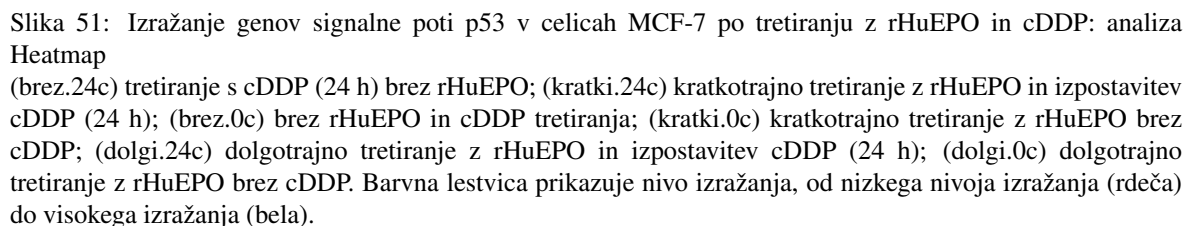
Slika 50: Diferencialno izraženi geni po izpostavitvi celic cisplatinu in tretiranju z rHuEPO

Celice smo različno dolgo tretirali z rHuEPO (brez, kratkotrajno in dolgotrajno), jih izpostavili cDDP ter določili diferencialno izražene geni med posameznimi skupinami vzorcev, ki smo jih normalizirali z izražanjem genov pri netretiranih vzorcih. Vennovi diagrami predstavljajo razlike v diferencialno izraženih genih po izpostavitvi celic cDDP ter v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO; (A) celice MCF-7; (B) celice MDA-MB-231. (↑) Izražanje gena v vzorcu je povišano v primerjavi s kontrolo; (↓) izražanje gena v vzorcu je znižano v primerjavi s kontrolo. Smer spremembe pri podčrtanih genih je različna.

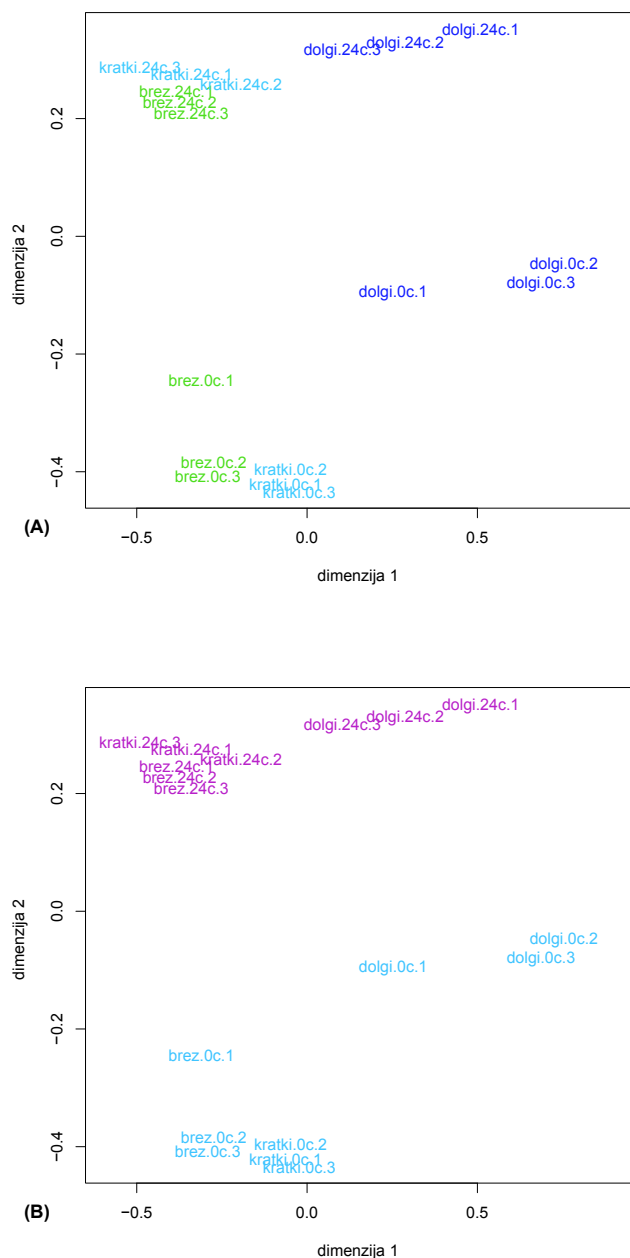
Figure 50: Differential gene expression after exposure to cisplatin at different rHuEPO treatments

Gene expression for particular treatment was normalized with gene expression in cells that were not exposed to cDDP or treated with rHuEPO. Venn' diagrams represent differential gene expression in cells that were exposed to cDDP at different rHuEPO treatments (no treatment, short and long-term): (A) MCF-7 cells; (B) MDA-MB-231 cells. (↑) up-regulation; (↓) down-regulation; (underlined) genes with non-matching direction of change.

Preliminarni rezultati so nas spodbudili k širši analizi mehanizmov uravnavanja izražanja genov z rHuEPO in cDDP. V ta namen smo uporabili qPCR ploščice StellarArray proizvajalca Lonza, ki pokrivajo gene signalne poti p53. V analizi smo uporabili le celice MCF-7, saj so se v primerjavi s celicami MDA-MB-231 izkazale kot boljši model za analizo vloge rHuEPO v mehanizmih od cDDP posredovane citotoksičnosti. Glede na izražanje genov se vzorci lepo ločijo v odvisnosti od izpostavitve cDDP (slika 52 B) ter tudi v odvisnosti od dolžine rHuEPO tretiranja (slika 52 A). Pri celicah, ki niso bile tretirane z rHuEPO in tistih, ki so bile kratkotrajno izpostavljene, je izražanje genov podobno. Večje razlike opazimo pri celicah, ki so bile dolgotrajno tretirane z rHuEPO (slika 51).



(brez.24c) cells, treated with rHuEPO and cDDP (24 h); (kratki.24c) cells, exposed to short-term rHuEPO and cDDP (24 h); (brez.0c) cells that were not exposed to rHuEPO or cDDP; (kratki.0c) short-term rHuEPO treatment but no cDDP; (dolgi.24c) long-term rHuEPO treatment and exposure to cDDP (24 h); (dolgi.0c) long-term rHuEPO treatment but no cDDP. Colour legend represents the level of expression with red colour representing the lowest level and white colour representing the highest level of expression.



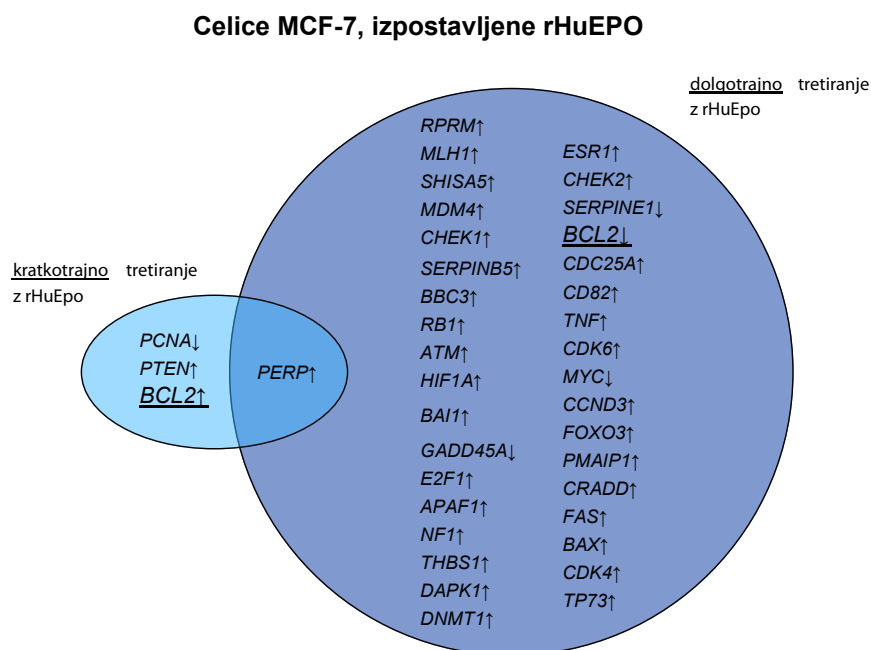
Slika 52: Večrazsežnostno lestvičenje vzorcev celic MCF-7 po tretiranju z rHuEPO in cDDP glede na izražanja genov signalnih poti p53

(A) Barvanje glede na tretiranje z rHuEPO: (zelena) brez rHuEPO; (svetlo modra) kratkotrajni rHuEPO; (temno modra) dolgotrajni rHuEPO. (B) Barvanje glede na izpostavitve cDDP: (svetlo modra) brez cDDP tretiranja; (vijolična) tretiranje s cDDP (24 h).

Figure 52: Multidimensional scaling of samples upon expression of p53-dependent genes

(A) Coloring according to rHuEPO treatment: (green) no rHuEPO; (light blue) short-term rHuEPO; (dark blue) long-term rHuEPO. (B) Coloring according to cDDP treatment: (light blue) no cDDP; (purple) cDDP treatment (24 h).

Na sliki 53 so prikazani diferencialno izraženi geni glede na tretiranje z rHuEPO. Za normalizacijo rezultatov smo uporabili dva referenčna gena, *RCHY1* in *CASP8*, ki sta se v danih pogojih izkazala kot najbolj stabilna.



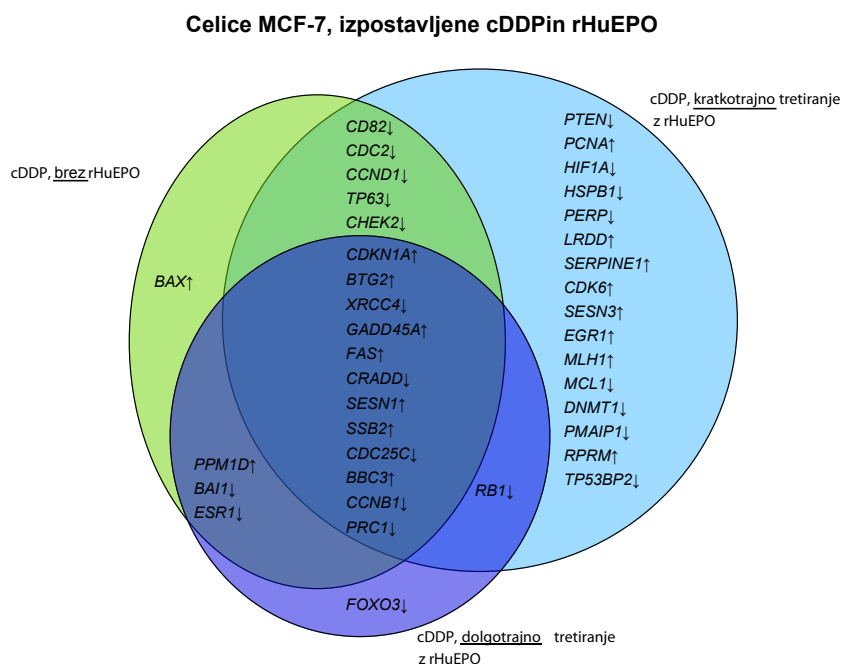
Slika 53: Analiza izražanja genov signalne poti p53: diferencialno izražani geni glede na tretiranje z rHuEPO. Izražanje genov za posamezni rHuEPO tretma (kratkotrajni in dolgotrajni) smo normalizirali z izražanjem genov pri netretiranih vzorcih (brez rHuEPO). Vennovi diagrami predstavljajo razlike v diferencialno izraženih genih po kratkotrajnem in dolgotrajnem tretiranju celic MCF-7 z rHuEPO. (↑) izražanje gena v vzorcu je povišano v primerjavi s kontrolo; (↓) izražanje gena v vzorcu je znižano v primerjavi s kontrolo. Smer spremembe pri podčrtanih genih je glede na tretiranje z rHuEPO različna.

Figure 53: Analysis of the p53-dependent gene expression: genes that are differentially expressed upon rHuEPO treatment

Gene expression for a particular rHuEPO treatment (short and long-term) was normalized with the expression in non-treated samples (no rHuEPO). Venn' diagrams represent differentially expressed genes at different rHuEPO treatments in MCF-7 cells. (↑) up-regulation; (↓) down-regulation; (underlined) genes with non-matching direction of change.

Analiza diferencialnega izražanja genov je pokazala, da dolgotrajno tretiranje z rHuEPO spremeni izražanje velikega števila genov signalne poti p53, medtem ko je kratkotrajni rHuEPO spremenil izražanje le nekaj genov. Najbolj zanimiva je sprememba v izražanju gena *BCL2*, katerega izražanje je povišano pri kratkotrajnem tretiranju z rHuEPO oziroma je znižano pri dolgotrajnem tretiranju. Skupno obema tretmajema je povišano izražanje gena *PERP* (slika 53).

Na sliki 54 so prikazani diferencialno izraženi geni po izpostavitvi celic MCF-7 cDDP, v odvisnosti od rHuEPO tretiranja (brez, kratkotrajno in dolgotrajno). Največ diferencialno izraženih genov smo opazili pri celicah, ki so bile kratkotrajno izpostavljene rHuEPO in cDDP.



Slika 54: Analiza izražanja genov signalne poti p53: diferencialno izraženi geni glede na izpostavitve cisplatinu, v odvisnosti od rHuEPO tretiranja

Celice, tretirane z rHuEPO (brez, kratkotrajno in dolgotrajno), smo izpostavili cDDP ter določili diferencialno izražene gene med posameznimi skupinami vzorcev. Vrednosti izražanja genov za posamezni vzorec smo normalizirali z izražanjem genov pri netretiranih kontrolah. Vennovi diagrami predstavljajo razlike v diferencialno izraženih genih po izpostavitvi celic MCF-7 cDDP, v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO. (↑) izražanje gena v vzorcu je povečano v primerjavi s kontrolo; (↓) izražanje gena v vzorcu je znižano v primerjavi s kontrolo. Smer spremembe pri podčrtanih genih je glede na tretiranje z rHuEPO različna.

Figure 54: Analysis of the p53-dependent gene expression: differentially expressed gene after exposure to cisplatin at different rHuEPO treatments

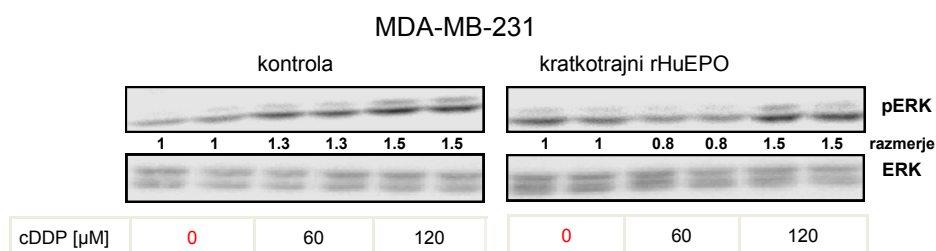
Gene expression for a particular treatment was normalized with the expression in corresponding control samples. Venn' diagrams represent differentially expressed genes in MCF-7 cells that were exposed to cDDP at different rHuEPO treatments. (↑) up-regulation; (↓) down-regulation; (underlined) genes with non-matching direction of change.

S pomočjo podatkovne baze KEGG smo narisali povezave med diferencialno izraženimi geni glede na tip tretiranja. Slika 55 prikazuje celično signalizacijo v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO (kratkotrajni in dolgotrajni), medtem ko slika 56 prikazuje celično signalizacijo po izpostavitvi celic cDDP ter v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO. Na slikah so prikazani le diferencialno izraženi geni, ne pa tudi smer spremembe (povečano ali znižano izražanje).

Slednja je prikazana na slikah 53 in 54.

4.5.4 Analiza celične signalizacije na proteinskem nivoju

Na lizatih celic MCF-7 in MDA-MB-231, tretiranih z rHuEPO (brez, kratkotrajno in dolgotrajno) smo preverili aktivacijo signalnih poti MAPK in PI3K 4 h po izpostavitvi cDDP. Celice MCF-7 smo izpostavili 10 in 30 μM cDDP, celice MDA-MB-231 pa 60 in 120 μM cDDP. Fosforilacijo ERK (pERK) smo potrdili le v primeru celične linije MDA-MB-231. Rezultati so prikazani na sliki 57. Pri celicah, ki niso bile tretirane z rHuEPO, cDDP aktivira signalno pot MAPK, saj se količina fosforiliranega ERK (pERK) v primerjavi z netretiranimi vzorci poveča pri obeh koncentracijah citostatika. 60 μM cDDP v kombinaciji s kratkotrajnim tretiranjem z rHuEPO zniža razmerje pERK/ERK, medtem ko ga 120 μM cDDP zviša. Pri celicah, ki so bile dolgotrajno tretirane z rHuEPO, nismo zaznali razlik v nivoju fosforilacije ERK. V lizatih celic MCF-7 in MDA-MB-231 v danih pogojih nismo uspeli potrditi fosforilirane oblike AKT (podatki niso prikazani).

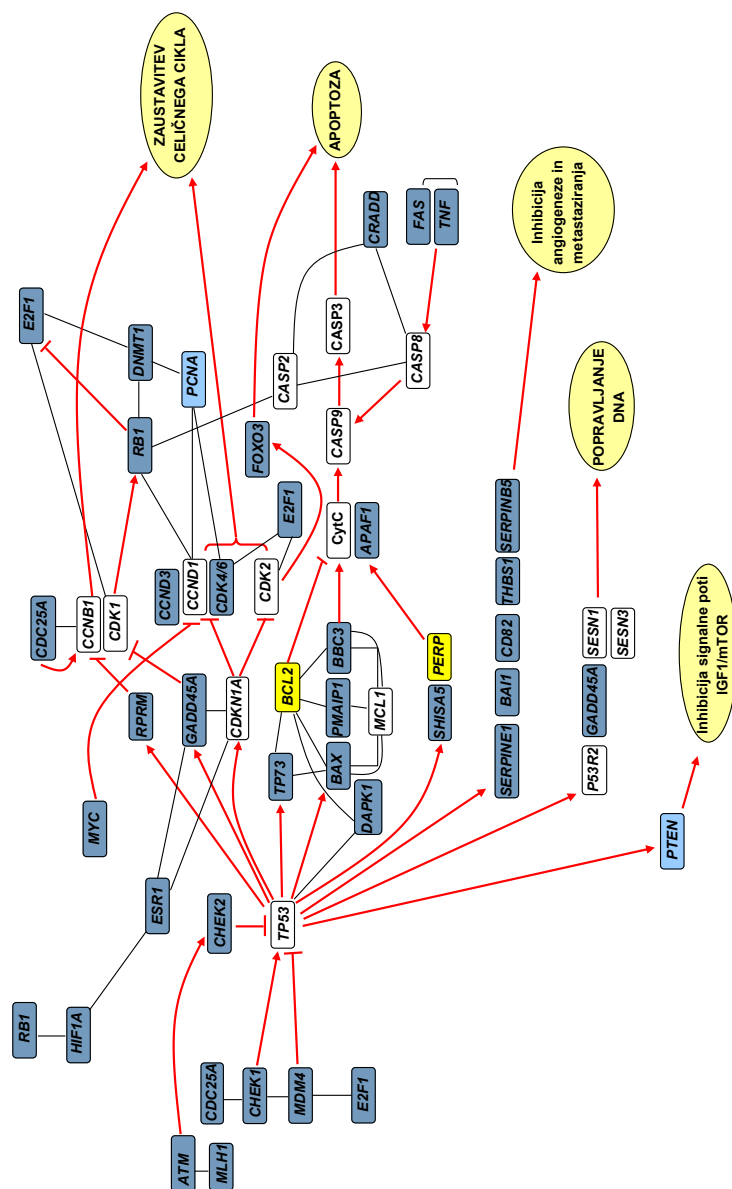


Slika 57: Fosforilacija proteina ERK (pERK) po tretiranju celic MDA-MB-231 z rHuEPO in izpostavitvi cisplatinu

Slika prikazuje nivo izražanja proteinov ERK in pERK v lizatu celic MDA-MB-231 po tretiranju z rHuEPO in cDDP (0, 60 in 120 μM). Z denzitometrično analizo smo določili razmerje med pERK in ERK (pERK/ERK) za posamezni vzorec in ga primerjali s kontrolnim. V preglednici so prikazana razmerja pERK/ERK.

Figure 57: ERK (pERK) phosphorylation upon rHuEPO treatment of MDA-MB-231 cells and exposure to cisplatin

ERK and pERK expression levels in MDA-MB-231 cells after rHuEPO and cDDP (0, 60 in 120 μM) treatments. Table shows pERK/ERK ratios which represent quantitative analysis of densitometric values of specific band intensities normalized to the value of the corresponding untreated controls, which was arbitrarily set to 1.

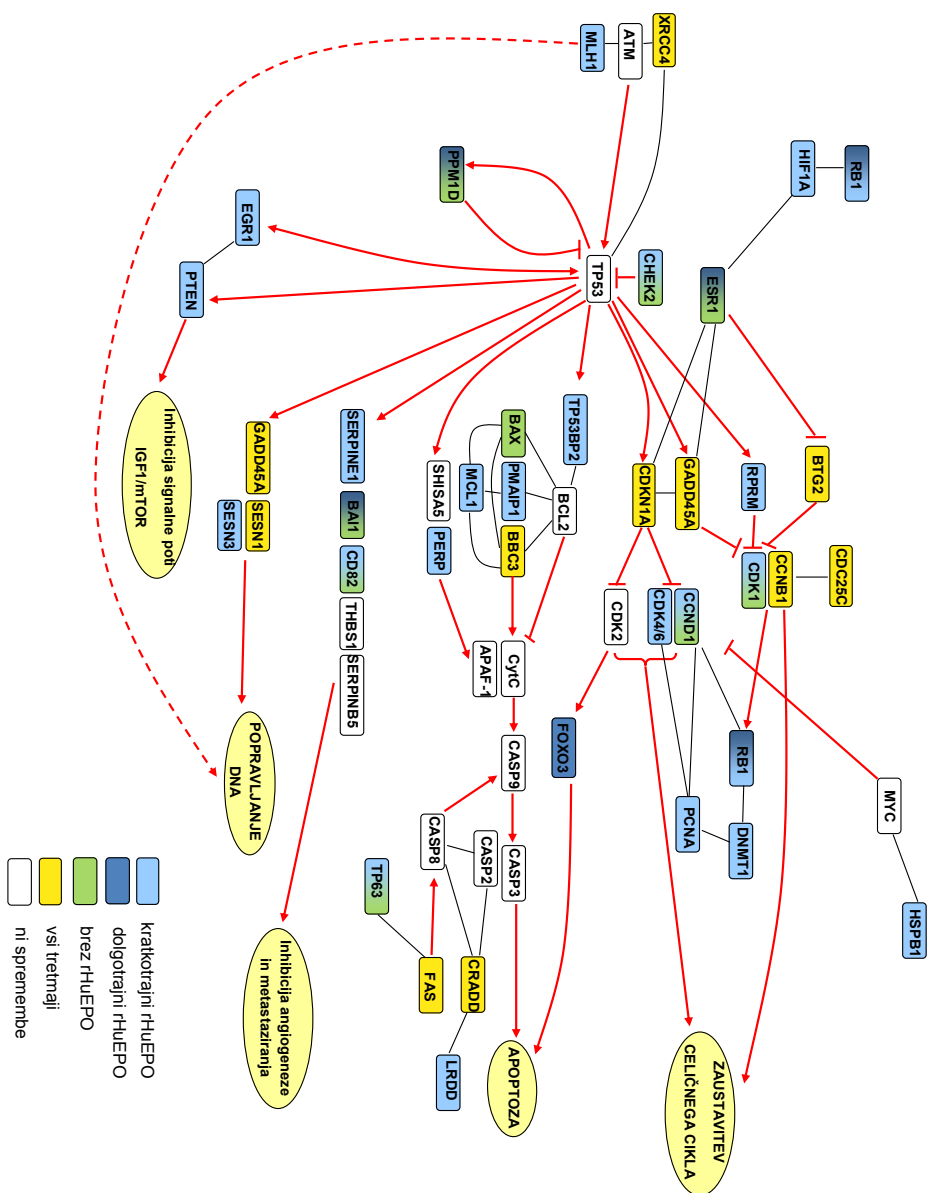


Slika 55: Signalizacija na nivoju transkripta v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO

Na podlagi podatkov iz podatkovne baze KEGG in diferencialno izraženih genov smo narisali signalizacijo v celicah MCF-7 v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO. Z Rdeče puščice prikazujejo smer spremembe, črne črte prikazujejo povezavo med geni.

Figure 55: Cell signaling on the transcriptomic level, dependent on the rHuEPO treatment

Pathway construction was based on the data from the KEGG database and genes that were differentially expressed upon cDDP and rHuEPO treatments. Genes that are common to all treatment groups are marked with yellow. The effect of long-term treatment is indicated by dark blue, while the impact of the short-term treatment is shown with light blue. White color indicates genes which expression was not influenced by rHuEPO treatment. Red arrows show the direction of the interaction, while black lines represent the connection between indicated genes.



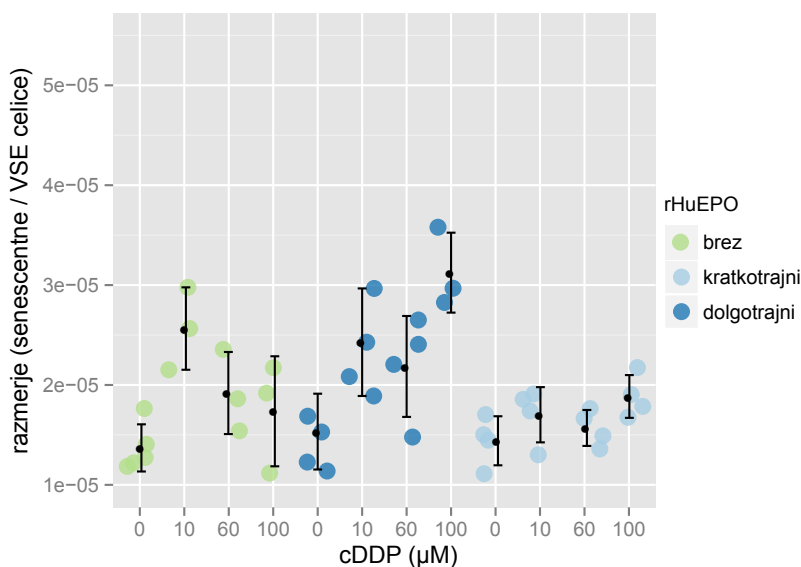
Slika 56: Signalizacija na nivoju transkriptoma v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO in cisplatinom. Na podlagi podatkov iz podatkovne baze KEGG in diferencialno izraženih genov smo našli signalizacijo v celicah MCF-7 v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO in cisplatinom. Z rumeno so označeni diferencialno izraženi geni, ki so skupni vsem tretmajem. Vpliv dolgotrajnega tretiranja z rHuEPO je označen s temno modro, medtem ko je vpliv kratkotrajnega tretiranja označen s svetlo modro barvo. Vpliv tretiranja s cisplatinom, neodvisen od rHuEPO, je označen z zeleno. Z belo barvo so označeni geni, pri katerih ni prišlo do spremembe. Rdeče puščice prikazujejo smer spremembe, črne črte prikazujejo povezavo med geni.

Figure 56: Cell signaling on the transcriptomic level, dependent on the rHuEPO and cDDP treatments

Pathway construction was based on the data from the KEGG database and genes that were differentially expressed upon rHuEPO and cDDP treatments. Genes that are common to all treatments are marked with yellow. The effect of long-term treatment is indicated by dark blue, while the impact of the short-term treatment is shown with light blue. The effect of cDDP treatment alone is shown with green. White color indicates genes which expression was not influenced by rHuEPO or cDDP treatments. Red arrows show the direction of the interaction, while black lines represent the connection between indicated genes.

4.5.5 Analiza senescence

Pri celicah MCF-7, tretiranih z rHuEPO (brez, kratkotrajno in dolgotrajno) in izpostavljenih cDDP, smo preverili število senescentnih celic. Celice smo najprej tretirali z rHuEPO ter jih nato izpostavili cDDP (10, 60 in 100 μM) za 24 h. Število senescentnih celic smo določili s štetjem. Za senescentne celice je značilna visoka aktivnost β -galaktozidaze, le-ta se ob prisotnosti substrata ABST obarva zeleno. Za vsak vzorec smo določili delež senescentnih celic: število senescentnih celic smo delili s številom vseh celic v vzorcu. Delež senescentnih celic pri rHuEPO tretiranih celicah (kratkotrajno in dolgotrajno) smo primerjali z deležem pri celicah, ki niso bile tretirane z rHuEPO. Rezultati analize so prikazani na sliki 58.



Slika 58: Vpliv tretiranja z rHuEPO na delež senescentnih celic MCF-7 po izpostavitvi cisplatinu
Slika prikazuje deleže senescentnih celic MCF-7 po tretiranju z rHuEPO in cDDP (24 h): (zelena) brez rHuEPO; (temno modra) dolgotrajno tretiranje z rHuEPO in (svetlo modra) kratkotrajno tretiranje z rHuEPO.

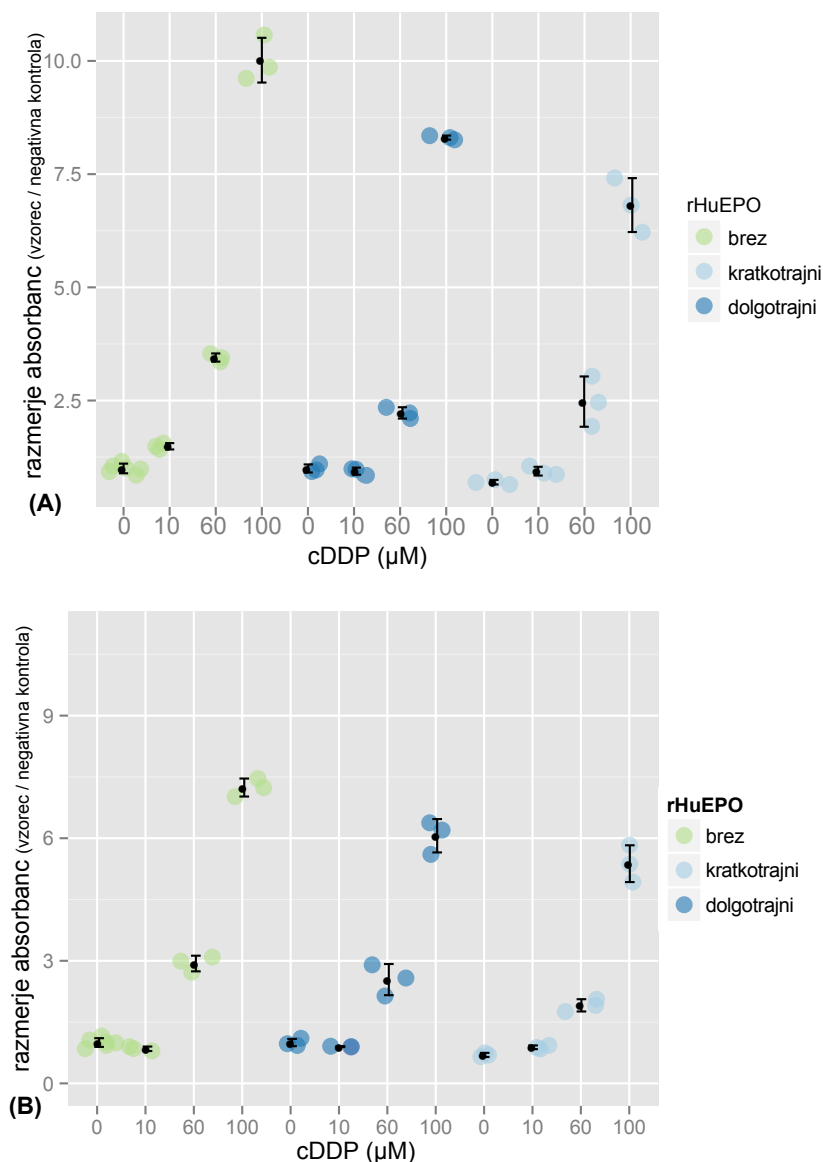
Figure 58: The effect of rHuEPO on the number of senescent MCF-7 cells after exposure to cisplatin
Portion of senescent MCF-7 cells after rHuEPO and cDDP (24 h) treatments: (green) no rHuEPO; (dark blue) long-term rHuEPO and (light blue) short-term rHuEPO treatment.

rHuEPO vpliva na število senescentnih celic pri celični liniji MCF-7 po izpostavitvi cDDP. Kratkotrajno tretiranje z rHuEPO statistično značilno ($p < 0.05$) zniža nivo senescence v primerjavi z dolgotrajnim tretiranjem, ne glede na uporabljeno koncentracijo citostatika. Podobno, kratkotrajno tretiranje zniža nivo senescence v primerjavi s kontrolnimi celicami (brez rHuEPO), vendar pa razlika ni statistično značilna. Pri dolgotrajno tretiranih celicah, izpostavljenih 100 μM cDDP, je delež senescentnih celic statistično značilno večji v primer-

javi z deležem pri kontrolnih celicah brez rHuEPO.

4.5.6 Analiza apoptoze

Viabilnost celic MCF-7, izpostavljenih rHuEPO in cDDP, je odvisna od dolžine tretiranja z rHuEPO (sliki 45 in 47). Zanimalo nas je ali razlike v viabilnosti celic lahko razložimo s spremembami v nivoju apoptoze in nekroze, zato smo ovrednotili vpliv rHuEPO na omenjena procesa. Celice smo najprej tretirali z rHuEPO ter jih nato izpostavili cDDP (10, 60 in 100 μM) za 24 h oziroma 48 h. Nivo apoptoze smo določili z metodo ELISA (ELISA-plus, Roche), in sicer smo *in vitro* ocenili količino/prisotnost mono- in oligonukleosomskih fragmentov DNA (fragmenti DNA s histoni). Nivo apoptoze smo določili tako, da smo vrednosti absorbance, izmerjene za posamezne vzorce, normalizirali z absorbanco pri kontrolnih celicah. Kontrolne celice niso bile izpostavljene cDDP in rHuEPO, vendar kljub temu vsebujejo določeno število mrtvih celic. Za kulture eksponentno rastočih celic je namreč značilna prisotnost majhne količine mrtvih celic (3-8 %). Rezultati analize so prikazani na sliki 59. rHuEPO (kratkotrajni in dolgotrajni) statistično značilno ($p < 0.05$) zniža nivo apoptoze pri vseh uporabljenih koncentracijah cDDP (10, 60 in 100 μM) v primerjavi s celicami, ki niso bile tretirane z rHuEPO (slika 59). rHuEPO torej neodvisno od časa izpostavitve zniža nivo apoptoze po tretiranju s cDDP. Po 48 h indukcije s cDDP je velik delež celic že odmrli, zato je relativni nivo apoptoze nižji v primerjavi s tistim po 24 h. rHuEPO in cDDP ne vplivata na nivo nekroze pri tretiranih celicah, saj je bila le-ta zelo nizka pri vseh analiziranih vzorcih in se v odvisnosti od tretiranja (z rHuEPO ali cDDP) ni spreminjala (rezultati niso prikazani).



Slika 59: Vpliv kratkotrajnega in dolgotrajnega tretiranja z rHuEPO na nivo apoptoze pri celicah MCF-7, izpostavljenih cisplatinu

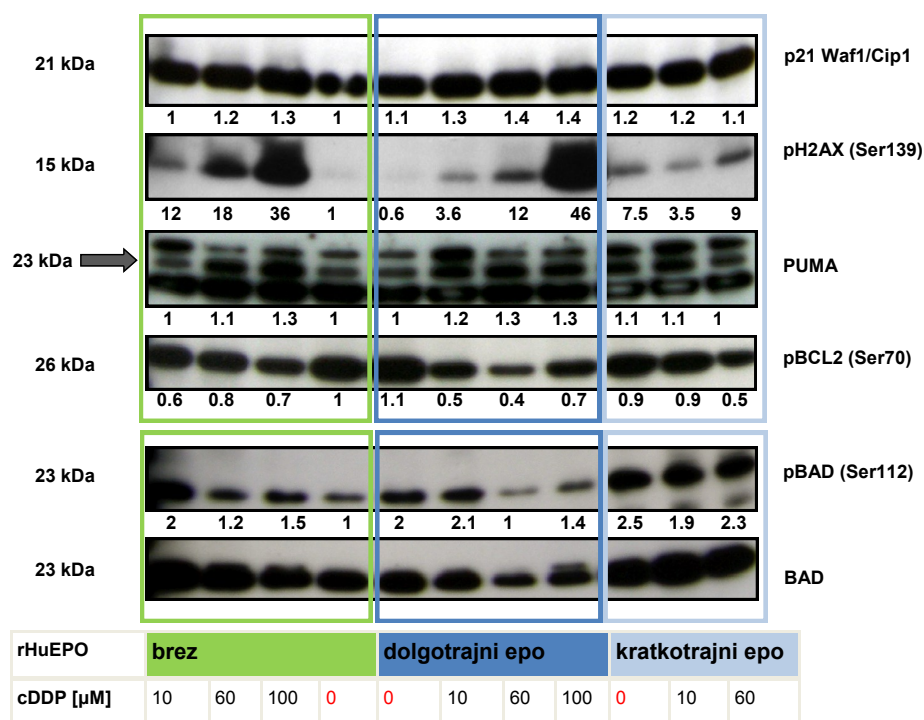
Nivo apoptoze pri posameznem vzorcu smo normalizirali z apoptozo pri kontrolnih celicah, ki niso bile tretirane z rHuEPO in cDDP. (A) 24 h izpostavitve cDDP; (B) 48 h izpostavitve cDDP

Figure 59: The effect of short and long-term rHuEPO on the level of apoptosis in MCF-7 cells, exposed to cisplatin

The absorbance levels for a particular sample (depending on rHuEPO treatment and exposure to cDDP) was normalized with the absorbance of control samples which were not exposed to cDDP or treated with rHuEPO. (A) 24 h exposure to cDDP; (B) 48 h exposure to cDDP.

4.5.7 Aktivacija signalnih poti, udeleženih v procese apoptoze, celičnega cikla ter popravljanje DNA

Na lizatih celic MCF-7, tretiranih z rHuEPO (brez, kratkotrajno in dolgotrajno) smo preverili aktivacijo procesov apoptoze (pBCL2, BAD, pBAD in PUMA), inhibicije celičnega cikla (p21waf1/Cip1) ter popravljanja DNA (pHA2X) po tretiranju z 10, 60 in 100 μ M cDDP. Rezultati so prikazani na sliki 60.



Slika 60: Izražanje proteinov p21 Waf1/Cip1, pH2AX, PUMA, BAD, pBAD in pBCL2 po tretiranju celic MCF-7 z rHuEPO in cisplatinom

Pri vsakem proteinu posebej smo densitometrične vrednosti za posamezno liso normalizirali z vrednostmi za kontrolni vzorec brez rHuEPO in cDDP tretiranja (razmerja so označena na sliki). V primeru pBAD smo pred normalizacijo s kontrolnim vzorcem vrednosti normalizirali še z izražanjem BAD. Analiza je bila narejena v sodelovanju s T. Zupančič in dr. M. Liović.

Figure 60: Expression of p21 Waf1/Cip1, pH2AX, PUMA, BAD, pBAD and pBCL2 proteins in the MCF-7 cells upon rHuEPO and cDDP treatment

Densitometric values for each of the proteins were normalized with the values for the control sample without rHuEPO and cDDP treatments (ratios are indicated in the figure). Expression of pBAD was prior to the normalization with the control sample normalized also with the expression of BAD. The analysis was performed in the collaboration with T. Zupančič and dr. M. Liović.

Analiza je pokazala majhne razlike v nivoju izražanja inhibitorja celičnega cikla p21 Waf1/Cip1, ki so odvisne od cDDP. Izražanje tega proteina se zvišuje z višanjem koncentracije cDDP. Fosforilacija proteinov BCL2 (pBCL2) in BAD (pBAD) se spreminja s koncentracijo

dodanega cDDP in je najvišja pri vzorcih brez dodanega citostatika. V primeru kratkotrajnega tretiranja z rHuEPO je fosforilacija proteina BAD neodvisna od koncentracije cDDP. Podobno je tudi izražanje proteina PUMA, ki je pri kratkotrajno tretiranih celicah bolj ali manj konstantno, medtem ko se pri ostalih dveh tretmajih (brez in dolgotrajno tretiranje z rHuEPO) izražanje tega proteina zvišuje v odvisnosti od koncentracije cDDP. Najopaznejše so spremembe v fosforilaciji proteina H2AX. Fosforilacija tega proteina se močno povečuje s koncentracijo dodanega cDDP in je hkrati odvisna tudi od tretiranja z rHuEPO. Dolgotrajno tretiranje z rHuEPO tako zniža od cDDP-odvisno fosforilacijo pH2AX pri 60 μ M cDDP oziroma jo poviša pri 100 μ M cDDP. Kratkotrajno tretiranje z rHuEPO poveča fosforilacijo tega proteina pri celicah, ki niso izpostavljene cDDP.

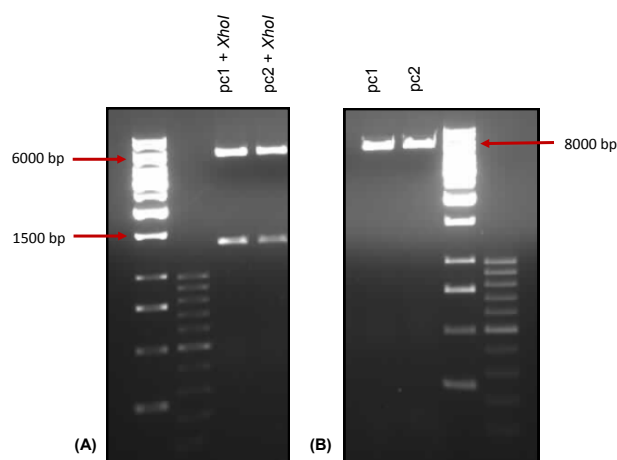
4.6 IDENTIFIKACIJA CELIC S POVIŠANIM IZRAŽANJEM EPOR

4.6.1 Restriksijska analiza *EPOR* po vključitvi v plazmidni vektor pcDNA3.1/V5-His TOPO

Gen *EPOR* smo s polimerazno verižno reakcijo (PCR) in ustreznimi oligonukleotidnimi začetniki (preglednica 19) pomnožili, fragment pa nato ligirali v plazmidni vektor pcDNA3.1/V5-His TOPO. Plazmide smo namnožili v bakterijskem sevju *E.coli*, DH5 α . Pravilno orientacijo fragmenta *EPOR* v plazmidnemu vektorju smo preverili z restriksijsko analizo, pri kateri smo uporabili restriktazo *XhoI*. Transfekcijo humanih celic smo izvedli le s plazmidi z ustrezno orientacijo *EPOR*. Rezultati restriksijske analize so prikazani na sliki 61.

Celice T-47D in MCF-7 smo transfecirali s plazmidom pcDNA3.1/V5-His *EPOR*_w ter tako pripravili model humane celične linije raka dojke s povišanim izražanjem EPOR. Izražanje *EPOR* smo preverili z metodo qPCR (preglednica 23).

Celice z najvišjim izražanjem *EPOR* (M3 in T2) smo nadalje uporabili za selekcijo čistih klonov po metodi klonalnega razrasta ene celice. Princip metode je opisan v 3.10.6. Tako smo želeli iz mešanih populacij celic M3 in T2 izolirati klone z različnim nivojem izražanja *EPOR*. V prvem krogu selekcije z izolacijo nismo uspeli, saj z metodo prenosa western nismo uspeli potrditi višjega izražanja EPOR (rezultati niso prikazani). Za detekcijo smo uporabili protitelo anti-EPOR (preglednica 17). Selekcijo ponavljamo.



Slika 61: Restriksijska analiza plazmidnega vektorja pcDNA3.1/V5-His *EPOR*wt

Plazmidni vektor pcDNA3.1/V5-His *EPOR*wt (pc1 in pc2) smo cepil z restriktazo *XhoI*, ki 1-krat cepi znotraj plazmida in 1-krat znotraj gena *EPOR*. Rezultat cepitve sta dva specifična fragmenta, velikosti 6819 in 1199 bp, preko katerih lahko sklepamo na orientacijo *EPOR* v plazmidnem vektorju. (A) Cepitev z *XhoI*, fragmenta velikosti 6819 in 1199 bp; (B) necepljen plazmidni vektor (8018 bp).

Figure 61: Restriction analysis of pcDNA3.1/V5-His *EPOR*wt vector

pcDNA3.1/V5-His *EPOR*wt plasmid vector (pc1 and pc2) was cleaved with restriction enzyme *XhoI*. Cleavage with *XhoI* generates 2 fragments with the size of 6819 and 1199 bp. The size is specific and can be used to infer the orientation of *EPOR* in the plasmid vector. (A) Restriction with *XhoI* generating fragments 6819 and 1199 bp of size; (B) intact plasmid (8018 bp).

Preglednica 23: Izražanje gena *EPOR* v celicah po transfekciji s plazmidnim vektorjem pcDNA3.1/V5-His *EPOR*wt

Cp vrednosti za izražanje *EPOR* v izvornih (MCF-7 in T-47D) celicah ter v celicah po transfekciji. M1-3 so celice MCF-7 po transfekciji, T1-4 pa celice T-47D po transfekciji s pcDNA3.1/V5-His *EPOR*wt.

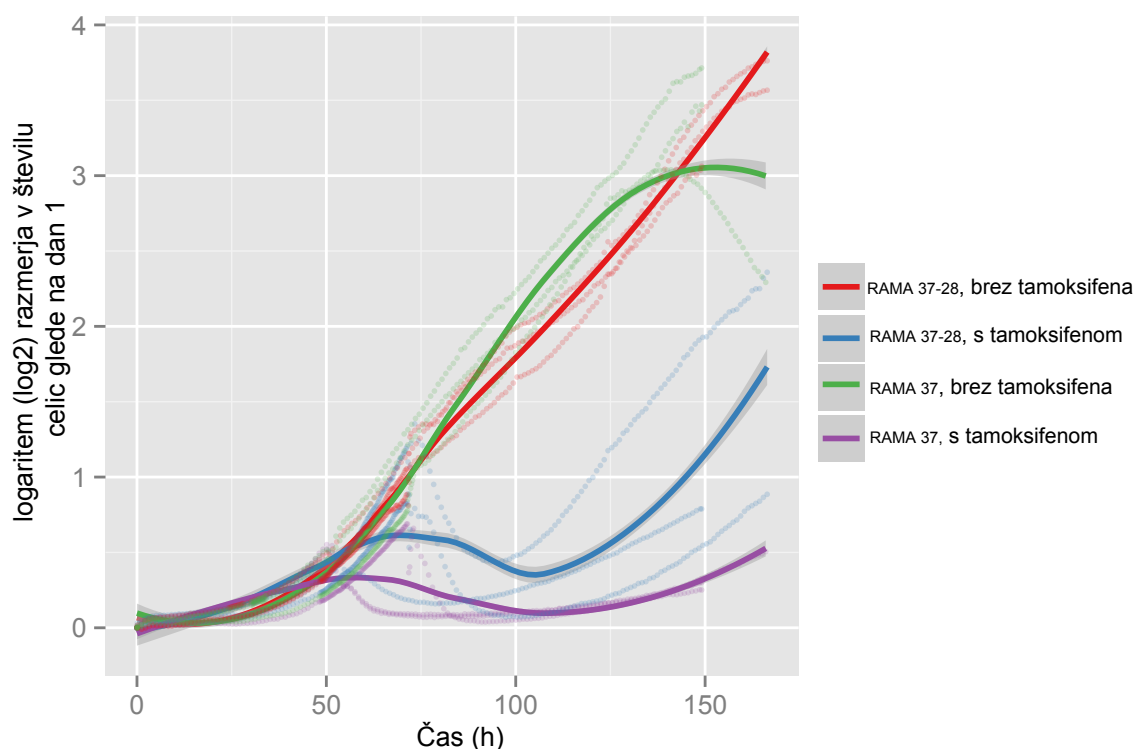
Figure 23: *EPOR* gene expression in cells after transfection with pcDNA3.1/V5-His *EPOR*wt plasmid

Cp values for the *EPOR* expression in parental (MCF-7 and T-47D) cells and those undergoing transfection. M1-3 are populations of MCF-7 cells that underwent transfection, T1-4 are T-47D cells that underwent transfection with pcDNA3.1/V5-His *EPOR*wt.

celična linija	<i>Cp</i>
MCF-7	31
M1	28
M2	27
M3	26
T-47D	29
T1	27
T2	24
T3	25
T4	26

4.7 VLOGA EPOR PRI CELIČNEM ODGOVORU NA TAMOKSIFEN

S preliminarno študijo, v kateri smo uporabili celice RAMA 37 in RAMA 37-28, smo preverili vpliv visokega izražanja EPOR na celični odgovor na TAM. Celice RAMA 37-28 so klon celic RAMA 37 s povišanim izražanjem EPOR. Obe celični liniji smo tretirali s 4-hidroksi tamoksifenom (4-OH-TAM), ki je aktivni derivat TAM. Viabilnost celic v odvisnosti od tretiranja s 4-OH-TAM smo spremljali v realnem času (XCELLigence). Meritev smo izvajali 5 dni. Rezultati kažejo, da je viabilnost celic RAMA 37-28 po tretiranju s 4-OH-TAM statistično značilno večja ($p < 0.05$) v primerjavi z viabilnostjo celic RAMA 37 (slika 62).



Slika 62: Viabilnost celic RAMA 37 in RAMA 37-28 po tretiranju s tamoksifenom

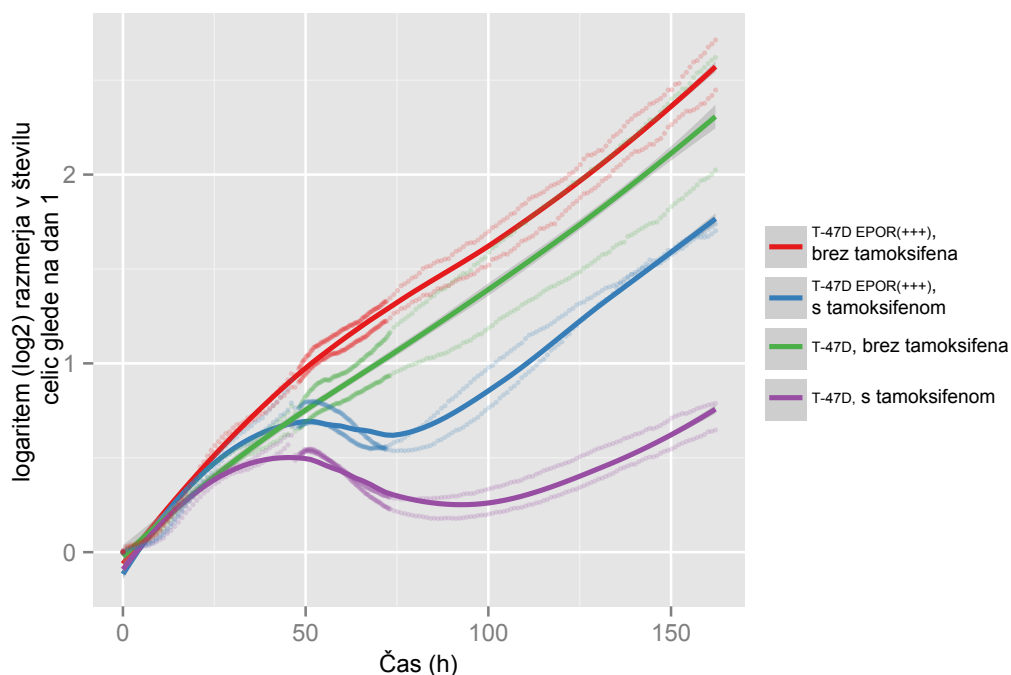
Slika prikazuje 3 neodvisne poskuse, vsak izmed njih je prikazan s črtkano črto (šibkejše barve). Polna črta (močnejše barve) predstavlja povprečje treh meritev.

Figure 62: RAMA 37 and RAMA 37-28 cell viability after exposure tamoxifen

Figure represents 3 independent measurements, each of them is represented with a dotted line (light color). Full line (dark color) represents the average of three experiments.

Vpliv visokega izražanja EPOR smo preverili tudi na modelu humanih celic raka dojk s povišanim izražanjem EPOR. Ker čistih klonov še nismo uspeli pripraviti, smo vpliv TAM na celično viabilnost preverili v mešani populaciji celic T2 (T-47D^{EPOR+}). Rezultati analize

na sistemu XCELLigence so prikazani na sliki 63. Viabilnost celic T2 je statistično značilno večja ($p < 0.05$) od viabilnost izvornih celic T-47D po tretiranju s 4-OH-TAM.



Slika 63: Viabilnost celic T-47D in T2 ($T-47D^{EPOR+}$) po tretiranju s tamoksifenom

Slika prikazuje dva neodvisna poizkusa, vsak je prikazan s črtkasto črto (šibkejše barve). Polna črta (močnejše barve) predstavlja povprečje dveh meritev.

Figure 63: T-47D and T2 ($T-47D^{EPOR+}$) cell viability after exposure to tamoxifen

Figure represents two independent measurements, each of them is represented with a dotted line (light color). Full line (dark color) represents the average of two experiments.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Rekombinantni humani eritropoetin (rHuEPO) se v klinični onkologiji uporablja za zdravljenje anemij, ki se razvijejo kot posledica kemo- oziroma radioterapije. rHuEPO izboljšuje kvaliteto življenja pri bolnikih z rakom in zmanjšuje potrebo po transfuzijah. Kljub pozitivnim učinkom pri zdravljenju anemij je njegova uporaba v klinični onkologiji vprašljiva. Študije so namreč pokazale negativne učinke podporne terapije z rHuEPO na napredovanje bolezni in preživetje bolnikov (Tonelli in sod., 2009). Mehanizmi delovanja EPO še niso raziskani. Ena izmed hipotez predpostavlja vezavo eksogeno dodanega rHuEPO z njegovim receptorjem (EPOR) na tumorskih celicah ter posledično aktivacijo receptorja. Aktiviran EPOR naj bi tako moduliral rast tumorjev, predvsem preko zvišanja proliferacijskega potenciala tumorskih celic ter preko znižanega nivoja apoptoze. Signalizacija preko para EPO-EPOR naj bi tako pripomogla k razvoju tumorskih celic z večjo odpornostjo na različne tipe anti-tumorske terapije (Hedley in sod., 2011). Čedalje več študij opozarja na možnost interakcije para EPO-EPOR z drugimi receptorji za rastne faktorje. Izražanje EPOR v HER2 pozitivnih tumorjih deluje antagonistično na protitelo trastuzumab (Liang in sod., 2010), v ESR pozitivnih tumorjih pa negativno vpliva na terapijo s tamoksifonom (Larsson in sod., 2009). Povezava med EPO-EPOR in ESR je bila potrjena tudi na celičnih linijah raka dojk (Pelekanou in sod., 2010; Notas in sod., 2010, 2012), predvsem pa naj bi bila pomembna korelacija z membranskimi receptorji za estrogene (GPER).

Z doktorskim delom smo želeli prispevati k poznavanju mehanizmov delovanja rHuEPO na modelu raka dojk. Na modelnem sistemu celičnih linij smo najprej preverili izražanje EPOR na genskem in proteinskem nivoju ter celične linije še dodatno analizirali za izražanje receptorjev za estrogene (ESR, GPER) in progesteron (PGR). Signalizacija preko teh receptorjev je v literaturi že bila povezana s signalizacijo preko EPOR (Pelekanou in sod., 2007; Larsson in sod., 2009; Pelekanou in sod., 2010; Notas in sod., 2010, 2012). Vlogo rHuEPO na biologijo celic raka dojk smo preverili na nivoju celične proliferacije in klonogenosti, izražanja genov zgodnjega odziva in celičnega cikla ter tudi na nivoju aktivacije signalnih poti MAPK, PI3K in JAK2/STAT5. Nadalje nas je zanimala vloga rHuEPO v anti-tumorski terapiji s cisplatinom (cDDP). cDDP je v klinični onkologiji namreč eden izmed najbolj razširjenih citostatikov (Sancho-Martínez in sod., 2012; Cepeda in sod., 2007). Kombinacija tretiranja z rHuEPO in cDDP pripomore k razvoju agresivnejših fenotipov celic raka materničnega vratu (Belenkov in sod., 2004), na modelu raka dojk pa do sedaj še ni bila pokazana povezava med rHuEPO in cDDP (Gewirtz in sod., 2006). Vlogo rHuEPO v mehanizmih

citotoksičnosti, posredovane s cDDP smo preverili na nivoju celične viabilnosti, izražanja od p53-odvisnih genov, aktivacije apoptoze oziroma senescence ter mehanizmov popravljanja DNA. Ker naša hipoteza predpostavlja interakcijo med signalnimi potmi EPOR in ESR oziroma GPER smo analizirali tudi vlogo povišanega izražanja EPOR na odpornost celic, tretiranih s tamoksifenom (TAM).

5.1.1 Karakterizacija modelnega sistema: celične linije raka dojke

Rak dojke je eden najpogostejših tipov raka pri ženskah v zahodnem svetu in tako predstavlja pomemben zdravstveni problem. Receptorja za estrogene (ESR) in progesteron (PGR) sta pomemben faktor pri razvoju bolezni in predstavljata osnovni napovedni faktor za izbor ustrezne terapije (Osborne in sod., 1980). Na podlagi izražanja ESR in PGR raka dojke delimo v dve skupini, hormonsko-odvisno (ESR+/PGR+) in hormonsko-neodvisno (ESR-/PGR-). Dodatni klasifikacijski in prognostični faktor predstavlja tudi izražanje receptorja HER2 (Ross in Fletcher, 1998), pri ESR+/PGR+ tumorjih pa tudi EPOR (Larsson in sod., 2009). V patologiji raka dojke je pomembna tudi vloga membransko vezanih receptorjev za estrogene (GPER) in njihove povezave tako z jedrnimi ESR kot tudi z družinami receptorjev EGFR (angl. Epidermal Growth Factor Receptor) in GPCR (angl. G-Protein Coupled Receptor) (Vasudevan in Pfaff, 2007). Študije torej kažejo, da pri raku dojke obstaja aktivna interakcija med EPO signalizacijo, receptorji za steroide (ESR, GPER) ter receptorji EGFR, ki tako tvorijo zapleteno znotrajcelično mrežje. Za študije mehanizmov delovanja je torej uporaba ustreznih modelov ključnega pomena. V izbranih celičnih linijah raka dojke (preglednica 3) smo zato ovrednotili izražanje genov *EPO* in *EPOR*, nekatere izmed receptorjev za steroide (*ESR1*, *ESR2*, *PGR* in *GPER*) ter receptorjev *CSF2RB* in *EPHB4*, ki sta v literaturi že bila opisana kot morebitna receptorska partnerja EPOR (Konstantinopoulos in sod., 2007; Brines in sod., 2004; Brines in Cerami, 2005).

Na rezultatih analize izražanja genov smo najprej izvedli hierarhično gručanje celičnih linij, pri čemer smo za konstrukcijo dendrograma upoštevali Evklidsko razdaljo. Celične linije so se ločile na hormonsko-odvisno in hormonsko-neodvisno gručo (slika 20). Celice MCF-7, MDA-MB-361 in T-47D predstavljajo model hormonsko-odvisnega raka dojke, medtem ko celične linije MDA-MB-231, SKBR3, Hs578T, MCF-10A in Hs578Bst kažejo različne stopnje hormonske-neodvisnosti. Nadalje smo za izražanje omenjenih genov izračunali Pearsonove korelacijske koeficiente (preglednica 22) ter v naboru genov potrdili več korelacij. *EPOR* in *EPHB4* sta izražena v vseh analiziranih celičnih linijah, kar je v skladu z že objavljeno literaturo (Acs in sod., 2001; Kumar in sod., 2006). V izražanju obeh receptorjev obstaja pozitivna korelacija ($r = 0.385$, preglednica 22), kar nakazuje na možnost sodelovanja

obeh receptorjev v procesih signalizacije. *CSF2RB* je izražen le v nekaterih izmed analiziranih celičnih linij in kaže negativno korelacijo z izražanjem *EPOR* ($r = -0.708$, preglednica 22), torej vzbuja dvome o sodelovanju tega receptorja pri tvorbi heteroreceptorskega kompleksa *EPOR-CSF2RB*. Rezultati tudi ne podpirajo hipoteze o avtokrinem delovanju endogenega EPO, saj je celična linija SKBR3 edina, v kateri smo uspeli potrditi nizek nivo izražanja *EPO*.

Izražanje *ESR* (*ESR1* in *ESR2*) ter *PGR* v analiziranih celičnih linijah le delno sovпада s podatki iz podatkovne baze ATCC (preglednica 3). Različno izražanje smo pokazali za celične linije MDA-MB-361, Hs578Bst, MCF-10A in Hs578T (slika 19), najverjetneje zaradi različnih metod detekcije. ATCC baza hrani podatke imunohistokemijske analize izražanja, medtem ko smo v naši analizi izražanje preverili izključno na genskem nivoju, ki ne sovпада vedno z izražanjem funkcionalnega proteina. Izražanje genov *ESR* močno korelira z izražanjem genov *PGR* ter v manjši meri tudi z *GPER*. Pozitivna korelacija v izražanju *ESR1* in *GPER2* ($r = 0.443$, preglednica 22) potrjuje možnost interakcije obeh receptorjev na površini celice. Omenjena interakcija je že bila pokazana pri raku endometrija in ovarijev ter v keratinocitih, v katerih je stimulacija celic z 17β -estradiolom povišala izražanje genov *FOS* in *CCND1* ter tako stimulirala celično proliferacijo (Vivacqua in sod., 2006; Albanito in sod., 2007; Kanda in Watanabe, 2004). Na modelu celičnih linij nismo uspeli potrditi pozitivne korelacije v izražanju genov *EPOR*, *ESR* in *PGR*, ki je že bila pokazana na proteinskem nivoju (Larsson in sod., 2009). Pokazali smo pozitivno korelacijo med *EPOR* in *GPER* ($r = 0.549$, preglednica 22), kar sovпада s hipotezo o povezavi med signalnimi potmi EPO-EPOR in GPER (Pelekanou in sod., 2007; Notas in sod., 2012).

5.1.2 Povezava med izražanjem receptorjev za rastne faktorje in odzivnostjo na rHu-EPO

Glede na rezultate korelacijske analize smo izbrali ustrezne modelne celične linije, ki smo jih nadalje uporabili za študije celične odzivnosti na tretiranje z rHuEPO. Celični liniji MCF-7 in T-47D, ki izražata *ESR* in *PGR* smo izbrali kot modela hormonsko-odvisnega raka dojke. Obe celični liniji se medsebojno razlikujeta v nivoju izražanja *GPER*. Slednji je visoko izražen v celicah MCF-7 in nizko izražen v celicah T-47D. Celična linija MDA-MB-231, z *ESR(+)/PGR(-)* in *GPER(+)* genotipom, predstavlja model delne hormonske-odzivnosti. Celice SKBR3 in Hs578T smo uporabili kot model hormonsko-neodvisnega raka dojke, kljub nizkemu izražanju *ESR2*. V izbranih celičnih linijah smo preverili izražanje EPOR tudi na proteinskem nivoju. V analizo smo vključili tudi celični liniji RAMA 37 in RAMA 37-28, pri katerih je bilo izražanje tega proteina že potrjeno (Shi in sod., 2010). Celična linija

UT7/EPO je od EPO odvisna in smo jo v analizi izražanja proteina EPOR uporabili kot pozitivno kontrolo. Izražanje proteina EPOR smo potrdili v vseh celičnih linijah (slika 23). Različne študije na nivoju celičnih linij ter tudi tumorskega tkiva so pokazale pro-proliferativne učinke administracije rHuEPO (Acs in sod., 2001; Arcasoy in sod., 2005). Modelne celične linije smo zato izpostavili rHuEPO ter preverili njegov vpliv na nivo proliferacije. Z uporabo testov metabolne aktivnosti v danih pogojih nismo uspeli potrditi vpliva rHuEPO na proliferacijo celic MCF-7 in MDA-MB-231 (sliki 25 in 27). Obe celični liniji sicer kažeta določeno mero odzivnosti na rHuEPO, saj smo pri obeh celičnih linijah uspeli potrditi spremembe v fosforilaciji AKT, pri MDA-MB-231 pa tudi ERK (slika 42). Pri celični liniji T-47D smo potrdili anti-proliferativne učinke rHuEPO ($p < 0.05$) v osnovnem rastnem gojišču (slika 26), nismo pa zaznali spremembe v fosforilaciji ERK, AKT ali STAT5 (slika 42). Podobno, smo pri celičnih linijah SKBR3 in Hs578T pokazali anti-proliferativne učinke rHuEPO ($p < 0.05$) v gojišču z znižano koncentracijo serumskih rastnih faktorjev (1 % FBS), ne pa tudi v osnovnem rastnem gojišču (10 % FBS) (sliki 28, 29). Vpliv različnih koncentracije FBS smo analizirali zaradi morebitnega mitogenega sinergizma med rHuEPO in serumskimi rastnimi faktorji oziroma citokini. Pri obeh celičnih linijah rHuEPO spremeni fosforilacijo ERK in AKT. Pri celicah SKBR3 se nivo fosforilacije poveča, medtem ko se le-ta zmanjša pri celicah Hs578T (slika 42). Fosforilacija STAT5 je celično-specifična in smo jo uspeli potrditi le pri celični liniji SKBR3. rHuEPO ne spremeni proliferacije celic RAMA 37 (slika 30) in RAMA 37-28 (slika 31), je pa udeležen v aktivacijo signalnih poti MAPK in PI3K v celični liniji RAMA 37-38 (slika 43). Celice RAMA 37-28 so klon celic RAMA 37 s povišanim izražanjem EPOR in se v proliferacijskem ter tudi klonigenemu potencialu razlikujejo od izvornih celic RAMA 37. Povišano izražanje EPOR zniža njihov proliferacijski potencial ($p < 0.05$, slika 32) ter zviša njihovo klonigeno sposobnost ($p < 0.05$, slika 36 B). Višja klonigena sposobnost celic RAMA 37-28 se odraža v večjem številu majhnih kolonij v primerjavi z izvornimi celicami RAMA 37.

Nadalje smo s testi klonigenosti (CFA, angl. Colony Formation Assay) preverili vpliv rHuEPO na klonigeni in proliferacijski potencial celic. Testi CFA omogočajo spremljanje celične rasti v daljšem časovnem obdobju (14 dni za razliko od 6 dni pri testih metabolne aktivnosti). Pri celičnih linijah MCF-7 ($p < 0.05$, slika 33) in Hs578T ($p < 0.05$, slika 35) smo pokazali negativne učinke rHuEPO (12 dnevna izpostavitve) na proliferacijo in klonigenost, medtem ko v celičnih linijah MDA-MB-231 (slika 34), RAMA 37 in RAMA 37-28 (slika 36) rHuEPO ni imel opaznega učinka, saj sta proliferacija in klonigenost teh celic ostali primerljivi tistima v netretiranih celicah. V klinični onkologiji se rHuEPO najpogosteje uporablja za preprečevanje razvoja s kemoterapijo posredovane anamije, v obliki preventivne ali podporne terapije. Preventivna terapija z rHuEPO se začne že pred začetkom zdravljenja s

kemoterapijo in se nadaljuje tekom celotnega zdravljenja, saj se tako zmanjša verjetnost za padec v nivoju hemoglobina ter potencialno potrebo po krvni transfuziji. Podporna terapija se začne po začetku zdravljenja s kemoterapijo ter se nato, podobno kot preventivna terapija, nadaljuje tekom celotnega zdravljenja (Del Mastro in sod., 1997; ten Bokkel Huinink in sod., 1998). V obeh primerih gre torej za dolgotrajno (t.i. kronično) terapijo z rHuEPO. V naši študiji smo se želeli približati uporabi rHuEPO v klinični onkologiji, zato smo celice raka dojke dolgotrajno tretirali z rHuEPO. Vpliv dolgotrajne izpostavitve rHuEPO na klonigeni in proliferacijski potencial smo preverili pri celicah MCF-7 in MDA-MB-231, ki smo jih z rHuEPO (pred-)tretirali 9 tednov. rHuEPO je statistično značilno povečal proliferacijo in klonigeni potencial celic MCF-7 ($p < 0.05$, slika 33), ni pa imel učinka na celice MDA-MB-231 (slika 34). Celice MDA-MB-231 z genotipom ESR+/PGR- predstavljajo agresivnejšo obliko raka dojke, ki se lažje prilagodi na rastne faktorje iz okolja in je zato nanje tudi manj odzivna (Cui in sod., 2005). V celicah MDA-MB-231 smo pokazali konstitutivno aktivacijo signalne poti MAPK, ki je sicer pri dolgotrajno tretiranih celicah precej nižja (2.5-krat) v primerjavi s kratkotrajno tretiranimi (slika 44), kljub temu pa dovolj visoka, da žene celično proliferacijo na najvišjem nivoju. Tako lahko sklepamo, da je neodzivnost celic MDA-MB-231 na rHuEPO posledica zasičenosti signalne poti MAPK oziroma modulacije delovanja citosolne fosfolipaze A2 (Mariggio in sod., 2006). Glede na rezultate predlagamo časovno odvisno delovanje signalnega para EPO-EPOR in predpostavljamo, da dolgotrajno tretiranje z rHuEPO selekcioniira celične klone, z višjim proliferacijskim in klonigenim potencialom.

Izražanje genov zgodnjega odziva Aktivacijo EPOR smo dodatno preverili tudi na nivoju izražanja genov zgodnjega odziva, ki so sicer udeleženi v primarni odziv celic na številne signale. Predstavljajo mehanizem celičnega odgovora, ki se sproži na transkripcijski ravni, preden se sproži proces prevajanja proteinov. Geni zgodnjega odziva običajno sodelujejo v procesih celične rasti in diferenciacije. V celičnih linijah MCF-7, T-47D, MDA-MB-231, Hs578T in SKBR3 smo analizirali izražanje genov *FOS*, *EGR1*, *JUN*, *NFKB1* in *FOSL1*. Pri vseh analiziranih celicah smo potrdili spremembe v izražanju omenjenih genov, med najbolj očitnimi pa so bile spremembe v izražanju *FOS* in *ERG1*. Transkripcijska faktorja FOS in EGR1 sodelujeta v procesih celične diferenciacije in mitogeneze (Pratt in sod., 1998; Lu in sod., 2005), FOS pa je vključen tudi v procese proliferacije, regulacije hipoksije in angiogeneze (Liu in sod., 2002). Izražanje gena *EGR1* je dodatno regulirano preko receptorjev GPER, sam protein pa naj bi imel pomembno vlogo v modulaciji bioloških učinkov 4-hidroksi tamoksifena (4-OH-TAM). EGR1 ima pomembno vlogo pri regulaciji prepisovanja genov *CTGF* in *CCND1*, ki sta udeležena v agonistične učinke 4-OH-TAM (Vivacqua in sod., 2006).

5.1.3 Vpliv rHuEPO na viabilnost celic po tretiranju s cisplatinom

cDDP je v klinični onkologiji eden izmed najpogostejše uporabljenih citostatikov (Sancho-Martínez in sod., 2012; Cepeda in sod., 2007). Znotraj molekule DNA povzroči nastanek aduktov kar posledično vodi v dvojne prelome molekule DNA (DBS, angl. Double Strand Breaks) (Huang in sod., 2004). Tako izzove zaustavitev celičnega cikla, aktivacijo mehanizmov popravljanja DNA ter v končni fazi apoptozo oziroma nekrozo (Siddik, 2003). Vloga rHuEPO v mehanizmi citotoksičnosti, posredovane s cDDP, je že bila pokazana (Belenkov in sod., 2004; Palumbo in sod., 2008; Gewirtz in sod., 2006), vendar je odvisna od izbranega celičnega sistema. V naši študiji smo se tako osredotočili na učinke tretiranja z rHuEPO na citotoksično delovanje cDDP v celičnih linijah raka dojke. Zanimalo nas je, ali dolgotrajna in/ali kratkotrajna izpostavitve rHuEPO vpliva na viabilnost tretiranih celic oziroma ali obstaja sinergizem med rHuEPO in cDDP, ki bi pripomogel k večji citotoksičnosti cDDP in bi še dodatno zmanjšal viabilnost celic raka dojke. Z metodo določevanja metabolne aktivnosti celic (reagent WST-1) ter s testi klonigenosti smo preverili viabilnost celic, tretiranih s cDDP in rHuEPO (brez, kratkotrajno in dolgotrajno). V študiji smo uporabili celice MCF-7 in MDA-MB-231, ki se medsebojno razlikujejo v izražanju receptorjev ESR in PGR ter v funkcionalnosti proteina p53. Celice MCF-7 imajo izražena oba receptorja ter tudi funkcionalni protein p53, medtem ko celice MDA-MB-231 ne izražajo PGR in imajo mutacijo v genu *TP53*. Protein p53 je glavni regulator celičnega odgovora na različne stresne signale (tudi na cDDP) (Kumar in sod., 2007) in je v celicah MDA-MB-231 nefunkcionalen. Na izbranih modelih smo potrdili časovno-odvisno delovanje rHuEPO. Kratkotrajno tretiranje z rHuEPO namreč poveča viabilnost in klonigeni potencial celic MCF-7 ($p < 0.05$, sliki 45 A in 47 A), medtem ko so učinki dolgotrajnega tretiranja ravno nasprotni. Dolgotrajno tretiranje z rHuEPO zmanjša viabilnost ($p < 0.05$, slika 45B) in klonigeni potencial ($p < 0.05$, slika 47 B) teh celic po tretiranju s cDDP. Pri celicah MDA-MB-231 kratkotrajno tretiranje z rHuEPO poveča njihovo viabilnost po indukciji s cDDP ($p < 0.05$, slika 46 A), vendar hkrati zmanjša njihov klonigeni potencial ($p < 0.05$, slika 48). Po dolgotrajnem tretiranju postanejo celice MDA-MB-231 neodzivne na rHuEPO. Njihova viabilnost in klonigenost po izpostavitvi cDDP sta primerljivi z viabilnostjo in klonigenim potencialom celic brez rHuEPO (slika 46, 48). Protein p53 regulira preživetje celic po izpostavitvi na rHuEPO in cDDP (Trošt in sod., 2012) oziroma ob znižani koncentraciji rastnih faktorjev (Hui in sod., 2006). cDDP aktivira delovanje p53 ter glede na obsežnost stresa v celici izzove zaustavitev celičnega cikla, aktivira procese popravljanja DNA oziroma vodi celico v apoptozo, v kolikor so poškodbe prevelike. Funkcionalnost proteina p53 je torej ključnega pomena za celični odgovor na tretiranje s cDDP. Celice MDA-MB-231 nimajo funkcionalnega p53, torej je proces apoptoze

pri njih spremenjen. Poleg tega agresivnejši genotip teh celic, ESR(+)/PGR(-), še dodatno prispeva k njihovi neodzivnosti na citotoksične učinke cDDP oziroma anti-apoptotsko delovanje rHuEPO (Cui in sod., 2005).

5.1.4 Vpliv rHuEPO in cDDP tretiranja na signalno pot p53

Protein p53 je glavni regulator celičnega odgovora na stres in je ključni faktor pri odločanju o usodi celice (Kumar in sod., 2007). Mehanizmi regulacije signalne poti p53 so precej dobro raziskani na nivoju proteinov, manj pa je znanega o signalizaciji na nivoju genov. Znano je, da v primeru poškodb v molekuli DNA (npr. po tretiranju s cDDP) p53 regulira prepisovanje genov *BAX* (Miyashita in Reed, 1995), *PMAIP1*, *BBC3* (Puthalakath in sod., 2002) in *BCL2* (Miyashita in Reed, 1995). Vsi omenjeni geni so udeleženi v odgovor celice na tretiranje s cDDP (Siddik, 2003), spremembe v izražanju nekaterih izmed njih pa so bile pokazane tudi za nevroprotektivne učinke rHuEPO (Renzi in sod., 2002). Na modelu celic MCF-7 in MDA-MB-231 smo skušali pojasniti časovno odvisne učinke tretiranja z rHuEPO na proliferacijo in klonigeni potencial celic oziroma na njihovo viabilnost po tretiranju s cDDP. S preliminarno študijo izražanja genov smo na majhnem naboru genov iz družine *BCL2* ter nekaterih transkripcijskih faktorjev (*FOS*, *JUN* in *NFKB1*) potrdili časovno odvisno delovanje rHuEPO (sliki 49 in 50). Celična linija MDA-MB-231 se je izkazala za slabše odzivno (sliki 49 in 50 B), zato smo pri nadaljnjem delu poglobljeno analizirali le celično linijo MCF-7. V tej celični liniji smo preverili izražanje genov signalne poti p53 v odvisnosti od tretiranja z rHuEPO oziroma po kombiniranem tretiranju z rHuEPO in cDDP. Poleg tega smo v istih pogojih analizirali tudi izražanje ali fosforilacijo apoptotskih proteinov BAD (pBAD), PUMA in BCL2 (pBCL2), regulatorja celičnega cikla p21 Waf1/Cip1 in proteina H2AX (pH2AX), ki je udeležen v procesih popravljanja molekule DNA.

Vpliv tretiranja z rHuEPO Dolgotrajno tretiranje z rHuEPO spremeni izražanje velikega števila od p53-odvisnih genov (sliki 53 in 55), ki so udeleženi v različne znotrajcelične procese. Vpliv dolgotrajnega tretiranja z rHuEPO se kaže v procesih apoptoze in celičnega cikla ter tudi na nivoju popravljanja DNA. Na nivoju apoptoze smo pokazali povišano izražanje velikega števila pro-apoptotskih genov (*BAX*, *PMAIP1*, *BBC3*, *DAPK1*, *APAF1*, *FAS*, *CRADD*, *PERP*, *TP73* in *SHISA5*) ter znižano izražanje anti-apoptotskega gena *BCL2*. rHuEPO zviša nivo fosforilacije proteina BAD (Ser112), nima pa vpliva na izražanje proteina PUMA oziroma le rahlo poviša nivo fosforiliranega BCL2 (pBCL2, Ser70) (slika 60). Fosforilacija proteina BAD na serinu 112 (Ser112) je povezana z aktivacijo signalne poti PI3K(AKT) ter s preživetjem celic (Datta in sod., 1997), fosforilacija BCL2 na serinu 70 (Ser70) pa omo-

goča polno anti-apoptotsko delovanje tega proteina (Ruvolo in sod., 2001). Dolgotrajno tretiranje z rHuEPO torej predstavlja signal za višjo viabilnost oziroma višji proliferacijski potencial celic. Imunohistokemijska določitev fragmentacije DNA je pri celicah, ki so bile dolgotrajno tretirane z rHuEPO, pokazala rahlo znižanje v nivoju apoptoze v primerjavi s celicami brez rHuEPO. Znižanje v nivoju apoptoze ni statistično značilno ($p = 0.061$, slika 59). rHuEPO regulira celični cikel preko modulacije izražanja genov *CDC25A*, *MDM4*, *RPRM*, *CCND3*, *CDK6* in *RB1*. Na proteinskem nivoju smo preverili izražanje proteina p21 Waf1/Cip1, ki je pomemben inhibitor kinaz CDK2 in CDK4. V dolgotrajno tretiranih celicah je bilo izražanje tega proteina primerljivo z izražanjem v kontrolnih celicah (slika 60). Tretiranje z rHuEPO tudi ni imelo vpliva na število senescentnih celic (58), kar pomeni, da spremembe v metabolni aktivnosti celic niso razlog za hitrejšo proliferacijo dolgotrajno tretiranih celic (slika 33). Izražanje transkripcijskih faktorjev *E2F1* in *ESR1*, ki sta pomembna regulatorja celične proliferacije, je v dolgotrajno tretiranih celicah zvišano, torej bi lahko prispevalo k višji proliferaciji teh celic. Vpliv rHuEPO na mehanizme popravljanja DNA se kaže v modulaciji izražanja genov *ATM*, *MLH1*, *CHEK1*, *CHEK2* in *GADD45A*. V primeru dvojnih prelomov molekule DNA, kinaza ATM fosforilira protein H2AX (pH2AX) ter tako aktivira mehanizme popravljanja DNA, proteine v kontrolnih točkah celičnega cikla ter zavira celični cikel (Burma in sod., 2001; Podhorecka in sod., 2010). Do dvojnih prelomov DNA lahko pride tudi tekom podvojevanja DNA oziroma tekom procesa homologne rekombinacije (Jackson in Jeggo, 1995). V dolgotrajno tretiranih celicah smo pokazali nižji nivo pH2AX, torej lahko sklepamo, da rHuEPO zniža nivo popravljanja DNA oziroma zniža nivo poškodb molekule DNA. Spremembe v izražanju inhibitorjev angiogeneze in metastaziranja (*SERPINE1*, *BAIL*, *CD82*, *THBS1* in *SERPINB5*) pa bi lahko bile razlog za višji klonogeni potencial dolgotrajno tretiranih celic MCF-7.

Kratkotrajno tretiranje z rHuEPO ima precej manjše učinke na izražanje genov signalne poti p53 (slika 53). Tako smo pri kratkotrajno tretiranih celicah pokazali spremenjeno izražanje genov *BCL2*, *PCNA*, *PERP* in *PTEN*. *PTEN* je pomemben regulator celičnega cikla in inhibira prehitro celično rast (Sun in sod., 1999). Zvišano izražanje tega gena bi v kratkotrajno tretiranih celicah lahko upočasnilo nivo proliferacije (slika 33, 25). Dodatni faktor, ki bi lahko pripomogel k nižji proliferaciji je tudi nižje izražanje gena *PCNA*, ki ima pomembno vlogo v procesih sinteze in popravljanja DNA (Maga in Hübscher, 2003). Kratkotrajni rHuEPO poviša fosforilacijo proteinov BAD (pBAD) in H2AX (pH2AX) (slika 60). Iz rezultatov torej lahko sklepamo, da kratkotrajno tretiranje z rHuEPO poviša aktivnost popravljalnih mehanizmov DNA oziroma zniža intergriteto molekule DNA. Kljub spremembam na genskem in proteinskem nivoju ostane nivo apoptoze v teh celicah primerljiv s tistim v netretiranih celicah (slika 59). Kljub nekoliko višjemu izražanju proteina p21 Waf1/Cip1 (slika 60), ki

sodeluje v inhibiciji prehoda iz G1 v S fazo celičnega cikla, nismo uspeli pokazati razlik v nivoju senescence kratkotrajno tretiranih in netretiranih celic (slika 58).

Vpliv tretiranja z rHuEPO in cDDP cDDP spremeni izražanje genov, ki so udeleženi v procese popravljanja DNA, apoptoze, inhibicije angiogeneze in metastaziranja ter regulacije celičnega cikla (sliki 50 in 56). Tretiranje s cDDP povzroči zaustavitev celičnega cikla (spremenjeno izražanje genov *CDKN1A* in *CDC2*) ter aktivira proces apoptoze, kar se kaže v povišanem izražanju gena *FAS* (Saleh in sod., 2012). Na proteinskem nivoju cDDP poviša izražanje proteinov p21 Waf1/Cip1 in PUMA, poviša fosforilacijo proteina H2AX oziroma zniža fosforilacijo proteinov BCL2 in BAD. Tako povzroči zaustavitev celičnega cikla na prehodu iz G1 v S fazo (Sancho-Martínez in sod., 2012; Cepeda in sod., 2007) ter deluje pro-apoptotsko (Siddik, 2003). Poleg tega poviša izražanje genov *GADD45A* (Zhan, 2005), *SESNI* (Budanov in Karin, 2008) in *XRCC4*, ki sta udeležena pri popravljanju DNA (Hammel in sod., 2011).

rHuEPO statistično značilno zniža nivo apoptoze po izpostavitvi celic cDDP ($p < 0.05$, slika 59). Znižanje nivoja apoptoze je neodvisno od dolžine tretiranja z rHuEPO in smo ga z imunohistokemijsko detekcijo fragmentacije DNA uspeli potrditi pri vseh koncentracijah cDDP (10, 60 in 100 μM). Kratkotrajno tretiranje z rHuEPO v kombinaciji s cDDP zniža izražanje pro-apoptoznih genov *PMAIP1*, *MCL1*, *TP53BP2*, *PERP* in *RPRM* (sliki 54 in 56), na proteinskem nivoju pa močno poviša fosforilacijo proteina BAD (slika 60). Na nivoju mehanizmov popravljanja DNA kratkotrajni rHuEPO stimulira fosforilacijo proteina H2AX (slika 60) ter poviša izražanje genov *SESN3* in *MLH1* (sliki 54 in 56). Tako aktivira mehanizme popravljanja DNA (Budanov in Karin, 2008; Cejka in sod., 2003). Višjo viabilnost kratkotrajno tretiranih celic lahko razložimo preko povišanega izražanja genov *EGR1* in *PCNA* oziroma z nižjim izražanjem gena *PTEN*. *EGR1* spada med gene zgodnjega odziva in je udeležen v regulacijo celične diferenciacije in mitogeneze ter tudi proliferacije (Vivacqua in sod., 2012). Izražanje proteina p21 Waf1/Cip1 se po kratkotrajnem tretiranju z rHuEPO ne spreminja s koncentracijo dodanega cDDP. Poleg tega je število senescentnih celic po kratkotrajnem tretmaju približno enako pri vseh koncentracijah cDDP in je nižje od tistega pri celicah brez rHuEPO tretiranja ($p < 0.069$, slika 58). Ravno nasprotno se izražanje proteina p21 Waf1/Cip1 v dolgotrajno tretiranih celicah zvišuje s koncentracijo cDDP (slika 60). Enak trend opazimo tudi na nivoju senescence; število senescentnih celic se pri dolgotrajnem tretiranju z rHuEPO namreč močno zvišuje s koncentracijo cDDP in je pri 100 μM koncentraciji cDDP statistično značilno različno ($p < 0.05$) od tistega pri celicah brez rHuEPO. Med dolgotrajno in kratkotrajno tretiranimi celicami obstaja statistično značilna razlika v številu senescentnih celic ($p < 0.05$, slika 58), ki kaže v prid dolgotrajnega tretmaja. Na proteinskem

nivoju dolgotrajno tretiranje z rHuEPO ne vpliva na fosforilacijo BAD in BCL2 ter ne spremeni izražanja proteina PUMA (slika 60). Fosforilacija BAD in BCL2 se podobno kot pri celicah brez rHuEPO znižuje s koncentracijo cDDP, medtem ko izražanje pro-apoptoznega proteina PUMA narašča. Dolgotrajni tretma z rHuEPO v kombinaciji s cDDP močno poveča fosforilacijo H2AX, kar priča na zmanjšano integriteto DNA, posledično zaustavitev celičnega cikla in aktivacijo DNA popravljalnih mehanizmov (slika 60).

5.1.5 Vpliv EPOR na tretiranje s tamoksifenom

Tamoksifen (TAM) je selektivni modulator estrogenskega receptorja in se uporablja v terapiji ESR pozitivnih tumorjev raka dojke (Li in sod., 2010). TAM je pogojni antagonist ESR, saj se njegovo delovanje v odvisnosti od fosforilacije ESR lahko spremeni v agonistično (Michalides in sod., 2004; Shou in sod., 2004; Ignatov in sod., 2010). Zelo pogost zaplet pri terapiji s TAM je razvoj odpornosti, do katere privedejo izguba izražanja funkcionalnega ESR ter interakcija ESR z drugimi znotrajceličnimi receptorji, predvsem EGFR/HER2, IGFR in GPCR. V laboratoriju A. Larsson (Larsson in sod., 2009) so pokazali negativno prognostično vrednost visokega izražanja EPOR za terapijo s TAM pri tumorjih ESR+/PGR+. Predpostavljamo, da je EPOR udeležen v procesih *de novo* pridobljene odpornosti na TAM, pri tem pa je ključnega pomena interakcija med signalnimi potmi receptorjev HER2, GPER in EPOR (Ignatov in sod., 2010).

Hipotezo smo najprej preizkusili na modelu celičnih linij RAMA 37 in RAMA 37-28. V obeh celičnih linijah smo najprej potrdili izražanje genov *ESR1*, *ESR2*, *PGR*, *GPER* in *EPOR* (slika 21). Nadalje smo na proteinskem nivoju potrdili izražanje EPOR (slika 23), ESR2 in PGR, ne pa tudi ESR1 (slika 22). Vzrok temu je uporaba mišjih anti-ESR1 protiteles proti humanemu ESR1. Predpostavljamo, da je homologija med mišjim in podganjim ESR1 zelo visoka, zato protitelesa ne prepoznajo podganjega ESR1. Kljub temu, da izražanja ESR1 nismo potrdili, smo predpostavili da ga celice izražajo ter obe celični liniji izpostavili 4-hidroksi tamoksifenu (4-OH-TAM). Povišano izražanje EPOR pri celični liniji RAMA 37-28 spremeni odziv celic na tretiranje s 4-OH-TAM ter poveča njihovo viabilnost v primerjavi z viabilnostjo tretiranih celic RAMA 37 ($p < 0.05$, slika 62). Na podlagi rezultatov s celičnimi linijami RAMA smo pripravili model humane celične linije s povečanim izražanjem EPOR. Celični liniji MCF-7 in T-47D smo transfecirali z *EPOR* divjega tipa ter preverili odziv mešane kolonije T-47D^{EPOR+} na tretiranje s 4-OH-TAM. V analizi smo uporabili mešano kolonijo T2, saj selekcijo klonov z metodo klonalnega razrasta ene celice še izvajamo. Pri celicah T2 smo z metodo qPCR potrdili višji nivo izražanja *EPOR* (preglednica 23). Enako kot pri celičnem paru RAMA smo na modelu celic T2 (T-47D^{EPOR+}) pokazali, da je nji-

hova viabilnost po tretiranju s 4-OH-TAM višja ($p < 0.05$) v primerjavi z viabilnostjo celic T-47D (slika 63). Odzivnosti celic M3 (MCF-7^{EPOR+}) oziroma izvornih MCF-7 na tretiranje s 4-OH-TAM še nismo analizirali.

Na podlagi preliminarne študij lahko potrdimo agonistične vplive visokega izražanja EPOR na odzivnost celic na 4-OH-TAM. Predpostavljamo, da EPOR na nivoju signalizacije sodeluje z GPER, pri čemer poviša izražanje *EGR1* ter tako poveča viabilnost s 4-OH-TAM tretiranih celic (Vivacqua in sod., 2006). Hipotezo bomo preverili na modelu čistih klonov celic T-47D in MCF-7 z visokim izražanjem EPOR (T-47D^{EPOR+} in MCF-7^{EPOR+}), katerih selekcija je v teku. Predpostavljamo, da bomo opazili razlike v odzivnosti T-47D^{EPOR+} in MCF-7^{EPOR+} celic na 4-OH-TAM, saj se obe celični liniji razlikujeta v nivoju izražanja GPER. Na modelu bomo nadalje proučili mehanizme odpornosti celic na TAM.

5.2 SKLEPI

EPOR je izražen v celičnih linijah raka dojke. Vezava z eksogeno dodanim rHuEPO vpliva na nivo njihove proliferacije, kar smo pokazali tako s testi metabolne aktivnosti in klonigenosti, kot tudi z analizo izražanja genov zgodnjega odziva in proteinske signalizacije. Delovanje para EPO-EPOR je časovno odvisno. Učinki kratkotrajne izpostavitve na celično proliferacijo so negativni, medtem ko dolgotrajno tretiranje deluje pro-proliferativno. Podobno časovno odvisnost smo pokazali tudi pri celicah, izpostavljenih cDDP. Kratkotrajno tretiranje z rHuEPO celice zaščiti pred citotoksičnostjo cDDP, medtem ko dolgotrajno tretiranje zniža njihovo viabilnost. Pri celicah, tretiranih s cDDP, rHuEPO zniža nivo apoptoze ne glede na čas izpostavitve (kratkotrajna, dolgotrajna), medtem ko je število senescentnih celic odvisno od dolžine tretiranja. Število senescentnih celic v vzorcih po dolgotrajnem tretiranju je višje v primerjavi z vzorci po kratkotrajnem tretiranju oziroma v vzorcih brez rHuEPO tretmaja, zato je tudi viabilnost dolgotrajno tretiranih celic nižja. rHuEPO časovno odvisno modulira fosforilacijo proteinov BAD, BCL2 in H2AX po izpostavitvi na cDDP. Visoko izražanje EPOR v celicah RAMA 37-28 in T-47D^{EPOR+} poviša njihovo viabilnost po tretiranju s 4-OH-TAM, torej je njegovo delovanje agonistično. Menimo, da imajo naši rezultati klinično vrednost. Tako odsvetujemo uporabo kombinirane terapije s cDDP in kratkotrajnim rHuEPO, saj terapija pripomore k hitrejši proliferaciji celic raka dojke. Dolgotrajna izpostavitve rHuEPO vpliva na razsejanje rakavih celic, zato pri anemičnih bolnikih z rakom dojke odsvetujemo dolgotrajno terapijo. Poleg tega predlagamo izražanje EPOR kot selekcijski marker za izbor ustrezne anti-tumorske terapije.

Hipoteza 1:

- Delovanje rHuEPO je časovno odvisno;
 - pri stopnji značilnosti $p < 0.05$ lahko trdimo, da kratkotrajni rHuEPO zmanjša proliferacijo pri celičnih linijah SKBR3, Hs578T, T-47D in MCF7;
 - pri stopnji značilnosti $p < 0.05$ lahko trdimo, da dolgotrajni rHuEPO zviša proliferacijo pri celični liniji MCF-7;
- v celičnih linijah MCF-7, MDA-MB-231, SKBR3, Hs578T in RAMA 37-28 rHuEPO spremeni fosforilacijo proteinov ERK in AKT, pri celični liniji SKBR3 pa tudi fosforilacijo STAT5.
- v celičnih linijah MCF-7, MDA-MB-231, T-47D, SKBR3 in Hs578T rHuEPO pri stopnji značilnosti $p < 0.05$ stimulira izražanje genov zgodnjega odziva *FOS* in *EGR1*.

Hipoteza 2:

- Delovanje rHuEPO je časovno odvisno;
 - pri stopnji značilnosti $p < 0.05$ lahko trdimo, da kratkotrajni rHuEPO poveča viabilnost celic MCF-7 po izpostavitvi cDDP;
 - pri stopnji značilnosti $p < 0.05$ lahko trdimo, da dolgotrajni rHuEPO zniža viabilnost celic MCF-7 po izpostavitvi cDDP;
- pri stopnji značilnosti $p < 0.05$ lahko trdimo, da rHuEPO (kratkotrajni in dolgotrajni) zniža nivo apoptoze celic MCF-7, tretiranih s cDDP.
- pri mejni statistični značilnosti $p < 0.08$ lahko trdimo, da kratkotrajno tretiranje z rHuEPO zmanjša število senescentnih celic, medtem ko dolgotrajno tretiranje poveča nivo senescence v celicah MCF-7 po indukciji s cDDP,
- tretiranje z rHuEPO spremeni fosforilacijo proteinov BAD, BCL2 in H2AX v celični liniji MCF-7.

Hipoteza 3:

- pri stopnji značilnosti $p < 0.05$ lahko trdimo, da visoko izražanje EPOR deluje antagonistično na tretiranje s TAM. Viabilnost celic z visoko izraženim EPOR (RAMA 37-28 in T-47D^{EPOR+}) je po izpostavitvi TAM višja v primerjavi z viabilnostjo izhodnih celic (RAMA 37 in T-47D).

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Eritropoetin (EPO) je hormon, ki je ključnega pomena za zorenje eritroidnih matičnih celic v kostnem mozgu. Deluje preko vezave na eritropoetinski receptor (EPOR), ki je na površini eritroidnih celic prisoten v obliki homodimera. Signalizacija preko para EPO-EPOR vključuje aktivacijo številnih signalnih poti, ki ženejo proliferacijo in diferenciacijo celic hematopoetskega sistema ter jih zaščitijo pred apoptozo. Med najpomembnejšimi signalnimi potmi so signalne poti MAPK, PI3K, JAK2/STAT5 ter signalna pot protein kinaze C (PKRC). EPOR je najvišje izražen v hematopoetskem tkivu, vendar pa čedalje več dokazov potrjuje njegovo prisotnost tudi v drugih tkivih, predvsem v možganih, endotelijskem tkivu, miokardocitih, makrofagih, reproduktivnih organih ter tudi v številnih tumorskih celicah. Izražanje v teh tkivih je precej nižje od tistega v eritroidnih matičnih celicah, aktivacija z EPO pa izzove signalne poti, ki so različne od tistih v hematopoetskem tkivu. EPO deluje nevro- in kardioprotektivno, spodbuja angiogenezo v ženskih spolnih organih, mehanizmi delovanja v tumorskem tkivu pa še vedno niso pojasnjeni. V klinični onkologiji se rekombinantni humani eritropoetin (rHuEPO) uporablja za zdravljenje anemij, ki se razvijejo kot posledica mielosupresivnih učinkov kemo- in radioterapije oziroma zaradi infiltracije tumorskih celic v kostni mozeg. Kljub temu, da rHuEPO uspešno nadomešča potrebo po transfuziji ter bolnikom izboljšuje kvaliteto življenja, so mnjenja o njegovi vlogi v tumorskem tkivu deljena. Skrb vzbujajoči so predvsem rezultati kliničnih študij, ki opozarjajo na negativne učinke rHuEPO na napredovanje bolezni in preživetje bolnikov. V zadnjem času vse več rezultatov kaže na interakcijo para EPO-EPOR z drugimi receptorji za rastne faktorje, predvsem z receptorji za steroidne hormone (ESR, PGR, GPER) in HER2.

Namen našega dela je bil proučitev mehanizmov delovanja rHuEPO na modelu celičnih linij raka dojke. Celice smo kratkotrajno (24 h) in dolgotrajno (9 tednov) izpostavili rHuEPO in/ali cisplatinu (cDDP) ter analizirali celično rast, izražanje genov (qPCR) in proteinsko signalizacijo (prenos western) z namenom opredelitve vloge rHuEPO na proliferacijski potencial tumorskih celic ter na citotoksičnost, posredovano s cDDP. Opredelili smo tudi vlogo rHuEPO v procesih apoptoze (ELISA), senescence (imunohistokemija) in celičnega cikla (prenos western). Poleg tega smo pri celičnih linijah raka dojk preverili so-izražanje *ESR*, *PGR* in *EPOR* ter določiti vlogo visokega izražanja EPOR na odzivnost celic na tretiranje s tamoksifenom (TAM).

Na modelu celičnih linij raka dojke smo pokazali korelacije v izražanju genov za *ESR*, *PGR* in *GPER* ter za gene *EPOR*, *EPHB4* in *GPER*. S korelacijsko analizo nismo potrdili hipoteze

o tvorbi heteromernega receptorja EPOR z monomerom CSF2RB (receptor β), saj v izražanju obeh genov obstaja negativna korelacija. Celične linije smo ločili na hormonsko-odvisne in neodvisne ter analizirali njihovo odzivnost na rHuEPO. Izkazalo se je, da so učinki rHuEPO odvisni od genetskega ozadja celične linije (status izražanja ESR, PGR, GPER in *TP53*) ter tudi od dolžine tretiranja. V celicah Hs578T in SKBR3 smo tako pokazali aktivacijo signalnih poti MAPK in PI3K in anti-proliferativne učinke kratkotrajne izpostavitve celic na rHuEPO. Obe celični liniji izražata *ESR2* in *GPER*, nimata pa izraženih *ESR1* in *PGR*. Pri celicah RAMA 37-28, ki prekomerno izražajo EPOR, rHuEPO aktivira signalni poti MAPK in PI3K, ne pa tudi signalne poti JAK2/STAT5. Prav tako rHuEPO ne spremeni proliferacije celic RAMA 37-28. Dolgotrajno tretiranje z rHuEPO poveča proliferacijski potencial hormonsko-odvisnih celic MCF-7, ki izražajo funkcionalni protein p53 ter ima časovno-odvisne učinke na njihovo viabilnost po tretiranju s cDDP. Kratkotrajna izpostavitve namreč zaščitijo celice pred citotoksičnostjo cDDP, medtem ko dolgotrajna izpostavitve močno zmanjša njihovo viabilnost. Časovno odvisne razlike v preživetju celic MCF-7 so posledica znižanega nivoja apoptoze ter spremenjene regulacije celičnega cikla, ki spremeni število senescentnih celic. Na nivoju transkriptoma, rHuEPO spremeni izražanje od p53-odvisnih genov, predvsem tistih iz genske družine *BCL2* in modulira razmerje v izražanju genov *BCL2* in *BAX* (*BCL2/BAX*). Poleg tega je rHuEPO udeležen v regulacijo izražanja transkripcijskih faktorjev *EGR1*, *ESR1* in *E2F1*. Na proteinskem nivoju spremeni fosforilacijo proteinov BAD, BCL2 in H2AX. Poleg tega smo v celicah RAMA 37-28 in T-47D^{EPOR+} z višjim izražanjem EPOR, pokazali agonistične učinke EPOR na viabilnost celic po tretiranju s TAM.

Z doktorskim delom smo pripomogli k boljšemu razumevanju mehanizmov delovanja rHuEPO na modelu celičnih linij raka dojke. Pokazali smo, da je rHuEPO udeležen v regulaciji procesov apoptoze, celičnega cikla ter DNA popravilnih mehanizmov ter da so njegovi učinki odvisni od genetskega ozadja ter dolžine izpostavitve. Izražanje funkcionalnega proteina p53, receptorjev ESR, PGR, GPER in EPOR bi pri bolnikih z rakom dojk lahko uporabili kot prognostični faktor za napovedovanje uspešnosti terapije s cDDP oziroma TAM.

6.2 SUMMARY

Erythropoietin (EPO) is a hormone that is essential for the maturation of erythroid progenitors in the bone marrow. It acts through the binding to the erythropoietin receptor (EPOR), which is present on the surface of erythroid cells in the form of a homodimer. Signaling through the EPO-EPOR axis includes activation of several signaling pathways that drive proliferation and differentiation of haematopoietic cells and provide protection against apoptosis. Among the most important signaling pathways are MAPK, PI3K, JAK2/STAT5 and PKRC signaling pathways. EPOR is preferentially expressed in the haematopoietic tissue. Its presence was confirmed also in other tissues, especially in the brain, endothelial tissue, myocardiocytes, macrophages, reproductive organs and also in many solid tumors. Expression in these tissues is significantly lower than that of the erythroid progenitors. EPO activation induces signaling pathways that are different from those of the haematopoietic tissue. EPO effects are neuro- and cardioprotective and pro-angiogenic in the female reproductive organs. The mechanisms of action in tumor tissue have not been elucidated yet. Recombinant human erythropoietin (rHuEPO) is used in clinical oncology for the treatment of anemia that develops as a result of myelosuppressive effects of chemo- and radiotherapy, or infiltration of bone marrow by tumor cells. Despite the fact that rHuEPO effectively replaces the need for transfusions and improves patient quality of life, the views of its role in tumor tissue are questionable. Clinical studies which showed negative effects of rHuEPO on disease progression and survival of patients have risen many concerns. Lately, more and more of the results show interaction of EPO-EPOR pair with receptors for growth factors, notably the receptors for steroid hormones (ESR, PGR, GPER), and HER2.

The aim of our work was to clarify the mechanisms of rHuEPO action in breast cancer cell lines. We performed cell proliferation, gene expression (qPCR) and protein signaling studies (western blot) on cells that were treated with short (24 h) and long-term (9 weeks) rHuEPO in order to assess its effects on cell proliferation and cisplatin (cDDP) cytotoxicity. Additionally, we wanted to define its role in the processes of apoptosis (ELISA), senescence (immunohistochemistry) and cell cycle (western blot). We analysed the expression levels of *ESR*, *PGR* and *EPOR* in our breast cancer models, and assessed the role of high EPOR expression in cell response to tamoxifen (TAM) induction.

On our breast cancer models, we showed correlations in gene expression for *ESR*, *PGR* and *GPER* genes and *EPOR*, *EPHB4* and *GPER*. Correlation analysis questions the hypothesis of the heteroreceptor formation between *EPOR* and *CSF2RB* (β -common receptor), as we have shown a negative correlation in the expression of both genes. Cell lines were segregated on hormone-dependent and independent clusters and further analyzed for their response to rHu-

EPO. It has been shown that rHuEPO effects depend on the genetic background of cells (*ESR*, *PGR*, *GPER* and *TP53* expression), as well as on the length of the treatment. We were able to confirm anti-proliferative effects of rHuEPO treatment on Hs578T and SKBR3 cells together with its capability to activate MAPK and PI3K signaling pathways. Both cell lines express *ESR2* and *GPER* but do not show *ESR1* and *PGR* expression. In RAMA 37-28 cells that over-express EPOR, rHuEPO activates MAPK and PI3K signaling pathways but does not influence their proliferation. Long-term treatment of hormone-responsive MCF-7 cells increases their proliferative potential in a time-dependent manner, while on the other hand it reduces its viability after cDDP induction. Short-term exposure is protective and reduces cytotoxicity of cDDP. The time-dependent differences in the survival of MCF-7 cells could be explained as a result of changes in the level of apoptosis and senescence. rHuEPO alters expression of p53-dependent genes, in particular those from *BCL2*-gene family and modulates *BCL2* to *BAX* ratio (*BCL2/BAX*). rHuEPO also influences expression of transcription factors *ESR1*, *EGR1* and *E2F1*. On the protein level rHuEPO influences phosphorylation levels of BAD, BCL2 and H2AX. Together with this, we have shown that high expression of EPOR alters cell responsiveness to TAM since the viability of the 4-OH-TAM treated RAMA 37-28 and T-47D^{EPOR+} cells is greater when compared to the viability of parental cells.

The doctoral work has contributed to a better understanding of rHuEPO effects on the biology of breast cancer. We have shown that rHuEPO is involved in the regulation of apoptosis, senescence and DNA damage repair. We propose that its effects depend on the genetic background and the length of exposure. Expression of functional p53 protein, ESR PGR and EPOR could be used as a prognostic factor for predicting response to cDDP or TAM in breast cancer patients.

7 VIRI

- Aapro M., Osterwalder B., Scherhag A., Burger H.U. 2009. Epoetin-beta treatment in patients with cancer chemotherapy-induced anaemia: the impact of initial haemoglobin and target haemoglobin levels on survival, tumour progression and thromboembolic events. *British Journal of Cancer*, 101, 12: 1961–1971
- Abràmoff M.D., Magalhães P.J., Ram S.J. 2004. Image processing with imagej. *Biophotonics International*, 11, 7: 36–42
- 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 Research*, 61, 9: 3561–3565
- Acs G., Zhang P.J., McGrath C.M., Acs P., McBroom J., Mohyeldin A., Liu S., Lu H., Verma A. 2003. Hypoxia-inducible erythropoietin signaling in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix and its potential role in cervical carcinogenesis and tumor progression. *American Journal of Pathology*, 162, 6: 1789–1806
- Acs G., Zhang P.J., Rebbeck T.R., Acs P., Verma A. 2002. Immunohistochemical expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in breast carcinoma. *Cancer*, 95, 5: 969–981
- Albanito L., Madeo A., Lappano R., Vivacqua A., Rago V., Carpino A., Oprea T.I., Prossnitz E.R., Musti A.M., Ando S., Maggiolini M. 2007. G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17 β -estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. *Cancer Research*, 67, 4: 1859–1866
- Anagnostou A., Lee E.S., Kessimian N., Levinson R., Steiner M. 1990. Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 15: 5978–5982
- Andrews P., Howell S. 1990. Cellular pharmacology of cisplatin: perspectives on mechanisms of acquired resistance. *Cancer Cells*, 2, 2: 35–43
- Arcasoy M.O. 2008. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *British Journal of Haematology*, 141, 1: 14–31
- Arcasoy M.O., Amin K., Chou S.C., Haroon Z.A., Varia M., Raleigh J.A. 2005. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in head and neck cancer: relationship to tumor hypoxia. *Clinical Cancer Research*, 11, 1: 20–27

- Arcasoy M.O., Amin K., Karayal A.F., Chou S.C., Raleigh J.A., Varia M.A., Haroon Z.A. 2002. Functional significance of erythropoietin receptor expression in breast cancer. *Laboratory Investigation*, 82, 7: 911–918
- Arcasoy M.O., Jiang X., Haroon Z.A. 2003. Expression of erythropoietin receptor splice variants in human cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307, 4: 999–1007
- Atkins H.L., Broudy V.C., Papayannopoulou T. 1991. Characterization of the structure of the erythropoietin receptor by ligand blotting. *Blood*, 77, 12: 2577–2582
- Barabas K., Milner R., Lurie D., Adin C. 2008. Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. *Veterinary and Comparative Oncology*, 6, 1: 1–18
- Bazan J.F. 1989. A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 164, 2: 788–795
- Bazan J.F. 1990. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 18: 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, 8: 2667–2675
- Belenkov A.I., Shenouda G., Rizhevskaya E., Cournoyer D., Belzile J.P., Souhami L., Devic S., Chow T.Y.K. 2004. Erythropoietin induces cancer cell resistance to ionizing radiation and to cisplatin. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3, 12: 1525–1532
- Bennett C.L., Silver S.M., Djulbegovic B., Samaras A.T., Blau C.A., Gleason K.J., Barnato S.E., Elverman K.M., Courtney D.M., McKoy J.M., Edwards B.J., Tighe C.C., Raisch D.W., Yarnold P.R., Dorr D.A., Kuzel T.M., Tallman M.S., Trifilio S.M., West D.P., Lai S.Y., Henke M. 2008. Venous thromboembolism and mortality associated with recombinant erythropoietin and darbepoetin administration for the treatment of cancer-associated anemia. *JAMA*, 299, 8: 914–924
- Bohlius J., Schmidlin K., Brilliant C., Schwarzer G., Trelle S., Seidenfeld J., Zwahlen M., Clarke M., Weingart O., Kluge S., Piper M., Rades D., Steensma D.P., Djulbegovic B., Fey M.F., Ray-Coquard I., Machtay M., Moebus V., Thomas G., Untch M., Schumacher

- M., Egger M., Engert A. 2009. Recombinant human erythropoiesis-stimulating agents and mortality in patients with cancer: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet*, 373, 9674: 1532–1542
- Bouscary D., Pene F., Claessens Y.E., Muller O., Chrétien S., Fontenay-Roupie M., Gisselbrecht S., Mayeux P., Lacombe C. 2003. Critical role for PI 3-kinase in the control of erythropoietin-induced erythroid progenitor proliferation. *Blood*, 101, 9: 3436–3443
- Brines M., Cerami A. 2005. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 6, 6: 484–494
- Brines M., Cerami A. 2012. The receptor that tames the innate immune response. *Molecular Medicine*, 18: 486–496
- Brines M., Grasso G., Fiordaliso F., Sfacteria A., Ghezzi P., Fratelli M., Latini R., Xie Q.W., Smart J., Su-Rick C.J., Pobre E., Diaz D., Gomez D., Hand C., Coleman T., Cerami A. 2004. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 41: 14907–14912
- Brines M., Patel N.S.A., Villa P., Brines C., Mennini T., De Paola M., Erbayraktar Z., Erbayraktar S., Sepodes B., Thiemermann C., Ghezzi P., Yamin M., Hand C.C., Xie Q.w., Coleman T., Cerami A. 2008. Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 31: 10925–10930
- Brown W.M., Maxwell P., Graham A.N.J., Yakkundi A., Dunlop E.A., Shi Z., Johnston P.G., Lappin T.R.J. 2007. Erythropoietin receptor expression in non-small cell lung carcinoma: a question of antibody specificity. *Stem Cells*, 25, 3: 718–722
- Budanov A.V., Karin M. 2008. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell*, 134, 3: 451–460
- Budarf M., Huebner K., Emanuel B., Croce C.M., Copeland N.G., Jenkins N.A., D'Andrea A.D. 1990. Assignment of the erythropoietin receptor (EPOR) gene to mouse chromosome 9 and human chromosome 19. *Genomics*, 8, 3: 575–578
- Bunn H.F. 2013. Erythropoietin. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3, 3: a011619
doi: 10.1101/cshperspect.a011619

- Burma S., Chen B.P., Murphy M., Kurimasa A., Chen D.J. 2001. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 45: 42462–42467
- Carlini R.G., Reyes A.A., Rothstein M. 1995. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis in vitro. *Kidney International*, 47, 3: 740–745
- Cejka P., Stojic L., Mojas N., Russell A.M., Heinimann K., Cannavó E., di Pietro M., Marra G., Jiricny J. 2003. Methylation-induced G2/M arrest requires a full complement of the mismatch repair protein hMLH1. *The EMBO Journal*, 22, 9: 2245–2254
- Cella D., Zagari M.J., Vondra C., Gagnon D.D., Hurtz H.J., 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. *Journal of Clinical Oncology*, 21, 2: 366–373
- Cepeda V., Fuertes M.A., Castilla J., Alonso C., Quevedo C., Pérez J.M. 2007. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 7, 1: 3–18
- Chan C.M., Lykkesfeldt A.E., Parker M.G., Dowsett M. 1999. Expression of nuclear receptor interacting proteins TIF-1, SUG-1, receptor interacting protein 140, and corepressor SMRT in tamoxifen-resistant breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 5, 11: 3460–3467
- Chang J., Couture F., Young S., McWatters K.L., Lau C.Y. 2005. Weekly epoetin alfa maintains hemoglobin, improves quality of life, and reduces transfusion in breast cancer patients receiving chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 23, 12: 2597–2605
- Chateaufieux S., Grigorakaki C., Morceau F., Dicato M., Diederich M. 2011. Erythropoietin, erythropoiesis and beyond. *Biochemical Pharmacology*, 82, 10: 1291–1303
- Cheetham J.C., Smith D.M., Aoki K.H., Stevenson J.L., Hoeffel T.J., Syed R.S., Egrie J., Harvey T.S. 1998. NMR structure of human erythropoietin and a comparison with its receptor bound conformation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 5, 10: 861–866
- Chen C., Sytkowski A.J. 2001. Erythropoietin activates two distinct signaling pathways required for the initiation and the elongation of c-myc. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 42: 38518–38526

- Chen Z.Y., Wang L., Asavaritkrai P., Noguchi C.T. 2010. Up-regulation of erythropoietin receptor by nitric oxide mediates hypoxia preconditioning. *Journal of Neuroscience Research*, 88, 14: 3180–3188
- Constantinescu S.N., Huang L.J., Nam H., Lodish H.F. 2001. The erythropoietin receptor cytosolic juxtamembrane domain contains an essential, precisely oriented, hydrophobic motif. *Molecular Cell*, 7, 2: 377–385
- Cross D.A., Alessi D.R., Cohen P., Andjelkovich M., Hemmings B.A. 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 378, 6559: 785–789
- Cui X., Schiff R., Arpino G., Osborne C.K., Lee A.V. 2005. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 23, 30: 7721–7735
- Cullen K.J., Yang Z., Schumaker L., Guo Z. 2007. Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 39, 1: 43–50
- Dabrowiak J.C., Goodisman J., Souid A.K. 2002. Kinetic study of the reaction of cisplatin with thiols. *Drug Metabolism and Disposition*, 30, 12: 1378–1384
- Damen J.E., Mui A.L., Puil L., Pawson T., Krystal G. 1993. Phosphatidylinositol 3-kinase associates, via its Src homology 2 domains, with the activated erythropoietin receptor. *Blood*, 81, 12: 3204–3210
- Datta S.R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y., Greenberg M.E. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 91, 2: 231–241
- Del Mastro L., Venturini M., Lionetto R., Garrone O., Melioli G., Pasquetti W., Sertoli M.R., Bertelli G., Canavese G., Costantini M., Rosso R. 1997. Randomized phase III trial evaluating the role of erythropoietin in the prevention of chemotherapy-induced anemia. *Journal of Clinical Oncology*, 15, 7: 2715–2721
- Dent P., Grant S. 2001. Pharmacologic interruption of the mitogen-activated extracellular-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway: potential role in promoting cytotoxic drug action. *Clinical Cancer Research*, 7, 4: 775–783

- Dent P., Yacoub A., Contessa J., Caron R., Amorino G., Valerie K., Hagan M.P., Grant S., Schmidt-Ullrich R. 2003a. Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways. *Radiation Research*, 159, 3: 283–300
- Dent P., Yacoub A., Fisher P.B., Hagan M.P., Grant S. 2003b. MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene*, 22, 37: 5885–5896
- Desta Z., Ward B.A., Soukhova N.V., Flockhart D.A. 2004. Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 310, 3: 1062–1075
- Ekbom A., Lindberg A., Laurell G., Wallin I., Eksborg S., Ehrsson H. 2003. Ototoxicity, nephrotoxicity and pharmacokinetics of cisplatin and its monohydrated complex in the guinea pig. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 51, 1: 36–42
- 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, 5: 1892–1895
- Elliott S., Busse L., McCaffery I., Rossi J., Sinclair A., Spahr C., Swift S., Begley C.G. 2010. Identification of a sensitive anti-erythropoietin receptor monoclonal antibody allows detection of low levels of EpoR in cells. *Journal of Immunological Methods*, 352, 1-2: 126–139
- Elliott S., Sinclair A.M. 2012. The effect of erythropoietin on normal and neoplastic cells. *Biologics*, 6: 163–189
- Epstein A.C., Gleadle J.M., McNeill L.A., Hewitson K.S., O'Rourke J., Mole D.R., Mukherji M., Metzen E., Wilson M.I., Dhanda A., Tian Y.M., Masson N., Hamilton D.L., Jaakkola P., Barstead R., Hodgkin J., Maxwell P.H., Pugh C.W., Schofield C.J., Ratcliffe P.J. 2001. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, 107, 1: 43–54
- 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, 2: 135–145
- Fisher J.W., Koury S., Ducey T., Mendel S. 1996. Erythropoietin production by interstitial cells of hypoxic monkey kidneys. *British Journal of Haematology*, 95, 1: 27–32

- Frede S., Freitag P., Geuting L., Konietzny R., Fandrey J. 2011. Oxygen-regulated expression of the erythropoietin gene in the human renal cell line REPC. *Blood*, 117, 18: 4905–4914
- García-Becerra R., Santos N., Díaz L., Camacho J. 2012. Mechanisms of Resistance to Endocrine Therapy in Breast Cancer: Focus on Signaling Pathways, miRNAs and Genetically Based Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 1: 108–145
- Gately D., Howell S. 1993. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *British Journal of Cancer*, 67, 6: 1171–1176
- 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. *Clinical Cancer Research*, 12, 7, Pt 1: 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. *Journal of Clinical Oncology*, 15, 3: 1218–1234
- Glaspy J., Crawford J., Vansteenkiste J., Henry D., Rao S., Bowers P., Berlin J.A., Tomita D., Bridges K., Ludwig H. 2010. Erythropoiesis-stimulating agents in oncology: a study-level meta-analysis of survival and other safety outcomes. *British Journal of Cancer*, 102, 2: 301–315
- Glaspy J.A. 2009. Erythropoietin in cancer patients. *Annual Review of Medicine*, 60: 181–192
- Gross A.W., Lodish H.F. 2006. Cellular trafficking and degradation of erythropoietin and novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *Journal of Biological Chemistry*, 281, 4: 2024–2032
- Gruber M., Hu C.J., Johnson R.S., Brown E.J., Keith B., Simon M.C. 2007. Acute postnatal ablation of hif-2alpha results in anemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 7: 2301–2306
- Haase V.H. 2010. Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 299, 1: 1–13
- Hadland B.K., Longmore G.D. 2009. Erythroid-stimulating agents in cancer therapy: potential dangers and biologic mechanisms. *Journal of Clinical Oncology*, 27, 25: 4217–4226

- Hall M.D., Okabe M., Shen D.W., Liang X.J., Gottesman M.M. 2008. The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 48: 495–535
- Hammel M., Rey M., Yu Y., Mani R.S., Classen S., Liu M., Pique M.E., Fang S., Mahaney B.L., Weinfeld M., in sod. 2011. XRCC4 protein interactions with XRCC4-like factor (XLF) create an extended grooved scaffold for DNA ligation and double strand break repair. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 37: 32638–32650
- Hardee M.E., Cao Y., Fu P., Jiang X., Zhao Y., Rabbani Z.N., Vujaskovic Z., Dewhirst M.W., Arcasoy M.O. 2007. Erythropoietin blockade inhibits the induction of tumor angiogenesis and progression. *PLoS One*, 2, 6: e549
doi: 10.1371/journal.pone.0000549
- Harrison L., Blackwell K. 2004. Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy? *Oncologist*, 9, Suppl 5: 31–40
- Hedley B.D., Chu J.E., Ormond D.G., Beausoleil M.S., Boasie A., Allan A.L., Xenocostas A. 2011. Recombinant human erythropoietin in combination with chemotherapy increases breast cancer metastasis in preclinical mouse models. *Clinical Cancer Research*, 17, 19: 6151–6162
- Heidenreich S., Rahn K.H., Zidek W. 1991. Direct vasopressor effect of recombinant human erythropoietin on renal resistance vessels. *Kidney International*, 39, 2: 259–265
- Henke M., Laszig R., Rube C., Schäfer U., Haase K.D., 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, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, 362, 9392: 1255–1260
- Hilton D.J., Watowich S.S., Murray P.J., Lodish H.F. 1995. Increased cell surface expression and enhanced folding in the endoplasmic reticulum of a mutant erythropoietin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 1: 190–194
- Huang X., Okafuji M., Traganos F., Luther E., Holden E., Darzynkiewicz Z. 2004. Assessment of histone H2AX phosphorylation induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors topotecan and mitoxantrone and by the DNA cross-linking agent cisplatin. *Cytometry. Part A*, 58, 2: 99–110

- Hui L., Zheng Y., Yan Y., Bargonetti J., Foster D. 2006. Mutant p53 in MDA-MB-231 breast cancer cells is stabilized by elevated phospholipase D activity and contributes to survival signals generated by phospholipase D. *Oncogene*, 25, 55: 7305–7310
- Ignatov A., Ignatov T., Roessner A., Costa S.D., Kalinski T. 2010. Role of GPR30 in the mechanisms of tamoxifen resistance in breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 123, 1: 87–96
- Ihle J.N. 1995. Cytokine receptor signalling. *Nature*, 377, 6550: 591–594
- Ihle J.N. 2001. The Stat family in cytokine signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 13, 2: 211–217
- Ihle J.N., Kerr I.M. 1995. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends in Genetics*, 11, 2: 69–74
- Ihle J.N., Thierfelder W., Teglund S., Stravopodis D., Stravopodis D., Wang D., Feng J., Parganas E. 1998. Signaling by the cytokine receptor superfamily. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 865: 1–9
- Imagawa S., Izumi T., Miura Y. 1994. Positive and negative regulation of the erythropoietin gene. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 12: 9038–9044
- Imagawa S., Yamamoto M., Miura Y. 1997. Negative regulation of the erythropoietin gene expression by the GATA transcription factors. *Blood*, 89, 4: 1430–1439
- Imamura R., Moriyama T., Isaka Y., Namba Y., Ichimaru N., Takahara S., Okuyama A. 2007. Erythropoietin protects the kidneys against ischemia reperfusion injury by activating hypoxia inducible factor-1alpha. *Transplantation*, 83, 10: 1371–1379
- Inthal A., Krapf G., Beck D., Joas R., Kauer M.O., Orel L., Fuka G., Mann G., Panzer-Grümayer E.R. 2008. Role of the erythropoietin receptor in ETV6/RUNX1-positive acute lymphoblastic leukemia. *Clinical Cancer Research*, 14, 22: 7196–7204
- Jackson S.P., Jeggo P.A. 1995. DNA double-strand break repair and V(D)J recombination: involvement of DNA-PK. *Trends in Biochemical Sciences*, 20, 10: 412–415
- Jaggi A.S., Singh N. 2012. Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy. *Toxicology*, 291, 1: 1–9

- Janmaat M.L., Heerkens J.L.T., de Bruin A.M., Klous A., de Waard V., de Vries C.J.M. 2010. Erythropoietin accelerates smooth muscle cell-rich vascular lesion formation in mice through endothelial cell activation involving enhanced PDGF-BB release. *Blood*, 115, 7: 1453–1460
- Jelkmann W. 1992. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiological Reviews*, 72, 2: 449–489
- Jelkmann W. 1998. Proinflammatory cytokines lowering erythropoietin production. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 18, 8: 555–559
- Jelkmann W. 2011. Regulation of erythropoietin production. *Journal of Physiology*, 589, 6: 1251–1258
- Jelkmann W., Bohlius J., Hallek M., Sytkowski A.J. 2008. The erythropoietin receptor in normal and cancer tissues. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 67, 1: 39–61
- Jeong J.Y., Feldman L., Solar P., Szenajch J., Sytkowski A.J. 2008. Characterization of erythropoietin receptor and erythropoietin expression and function in human ovarian cancer cells. *International Journal of Cancer*, 122, 2: 274–280
- Jumbe N.L. 2002. Erythropoietic agents as neurotherapeutic agents: what barriers exist? *Oncology*, 16, 9, Suppl 10: 91–107
- Kanda N., Watanabe S. 2004. 17β -estradiol stimulates the growth of human keratinocytes by inducing cyclin d2 expression. *Journal of Investigative Dermatology*, 123, 2: 319–328
- Kassouf M.T., Hughes J.R., Taylor S., McGowan S.J., Soneji S., Green A.L., Vyas P., Porcher C. 2010. Genome-wide identification of TAL1's functional targets: insights into its mechanisms of action in primary erythroid cells. *Genome Research*, 20, 8: 1064–1083
- Ketteler R., Heinrich A.C., Offe J.K., Becker V., Cohen J., Neumann D., Klingmüller U. 2002. A functional green fluorescent protein-erythropoietin receptor despite physical separation of JAK2 binding site and tyrosine residues. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 29: 26547–26552
- Klingmüller U., Lorenz U., Cantley L.C., Neel B.G., Lodish H.F. 1995. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell*, 80, 5: 729–738

- 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. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1776, 1: 1–9
- Koury S.T., Bondurant M.C., Koury M.J., Semenza G.L. 1991. Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. *Blood*, 77, 11: 2497–2503
- Kröning R., Lichtenstein A., Nagami G. 2000. Sulfur-containing amino acids decrease cisplatin cytotoxicity and uptake in renal tubule epithelial cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 45, 1: 43–49
- Kumar P. 2000. Impact of Anemia in Patients With Head and Neck Cancer. *Oncologist*, 5, Suppl 2: 13–18
- Kumar S., Walia V., Ray M., Elble R.C. 2007. p53 in breast cancer: mutation and counter-measures. *Frontiers in Bioscience*, 12: 4168–4178
- Kumar S.M., Acs G., Fang D., Herlyn M., Elder D.E., Xu X. 2005. Functional erythropoietin autocrine loop in melanoma. *American Journal of Pathology*, 166, 3: 823–830
- Kumar S.R., Singh J., Xia G., Krasnoperov V., Hassanieh L., Ley E.J., Scehnet J., Kumar N.G., Hawes D., Press M.F., F.A. W., Gill P. 2006. Receptor tyrosine kinase EphB4 is a survival factor in breast cancer. *The American Journal of Pathology*, 169, 1: 279–293
- Kutuk O., Arisan E.D., Tezil T., Shoshan M.C., Basaga H. 2009. Cisplatin overcomes Bcl-2-mediated resistance to apoptosis via preferential engagement of Bak: critical role of Noxa-mediated lipid peroxidation. *Carcinogenesis*, 30, 9: 1517–1527
- 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. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5, 2: 347–355
- Larsson A.M., 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. *Clinical Cancer Research*, 15, 17: 5552–5559
- Leyland-Jones B. 2003. Breast cancer trial with erythropoietin terminated unexpectedly. *Lancet Oncology*, 4, 8: 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. *Journal of Clinical Oncology*, 23, 25: 5960–5972
- Li Q., Eklund A.C., Juul N., Haibe-Kains B., Workman C.T., Richardson A.L., Szallasi Z., Swanton C. 2010. Minimising immunohistochemical false negative ER classification using a complementary 23 gene expression signature of ER status. *PLoS One*, 5, 12: e15031
doi: 10.1371/journal.pone.0015031
- Liang K., Esteva F.J., Albarracin C., Stemke-Hale K., Lu Y., Bianchini G., Yang C.Y., Li Y., Li X., Chen C.T., Mills G.B., Hortobagyi G.N., Mendelsohn J., Hung M.C., Fan Z. 2010. Recombinant human erythropoietin antagonizes trastuzumab treatment of breast cancer cells via Jak2-mediated Src activation and PTEN inactivation. *Cancer Cell*, 18, 5: 423–435
- 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, 4: 981–990
- Liu Y., Ludes-Meyers J., Zhang Y., Munoz-Medellin D., Kim H.T., Lu C., Ge G., Schiff R., Hilsenbeck S.G., Osborne C.K., Brown P.H. 2002. Inhibition of AP-1 transcription factor causes blockade of multiple signal transduction pathways and inhibits breast cancer growth. *Oncogene*, 21, 50: 7680–7689
- Livnah O., Stura E.A., Middleton S.A., Johnson D.L., Jolliffe L.K., Wilson I.A. 1999. Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science*, 283, 5404: 987–990
- Lu C., Shen Q., DuPré E., Kim H., Hilsenbeck S., Brown P.H. 2005. cFos is critical for MCF-7 breast cancer cell growth. *Oncogene*, 24, 43: 6516–6524
- Ludwig H., Crawford J., Osterborg A., Vansteenkiste J., Henry D.H., Fleishman A., Bridges K., Glaspy J.A. 2009. Pooled analysis of individual patient-level data from all randomized, double-blind, placebo-controlled trials of darbepoetin alfa in the treatment of patients with chemotherapy-induced anemia. *Journal of Clinical Oncology*, 27, 17: 2838–2847
- Lukyanova N.Y., Rusetskya N., Tregubova N., Chekhun V. 2009. Molecular profile and cell cycle in MCF-7 cells resistant to cisplatin and doxorubicin. *Experimental Oncology*, 31, 2: 87–91

- Macgregor J.I., Jordan V.C. 1998. Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacological reviews*, 50, 2: 151–196
- Maga G., Hübscher U. 2003. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *Journal of Cell Science*, 116, 15: 3051–3060
- Makita T., Hernandez-Hoyos G., Chen T.H., Wu H., Rothenberg E.V., Sucov H.M. 2001. A developmental transition in definitive erythropoiesis: erythropoietin expression is sequentially regulated by retinoic acid receptors and HNF4. *Genes and Development*, 15, 7: 889–901
- Malik G., Knowles L.M., Dhir R., Xu S., Yang S., Ruoslahti E., Pilch J. 2010. Plasma fibronectin promotes lung metastasis by contributions to fibrin clots and tumor cell invasion. *Cancer Research*, 70, 11: 4327–4334
- Maouche L., Cartron J.P., Chretien S. 1994. Different domains regulate the human erythropoietin receptor gene transcription. *Nucleic Acids Research*, 22, 3: 338–346
- Mariggio S., Bavec A., Natale E., Zizza P., Salmona M., Corda D., Di Girolamo M. 2006. Galpha13 mediates activation of the cytosolic phospholipase A2alpha through fine regulation of ERK phosphorylation. *Cellular Signalling*, 18, 12: 2200–2208
- Martin F., Linden T., Katschinski D.M., Oehme F., Flamme I., Mukhopadhyay C.K., Eckhardt K., Tröger J., Barth S., Camenisch G., Wenger R.H. 2005. Copper-dependent activation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1: implications for ceruloplasmin regulation. *Blood*, 105, 12: 4613–4619
- Matsuzaki T., Aisaki K., Yamamura Y., Noda M., Ikawa Y. 2000. Induction of erythroid differentiation by inhibition of Ras/ERK pathway in a friend murine leukemia cell line. *Oncogene*, 19, 12: 1500–1508
- Maxwell P.H., Osmond M.K., Pugh C.W., Heryet A., Nicholls L.G., Tan C.C., Doe B.G., Ferguson D.J., Johnson M.H., Ratcliffe P.J. 1993a. Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney International*, 44, 5: 1149–1162
- Maxwell P.H., Pugh C.W., Ratcliffe P.J. 1993b. Inducible operation of the erythropoietin 3' enhancer in multiple cell lines: evidence for a widespread oxygen-sensing mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 6: 2423–2427

- Mayeux P., Dusanter-Fourt I., Muller O., Mauduit P., Sabbah M., Druker B., Vainchenker W., Fischer S., Lacombe C., Gisselbrecht S. 1993. Erythropoietin induces the association of phosphatidylinositol 3'-kinase with a tyrosine-phosphorylated protein complex containing the erythropoietin receptor. *European Journal of Biochemistry*, 216, 3: 821–828
- McDonnell D.P., Clemm D.L., Hermann T., Goldman M.E., Pike J. 1995. Analysis of estrogen receptor function in vitro reveals three distinct classes of antiestrogens. *Molecular Endocrinology*, 9, 6: 659–669
- McKinney M., Arcasoy M.O. 2011. Erythropoietin for oncology supportive care. *Experimental Cell Research*, 317, 9: 1246–1254
- Michalides R., Griekspoor A., Balkenende A., Verwoerd D., Janssen L., Jalink K., Floore A., Velds A., van't Veer L., Neefjes J. 2004. Tamoxifen resistance by a conformational arrest of the estrogen receptor alpha after PKA activation in breast cancer. *Cancer Cell*, 5, 6: 597–605
- Michiels C., Minet E., Mottet D., Raes M. 2002. Regulation of gene expression by oxygen: NF-kappaB and HIF-1, two extremes. *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 9: 1231–1242
- Mikkola H.K.A., Klintman J., Yang H., Hock H., Schlaeger T.M., Fujiwara Y., Orkin S.H. 2003. Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene. *Nature*, 421, 6922: 547–551
- Mirmohammadsadegh A., Marini A., Gustrau A., Delia D., Nambiar S., Hassan M., Hengge U.R. 2010. Role of erythropoietin receptor expression in malignant melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*, 130, 1: 201–210
- Miyashita T., Reed J.C. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 80, 2: 293–299
- Moebus V., Lueck H., Thomssen C., Harbeck N., Nitz U., Kreienberg R., Jackisch C., Schneeweiss A., Huober J., du Bois A., Untch M. 2007. The impact of epoetin-alpha on anemia, red blood cell (RBC) transfusions, and survival in breast cancer patients (pts) treated with dose-dense sequential chemotherapy: Mature results of an AGO phase III study (ETC trial). *Journal of Clinical Oncology*, 25, 18S: 569–569
- Morakkabati N., Gollnick F., Meyer R., Fandrey J., Jelkmann W. 1996. Erythropoietin induces Ca²⁺ mobilization and contraction in rat mesangial and aortic smooth muscle cultures. *Experimental Hematology*, 24, 2: 392–397

- Morita M., Ohneda O., Yamashita T., Takahashi S., Suzuki N., Nakajima O., Kawauchi S., Ema M., Shibahara S., Udonon T., Tomita K., Tamai M., Sogawa K., Yamamoto M., Fujii-Kuriyama Y. 2003. HLF/HIF-2 α is a key factor in retinopathy of prematurity in association with erythropoietin. *EMBO Journal*, 22, 5: 1134–1146
- Mujoo K., Watanabe M., Nakamura J., Khokhar A.R., Siddik Z.H. 2003. Status of p53 phosphorylation and function in sensitive and resistant human cancer models exposed to platinum-based DNA damaging agents. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 129, 12: 709–718
- Neumann D., Wikström L., Watowich S.S., Lodish H.F. 1993. Intermediates in degradation of the erythropoietin receptor accumulate and are degraded in lysosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 18: 13639–13649
- Nishiya D., Omura T., Shimada K., Matsumoto R., Kusuyama T., Enomoto S., Iwao H., Takeuchi K., Yoshikawa J., Yoshiyama M. 2006. Effects of erythropoietin on cardiac remodeling after myocardial infarction. *Journal of Pharmacological Sciences*, 101, 1: 31–39
- Noguchi C.T., Asavaritikrai P., Teng R., Jia Y. 2007. Role of erythropoietin in the brain. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 64, 2: 159–171
- Noguchi C.T., Bae K.S., Chin K., Wada Y., Schechter A.N., Hankins W.D. 1991. Cloning of the human erythropoietin receptor gene. *Blood*, 78, 10: 2548–2556
- Nordstrom B.L., Luo W., Fraeman K., Whyte J.L., Nordyke R.J. 2008. Use of erythropoiesis-stimulating agents among chemotherapy patients with hemoglobin exceeding 12 grams per deciliter. *Journal of Managed Care Pharmacy*, 14, 9: 858–869
- Notas G., Kampa M., Pelekanou V., Castanas E. 2012. Interplay of estrogen receptors and GPR30 for the regulation of early membrane initiated transcriptional effects: A pharmacological approach. *Steroids*, 77, 10: 943–950
- Notas G., Pelekanou V., Castanas E., Kampa M. 2010. Conjugated and non-conjugated androgens differentially modulate specific early gene transcription in breast cancer in a cell-specific manner. *Steroids*, 75, 8-9: 611–618
- Obara N., Suzuki N., Kim K., Nagasawa T., Imagawa S., Yamamoto M. 2008. Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood*, 111, 10: 5223–5232

- Osborne C.K., Bardou V., Hopp T.A., Chamness G.C., Hilsenbeck S.G., Fuqua S.A., Wong J., Allred D.C., Clark G.M., Schiff R. 2003. Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 95, 5: 353–361
- Osborne C.K., Shou J., Massarweh S., Schiff R. 2005. Crosstalk between estrogen receptor and growth factor receptor pathways as a cause for endocrine therapy resistance in breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 11, 2: 865s–870s
- Osborne C.K., Yochmowitz M.G., Knight W.A., McGuire W.L. 1980. The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Cancer*, 46, S12: 2884–2888
- O'Shaughnessy J.A. 2002. Effects of epoetin alfa on cognitive function, mood, asthenia, and quality of life in women with breast cancer undergoing adjuvant chemotherapy. *Clinical Breast Cancer*, 3, Suppl 3: S116–S120
- Overgaard J., Hoff C., Sand Hansen H., Specht L., Overgaard M., Grau C., Andersen E., Johansen J., Andersen L.J., Evensen J. 2007. Randomized study of the importance of Novel Erythropoiesis Stimulating Protein (Aranesp (R)) for the effect of radiotherapy in patients with primary squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC)-the Danish Head and Neck Cancer Group DAHANCA 10 randomized trial. *European Journal of Cancer Supplements*, 5, 6: 7–7
- Paech K., Webb P., Kuiper G.G., Nilsson S., Gustafsson J.Å., Kushner P.J., Scanlan T.S. 1997. Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites. *Science*, 277, 5331: 1508–1510
- Palumbo C., Battisti S., Carbone D., Albonici L., Alimandi M., Bei R., Modesti A. 2008. Recombinant erythropoietin differently affects proliferation of mesothelioma cells but not sensitivity to cisplatin and pemetrexed. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 61, 5: 893–901
- Papworth K., Bergh A., Grankvist K., Ljungberg B., Rasmuson T. 2009. Expression of erythropoietin and its receptor in human renal cell carcinoma. *Tumour Biology*, 30, 2: 86–92
- Parsa C.J., Kim J., Riel R.U., Pascal L.S., Thompson R.B., Petrofski J.A., Matsumoto A., Stamler J.S., Koch W.J. 2004. Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 20: 20655–20662

- Pelekanou V., Kampa M., Kafousi M., Dambaki K., Darivianaki K., Vrekoussis T., Sanidas E., Tsiftsis D.D., Stathopoulos E.N., Castanas E. 2007. Erythropoietin and its receptor in breast cancer: correlation with steroid receptors and outcome. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 16, 10: 2016–2023
- Pelekanou V., Notas G., Sanidas E., Tsapis A., Castanas E., Kampa M. 2010. Testosterone membrane-initiated action in breast cancer cells: Interaction with the androgen signaling pathway and EPOR. *Molecular Oncology*, 4, 2: 135–149
- Pietras R.J., Arboleda J., Reese D.M., Wongvipat N., Pegram M.D., Ramos L., Gorman C.M., Parker M.G., Sliwkowski M.X., Slamon D.J. 1995. HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene*, 10, 12: 2435–2446
- Podhorecka M., Skladanowski A., Bozko P. 2010. H2AX phosphorylation: its role in DNA damage response and cancer therapy. *Journal of Nucleic Acids*, 2010: 920161
10.4061/2010/920161
- Pratt M.C., Satkunarathnam A., Novosad D.M. 1998. Estrogen activates raf-1 kinase and induces expression of Egr-1 in MCF-7 breast cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 189, 1-2: 119–125
- Puthalakath H., Strasser A., in sod. 2002. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death and Differentiation*, 9, 5: 505–512
- Quelle D.E., Quelle F.W., Wojchowski D.M. 1992. Mutations in the WSAWSE and cytosolic domains of the erythropoietin receptor affect signal transduction and ligand binding and internalization. *Molecular and Cellular Biology*, 12, 10: 4553–4561
- Rankin E.B., Biju M.P., Liu Q., Unger T.L., Rha J., Johnson R.S., Simon M.C., Keith B., Haase V.H. 2007. Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, 117, 4: 1068–1077
- Ray-Coquard I., Dussart S., Goillot C., Mayeur D., Debourdeau P., Ghesquieres H., Bachelot T., Le Cesne A., Anglaret B., Agostini C., Guastalla J.P., Lancry L., Biron P., Desseigne F., Blay J.Y. 2009. A risk model for severe anemia to select cancer patients for primary prophylaxis with epoetin alpha: a prospective randomized controlled trial of the ELYPSE study group. *Annals of Oncology*, 20, 6: 1105–1112

- Remy I., Wilson I.A., Michnick S.W. 1999. Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science*, 283, 5404: 990–993
- Renzi M.J., Farrell F.X., Bittner A., Galindo J.E., Morton M., Trinh H., Jolliffe L.K. 2002. Erythropoietin induces changes in gene expression in PC-12 cells. *Molecular Brain Research*, 104, 1: 86–95
- Ribatti D., Presta M., Vacca A., Ria R., Giuliani R., Dell’Era P., Nico B., Roncali L., Dammacco F. 1999. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood*, 93, 8: 2627–2636
- Ring A., Dowsett M. 2004. Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocrine-Related Cancer*, 11, 4: 643–658
- 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 Hematology/American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *Blood*, 111, 1: 25–41
- Ross J.S., Fletcher J.A. 1998. The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *Stem Cells*, 16, 6: 413–428
- Ruvolo P., Deng X., May W., in sod. 2001. Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia*, 15, 4: 515–522
- Rybak L.P., Mukherjea D., Jajoo S., Ramkumar V. 2009. Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 219, 3: 177
- Saintigny P., Besse B., Callard P., Vergnaud A.C., Czernichow S., Colombat M., Girard P., Validire P., Breau J.L., Bernaudin J.F., Soria J.C. 2007. Erythropoietin and erythropoietin receptor coexpression is associated with poor survival in stage I non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 13, 16: 4825–4831
- Saleh E.M., El-awady R.A., Anis N., El-sharkawy N. 2012. Induction and repair of dna double-strand breaks using constant-field gel electrophoresis and apoptosis as predictive markers for sensitivity of cancer cells to cisplatin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 66, 7: 554–562

- Sánchez-González P.D., López-Hernández F.J., López-Novoa J.M., Morales A.I. 2011. An integrative view of the pathophysiological events leading to cisplatin nephrotoxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 41, 10: 803–821
- Sancho-Martínez S.M., Piedrafita F.J., Cannata-Andía J.B., López-Novoa J.M., López-Hernández F.J. 2011. Necrotic concentrations of cisplatin activate the apoptotic machinery but inhibit effector caspases and interfere with the execution of apoptosis. *Toxicological Sciences*, 122, 1: 73–85
- Sancho-Martínez S.M., Prieto-García L., Prieto M., López-Novoa J.M., López-Hernández F.J. 2012. Subcellular targets of cisplatin cytotoxicity: an integrated view. *Pharmacology and Therapeutics*, 136, 1: 35–55
- Sato T., Watanabe S., Ishii E., Tsuji K., Nakahata T. 1998. Induction of the erythropoietin receptor gene and acquisition of responsiveness to erythropoietin by stem cell factor in HML/SE, a human leukemic cell line. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 27: 16921–16926
- Sawyer S.T., Krantz S.B., Luna J. 1987. Identification of the receptor for erythropoietin by cross-linking to Friend virus-infected erythroid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, 11: 3690–3694
- Scortegagna M., Morris M.A., Oktay Y., Bennett M., Garcia J.A. 2003. The HIF family member EPAS1/HIF-2 α is required for normal hematopoiesis in mice. *Blood*, 102, 5: 1634–1640
- Shi Z., Hodges V.M., Dunlop E.A., Percy M.J., Maxwell A.P., El-Tanani M., Lappin T.R. 2010. Erythropoietin-induced activation of the JAK2/STAT5, PI3K/Akt, and Ras/ERK pathways promotes malignant cell behavior in a modified breast cancer cell line. *Molecular Cancer Research*, 8, 4: 615–626
- Shiau A.K., Barstad D., Loria P.M., Cheng L., Kushner P.J., Agard D.A., Greene G.L. 1998. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*, 95, 7: 927–937
- Shimizu R., Komatsu N., Nakamura Y., Nakauchi H., Nakabeppu Y., Miura Y. 1996. Role of c-jun in the inhibition of erythropoietin receptor-mediated apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 222, 1: 1–6

- Shingo T., Sorokan S.T., Shimazaki T., Weiss S. 2001. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *Journal of Neuroscience*, 21, 24: 9733–9743
- Shou J., Massarweh S., Osborne C.K., Wakeling A.E., Ali S., Weiss H., Schiff R. 2004. Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 96, 12: 926–935
- Siddik Z.H. 2003. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22, 47: 7265–7279
- Silva M., Benito A., Sanz C., Prosper F., Ekhterae D., Nuvez G., Fernandez-Luna J.L. 1999. Erythropoietin can induce the expression of bcl-x(L) through Stat5 in erythropoietin-dependent progenitor cell lines. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 32: 22165–22169
- Sinclair A.M., Todd M.D., Forsythe K., Knox S.J., Elliott S., Begley C.G. 2007. Expression and function of erythropoietin receptors in tumors: implications for the use of erythropoiesis-stimulating agents in cancer patients. *Cancer*, 110, 3: 477–488
- Smith C.L., Nawaz Z., O'Malley B.W. 1997. Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Molecular Endocrinology*, 11, 6: 657–666
- Socolovsky M., Fallon A.E., Lodish H.F. 1998. The prolactin receptor rescues EpoR^{-/-} erythroid progenitors and replaces EpoR in a synergistic interaction with c-kit. *Blood*, 92, 5: 1491–1496
- Solár P., Koval J., Mikes J., Kleban J., Solárová Z., Lazúr J., Hodorová I., Fedorocko P., Sytkowski A.J. 2008. Erythropoietin inhibits apoptosis induced by photodynamic therapy in ovarian cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7, 8: 2263–2271
- Sorenson C.M., Eastman A. 1988. Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum (II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer Research*, 48, 16: 4484–4488
- Steinberg D. 1989. Anemia and cancer. *A Cancer Journal for Clinicians*, 39, 5: 296–304
- Studer L., Csete M., Lee S.H., Kabbani N., Walikonis J., Wold B., McKay R. 2000. Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *Journal of Neuroscience*, 20, 19: 7377–7383

- Sui X., Krantz S.B., You M., Zhao Z. 1998. Synergistic activation of MAP kinase (ERK1/2) by erythropoietin and stem cell factor is essential for expanded erythropoiesis. *Blood*, 92, 4: 1142–1149
- Sun H., Lesche R., Li D.M., Liliental J., Zhang H., Gao J., Gavrilova N., Mueller B., Liu X., Wu H. 1999. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3, 4, 5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 11: 6199–6204
- Suzuki N., Obara N., Yamamoto M. 2007. Use of gene-manipulated mice in the study of erythropoietin gene expression. *Methods in Enzymology*, 435: 157–177
- Swift S., Ellison A.R., Kassner P., McCaffery I., Rossi J., Sinclair A.M., Begley C.G., Elliott S. 2010. Absence of functional EpoR expression in human tumor cell lines. *Blood*, 115, 21: 4254–4263
- Syed R.S., Reid S.W., Li C., Cheetham J.C., Aoki K.H., Liu B., Zhan H., Osslund T.D., Chirino A.J., Zhang J., Finer-Moore J., Elliott S., Sitney K., Katz B.A., Matthews D.J., Wendoloski J.J., Egrie J., Stroud R.M. 1998. Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation. *Nature*, 395, 6701: 511–516
- Szczzech L.A., Barnhart H.X., Inrig J.K., Reddan D.N., Sapp S., Califf R.M., Patel U.D., Singh A.K. 2008. Secondary analysis of the CHOIR trial epoetin-alpha dose and achieved hemoglobin outcomes. *Kidney International*, 74, 6: 791–798
- Szenajch J., Wcislo G., Jeong J.Y., Szczylik C., Feldman L. 2010. The role of erythropoietin and its receptor in growth, survival and therapeutic response of human tumor cells from clinic to bench - a critical review. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1806, 1: 82–95
- Taniguchi S., Dai C.H., Price J.O., Krantz S.B. 1997. Interferon gamma downregulates stem cell factor and erythropoietin receptors but not insulin-like growth factor-I receptors in human erythroid colony-forming cells. *Blood*, 90, 6: 2244–2252
- Tanner J.W., Chen W., Young R.L., Longmore G.D., Shaw A.S. 1995. The conserved box 1 motif of cytokine receptors is required for association with JAK kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 12: 6523–6530
- Tauchi T., Feng G.S., Shen R., Hoatlin M., Bagby Jr G., Kabat D., Lu L., Broxmeyer H.E. 1995. Involvement of SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syk in erythropoietin receptor signal transduction pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 10: 5631–5635

- ten Bokkel Huinink W.W., de Swart C.A., van Toorn D.W., Morack G., Breed W.P., Hillen H.F., van der Hoeven J.J., Reed N.S., Fairlamb D.J., Chan S.Y., Godfrey K.A., Kristensen G.B., van Tinteren H., Ehmer B. 1998. Controlled multicentre study of the influence of subcutaneous recombinant human erythropoietin on anaemia and transfusion dependency in patients with ovarian carcinoma treated with platinum-based chemotherapy. *Medical Oncology*, 15, 3: 174–182
- Thomas G., Ali S., Hoebbers F.J.P., Darcy K.M., Rodgers W.H., Patel M., Abulafia O., Lucci 3rd 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. *Gynecologic Oncology*, 108, 2: 317–325
- Tonelli M., Hemmelgarn B., Reiman T., Manns B., Reaume M.N., Lloyd A., Wiebe N., Klarenbach S. 2009. Benefits and harms of erythropoiesis-stimulating agents for anemia related to cancer: a meta-analysis. *CMAJ*, 180, 11: 62–71
- Trošt N., Juvan P., Serša G., Debeljak N. 2012. Contrasting effect of recombinant human erythropoietin on breast cancer cell response to cisplatin induced cytotoxicity. *Radiology and Oncology*, 46, 3: 213–225
- Tzukerman M.T., Esty A., Santiso-Mere D., Danielian P., Parker M.G., Stein R.B., Pike J.W., McDonnell D.P. 1994. Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Molecular Endocrinology*, 8, 1: 21–30
- Van Zant G., Shultz L. 1989. Hematologic abnormalities of the immunodeficient mouse mutant, viable motheaten (mev). *Experimental Hematology*, 17, 2: 81–87
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3, 7: RESEARCH0034
doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034
- Vasudevan N., Pfaff D.W. 2007. Membrane-initiated actions of estrogens in neuroendocrinology: emerging principles. *Endocrine Reviews*, 28, 1: 1–19
- Vaziri N.D., Zhou X.J., Liao S.Y. 1994. Erythropoietin enhances recovery from cisplatin-induced acute renal failure. *American Journal of Physiology*, 266, 3: 360–366

- Verdier F., Chrétien S., Billat C., Gisselbrecht S., Lacombe C., Mayeux P. 1997. Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-2. An alternate pathway for erythropoietin-induced phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 42: 26173–26178
- Vesey D.A., Cheung C., Pat B., Endre Z., Gobé G., Johnson D.W. 2004. Erythropoietin protects against ischaemic acute renal injury. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 19, 2: 348–355
- Vivacqua A., Bonofiglio D., Recchia A.G., Musti A.M., Picard D., Andò S., Maggiolini M. 2006. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells. *Molecular Endocrinology*, 20, 3: 631–646
- Vivacqua A., Romeo E., De Marco P., De Francesco E.M., Abonante S., Maggiolini M. 2012. GPER mediates the Egr-1 expression induced by 17beta-estradiol and 4-hydroxytamoxifen in breast and endometrial cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 133, 3: 1025–1035
- Wang D.Y., Fulthorpe R., Liss S.N., Edwards E.A. 2004. Identification of estrogen-responsive genes by complementary deoxyribonucleic acid microarray and characterization of a novel early estrogen-induced gene: EEIG1. *Molecular Endocrinology*, 18, 2: 402–411
- Weidemann A., Johnson R.S. 2009. Nonrenal regulation of EPO synthesis. *Kidney International*, 75, 7: 682–688
- Weiss M.J. 2003. New insights into erythropoietin and epoetin alfa: mechanisms of action, target tissues, and clinical applications. *Oncologist*, 8, Suppl 3: 18–29
- Westphal 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, 2: 150–159
- Wide L., Bengtsson C. 1990. Molecular charge heterogeneity of human serum erythropoietin. *British Journal of Haematology*, 76, 1: 121–127
- Wincewicz A., Koda M., Sulkowska M., Kanczuga-Koda L., Wincewicz D., Sulkowski S. 2009. STAT3 and hypoxia induced proteins–HIF-1alpha, EPO and EPOR in relation with Bax and Bcl-xL in nodal metastases of ductal breast cancers. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 47, 3: 425–430

- Winter S.S., Howard T., Ware R.E. 1996. Regulation of expression of the human erythropoietin receptor gene. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 22, 3: 214–24
- Wu C., Orozco C., Boyer J., Leglise M., Goodale J., Batalov S., Hodge C.L., Haase James J.J., Huss J.W., Su A. 2009. BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biology*, 10, 11: R130
doi: 10.1186/gb-2009-10-11-r130
- Xia K., Mukhopadhyay N.K., Inhorn R.C., Barber D.L., Rose P.E., Lee R.S., Narsimhan R.P., D'Andrea A.D., Griffin J.D., Roberts T.M. 1996. The cytokine-activated tyrosine kinase JAK2 activates Raf-1 in a p21ras-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 21: 11681–11686
- Yasuda Y., Fujita Y., Masuda S., Musha T., Ueda K., Tanaka H., Fujita H., Matsuo T., Nagao M., Sasaki R., Nakamura Y. 2002. Erythropoietin is involved in growth and angiogenesis in malignant tumours of female reproductive organs. *Carcinogenesis*, 23, 11: 1797–1805
- Zanjani E.D., Poster J., Burlington H., Mann L.I., Wasserman L.R. 1977. Liver as the primary site of erythropoietin formation in the fetus. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 89, 3: 640–644
- Zhan Q. 2005. Gadd45a, a p53-and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage. *Mutation Research*, 569, 1: 133–143
- Zon L.I., Youssoufian H., Mather C., Lodish H.F., Orkin S.H. 1991. Activation of the erythropoietin receptor promoter by transcription factor GATA-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 23: 10638–10641

ZAHVALA

Hvala mentorici, doc. dr. Nataši Debeljak, za vso pomoč, ideje, konstruktivne razprave in kritike. Dobro si znala združiti profesionalni in osebni nivo.

Hvala članoma komisije, prof. dr. Simonu Horvatu in prof. dr. Gregorju Serši, za hiter pregled doktorskega dela in konstruktivne pripombe.

Hvala doc. dr. Petru Juvanu, ki mi je pomagal pri statistični obdelavi podatkov ter mi predstavil čare in pasti statistike R ter vsem sodelavcem CFGBC za pomoč v laboratoriju in iskanju novih idej in novih poti. Brez vas bi bili moji dnevi precej bolj sivi.

Special thanks to Monika Lewinska who invited me to join her on a trip to Japan. I was at the right time in the right place and got a great career opportunity.

Hvala vsem sodelavcem, ki so mi pomagali pri delu: prof. dr. T. Lanišnik-Rižner ter dr. Neli Hevir za sodelovanje pri raziskavah estrogenskega sistema v raku dojke ter doc. dr. Mirjani Liović in Tini Zupančič za proteinske analize na cisplatinskem sistemu. Hvala prof. dr. Gregorju Serši, ki mi je omogočil delo v celičnem laboratoriju na Onkološkem inštituti ter vsem njegovim sodelavcem, ki so me toplo sprejeli medse. Hvala tudi dr. Toniju Petanu in Anji Pucer za pomoč pri delu s celičnimi linijami.

Zahvaljujem se tudi Agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS) za finančno podporo mojega doktorskega projekta.

Predvsem pa hvala moji družini, ki me je tekom študija moralno in finančno podpirala.

PRILOGE

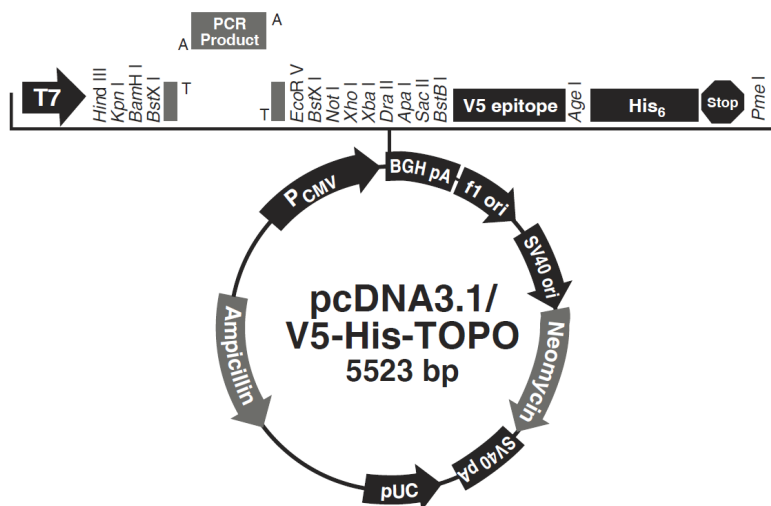
Priloga A

Geni, vključeni na qPCR ploščici p53 StellarRay (Lonza, 00188319)

SHISA5, JUN, DDR1, STEAP3, CUL9, SESN3, SFN, MYC, BTG2, BAX, CDC25A, E2F3, RRM2, EGR1, CCNG2, XRCC5, CD82, CDKN2A, SERPINE1, BRCA2, PCNA, CRADD, NF1, BCL2, TP53BP2, GADD45A, CDK2, PRC1, CDKN1A, RRM2B, CDK4, E2F1, MDM2, MLH1, SERPINB5, PTEN, CHEK2, CCND1, APEX1, TP53, CASP8, TNF, ESR1, VCAN, BID, FADD, SESN1, EP300, FOXO3, SIRT1, HIF1A, ATM, HSGenomic, BAI1, THBS1, BNIP3, TP63, HSPB1, BRCA1, RELA, MCL1, CDC2, PMAIP1, DNMT1, CCNB1, BBC3, PERP, XRCC4, Hs18s, FAS, PPM1D, IGFBP3, RB1, MSH2, RCHY1, CCND3, CDK6, CASP3, DDB3, CDC25C, ZMAT3, WT1, APAF1, STAT1, CHEK1, CASP2, MDM4, RPRM, EI24, TSC2, TP73, CCNG1, TNFRSF10A, LRDD, DAPK1, CASP9.

Priloga B

Shema plazmidnega vektorja psDNA3.1/V5-His TOPO in sekvenca poliklonskega mesta
plazmidnega vektorja pcDNA3.1/V5-His TOPO



761 CCCATTGACG CAAT GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG GTCTATATAA 3' konec CMV promotorja začetek prepisovanja
841 CTGCTTACTG GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGT TAAGCTTGGT ACCGAGCTCG
921 GATCCACTAG TCCAGTGTGG TGGAATTGCC CTT PCR Product AAG GGC AAT TCT GCA GAT ATC CAG CAC AGT GGC
987 GGC CGC TCG AGT CTA GAG GGC CCG CGG TTC GAA GGT AAG CCT ATC CCT AAC CCT CTC CTC GGT CTC
1053 GAT TCT ACG CGT ACC GGT CAT CAT CAC CAT CAC CAT TGA GTTTAAACCC GCTGATCAGC CTCGACTGTG
1122 CCTTCTAGTT GCCAGCCATC TGTGTGTTGC CCCTCCCCCG TGCCTTCCTT GACCCTGGAA GGTGCCACTC CCACTGTCCT
1202 TTCCTAATAA AATGAGGAAA TTGCATCGCA TTGTCTGAGT AGGTGTCATT CTATTCTGGG GGGTGGGGTG GGCAGGAC

Priloga C

Sekvenca *EPOR* divjega tipa z oligonukleotidnima začetnikoma (označena rdeče) za prekloniranje v plazmidni vektor pcDNA3.1/V5-His TOPO

ATCATGGACCACCTCGGGGCGTTATCATGGACCACCTCGGGGCGTCCCTCTGGCCCCAGGTCTG
GCTCCCTTTGTCTCCTGCTCGCTGGGGCCGCCTGGGCGCCCCCGCCTAACCTCCCGGACCCCA
AGTTCGAGAGCAAAGCGGCCTTGCTGGCGGCCCGGGGGCCCGAAGAGCTTCTGTGCTTCACCG
AGCGGTTGGAGGACTTGGTGTGTTTCTGGGAGGAAGCGGCGAGCGCTGGGGTGGGCCCCGGGC
AACTACAGCTTCTCCTACCAGCTCGAGGATGAGCCATGGAAGCTGTGTGCGCTGCACCAGGCTC
CCACGGCTCGTGGTGCGGTGCGCTTCTGGTGTTCGCTGCCTACAGCCGACACGTGCGAGCTTCG
TGCCCCTAGAGTTGCGCGTCACAGCAGCCTCCGGCGCTCCGCGATATCACCGTGCATCCACAT
CAATGAAGTAGTGCTCCTAGACGCCCCCGTGGGGCTGGTGGCGCGGTTGGCTGACGAGAGCG
GCCACGTAGTGTTGCGCTGGCTCCCGCCGCTGAGACACCCATGACGTCTCACATCCGCTACG
AGGTGGACGTCTCGGCCGGCAACGGCGCAGGGAGCGTACAGAGGGTGGAGATCCTGGAGGGC
CGCACCGAGTGTGTGCTGAGCAACCTGCGGGGCCGGACGCGCTACACCTTCGCCGTCCGCGC
GCGTATGGCTGAGCCGAGCTTCGGCGGCTTCTGGAGCGCCTGGTCGGAGCCTGTGTGCTGCTGCT
GACGCCTAGCGACCTGGACCCCCTCATCCTGACGCTCTCCCTCATCCTCGTGGTCATCCTGGTG
CTGCTGACCGTGCTCGCGCTGCTCTCCACCGCCGGGCTCTGAAGCAGAAGATCTGGCCTGGC
ATCCCGAGCCCAGAGAGCGAGTTTGAAGGCCTCTTACCACCCACAAGGGTAACCTCCAGCTGT
GGCTGTACCAGAATGATGGCTGCCTGTGGTGGAGCCCCCTGCACCCCCTTACGGAGGACCCAC
CTGCTTCCCTGGAAGTCCTCTCAGAGCGCTGCTGGGGGACGATGCAGGCAGTGGAGCCGGGGA
CAGATGATGAGGGCCCCCTGCTGGAGCCAGTGGGCAGTGAGCATGCCCAGGATACCTATCTGG
TGCTGGACAAATGGTTGCTGCCCCGGAACCCGCCAGTGAGGACCTCCAGGGCCTGGTGGCA
GTGTGGACATAGTGGCCATGGATGAAGGCTCAGAAGCATCCTCCTGCTCATCTGCTTTGGCCTC
GAAGCCCAGCCCAGAGGGAGCCTCTGCTGCCAGCTTTGAGTACACTATCCTGGACCCCAGCTC
CCAGCTCTTGCGTCCATGGACACTGTGCCCTGAGCTGCCCCCTACCCACCCACCTAAAGTAC
CTGTACCTTGTGGTATCTGACTCTGGCATCTCAACTGACTACAGCTCAGGGGACTCCCAGGGAG
CCCAAGGGGGCTTATCCGATGGCCCCTACTCCAACCCTTATGAGAACAGCCTTATCCCAGCCGC
TGAGCCTCTGCCCCCAGCTATGTGGCTTGCTCTTAG