Posttranskripcijsko utišavanje stresnih proteina pomoću siRNA nanoterapije

Matokanović, Mirela

Doctoral thesis / Disertacija

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:304528

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Mirela Matokanović

POSTTRANSKRIPCIJSKO UTIŠAVANJE STRESNIH PROTEINA POMOĆU siRNA NANOTERAPIJE

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2013.



University of Zagreb
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Mirela Matokanović

POSTTRANSCRIPTIONAL SILENCING OF HEAT SHOCK PROTEINS USING siRNA NANOTHERAPY

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2013

Sveučilište u Zagrebu
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Mirela Matokanović

POSTTRANSKRIPCIJSKO UTIŠAVANJE STRESNIH PROTEINA POMOĆU siRNA NANOTERAPIJE

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Karmela Barišić

Zagreb, 2013.

University of Zagreb
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Mirela Matokanović

POSTTRANSCRIPTIONAL SILENCING OF HEAT SHOCK PROTEINS USING siRNA NANOTHERAPY

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Prof. Karmela Barišić, PhD

Zagreb, 2013

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Rad je izrađen na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i dijelom na Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montreal, Kanada, u sklopu doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti" Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u okviru projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa "Posttranskripcijsko utišavanje stresnih proteina pomoću siRNA nanoterapije" (006-0061117-1236).

Svojoj mentorici, prof. dr. sc. Karmeli Barišić, pod čijim je voditeljstvom izrađen ovaj rad, zahvaljujem na pruženoj prilici, mentorstvu i dragocjenoj pomoći prilikom izrade i pisanja ovog rada.

Many thanks to dr. sc. Dusica Maysinger for her scientific input and for all the time she invested in me. To all the members of her laboratory at Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, many thanks for creating an inspiring and friendly enviroment that enabled me to successfully complete this thesis.

Svim članovima Zavoda za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu zahvaljujem na ugodnoj radnoj atmosferi i pomoći koju su mi pružili tijekom izrade ovog rada. Mojoj dragoj Ladi, mojoj dragoj Mariji i mojoj dragoj Aniti, kolegicama i prijateljicama, posebno veliko hvala!

Svim članovima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu posebice prof. dr. sc. Jeleni Filipović-Grčić i doc. dr. sc. Aniti Hafner zahvaljujem na ugodnoj suradnji.

Mojoj dragoj Sonji hvala na prijateljstvu i potpori od prvog susreta!

Mojem dragom tati i mojoj brižnoj majci zahvaljujem na ljubavi i podršci koju su mi pružili kroz život.

Mojoj najdražoj sestri i Mariju hvala što su uvijek tu za mene!

Mojem Tomiju hvala na ljubavi, beskrajnom strpljenju i bezuvjetnoj podršci!

SAŽETAK

Stresni proteini (HSP) pripadaju skupini unutarstaničnih proteina koji su eksprimirani konstitutivno i kao odgovor na fizikalni odnosno biološki stres. U staničnom odgovoru na stres HSP imaju ulogu stabiliziranja proteina i peptida čime promoviraju preživljenje stanice. Hsp27 i Hsp70 inhibitori su različitih čimbenika apoptoze, dok je glavna uloga Hsp90 osiguravanje aktivnost čimbenika uključenih u proliferaciju stanica. Sposobnost stresnih proteina da zaustave proces programirane stanične smrti i potaknu proliferaciiju predstavlja bitan aspekt njihove povezanosti s malignom proliferacijom.

Glavni cilj ovog istraživanja bio je procijeniti ulogu Hsp70 u zaštiti od programirane stanične smrti u tumorskim stanicama. U tom smislu ispitana je uloga inducibilnog oblika Hsp70 u fiziološkim i stresnim uvjetima. Hsp70, induciran stresom, pokazao je značajnu ulogu u zaštiti tumorskih stanica od stanične smrti izazvane staurosporinom. U svrhu utišavanja ekspresije Hsp70 pri fiziološkim uvjetima korištena je tehnologija koja počiva na RNA interferenciji, specifičnoj razgradnji ciljne mRNA pomoću kratke siRNA uklopljene u nanočestice. Dizajnirane su kitozanske nanočestice za dostavu Hsp70 sljedno-specifične siRNA. U uvjetima *in vitro* kitozanske nanočestice pokazale su nisku toksičnost, učinkovito uklapanje Hsp70 siRNA te učinkovito utišavanje Hsp70. U staničnim linijama Jurkat i U251N utišavanje Hsp70 omogućeno pomoću Hsp70 siRNA uklopljene u kitozanske nanočestice, prouzročilo je smanjenje vijabilnosti ovih tumorskih staničnih linija.

U radu je ispitana i antitumorska učinkovitost istovremene inhibicije Hsp90, pomoću celastrola, i Hsp70 pomoću kitozanskih nanočestica s uklopljenom Hsp70 siRNA. Učinkovitost ovog pristup bila je značajna u dvodimenzionalnim modelima tumorskih staničnih linija, dok su u trodimenzionalnim modelima bile potrebne povećane koncentracije oba spoja/sustava kako bi se postiglo značajno smanjenje vijabilnosti tumorskih stanica.

Rad predstavlja temelje za daljnja istraživanja optimalnih nanosustava za dostavu sljedno-specifičnih siRNA za HSP te moguća ispitivanja istovremene inhibicije Hsp70 i Hsp90 u tumorskim modelima *in vivo*.

Ključne riječi: *tumor, stresni proteini, Hsp70, RNA interferencija, kitozanske nanočestice*

SUMMARY

Stress proteins (HSP) are intracellular proteins expressed constitutively but can also be induced by various types of stress including environmental changes and non-stress conditions such as cell cycle, growth factors, development and differentiation. Under physiological conditions these proteins function as molecular chaperones that enable the function of different proteins. Hsp27 and Hsp70 appear to function at key regulatory control points in apoptotic process, whereas the major role of Hsp90 is protection from degradation for the major factors responsible for cell proliferation. The promotion of tumor cell survival is closely related to the ability of Hsp to inhibit programmed cell death during malignant proliferation.

The purpose and the main goal of the proposed study was to explore Hsp70's role in protection against programmed cell death in tumor cells. The role of stress induced Hsp70 and the role of Hsp70 within physiological levels was explored. Stress induced Hsp70 was found to efficiently protect tumor cells against cell death promoted with staurosporin. Hsp70 silencing was accomplished using the technology based on RNA interference, specific degradation of mRNA after binding with siRNA delivered into the cells with nanoparticles. Chitosan based nanoparticles for Hsp70 siRNA delivery were prepared. These showed low toxicity, efficient siRNA entrapment and efficient Hsp70 silencing. In Jurkat and U251N cell lines Hsp70 silencing with Hsp70 siRNA delivered in chitosan nanoparticles significantly decreased cell viability.

The antitumor efficiency of simultaneous inhibition of Hsp90 with celastrol and Hsp70 with chitosan nanoparticles entrapping Hsp70 siRNA was also explored. Significant reduction in cell viability was observed in two-dimensional cell cultures, while for the induction of comparable effect in three-dimensional cell cultures, U251N spheroids, higher concentration of both celastrol and Hsp70 siRNA were necessary.

The results of this work present important findings that could lead into the development of optimal delivery systems for siRNA and possible *in vivo* research of Hsp70/Hsp90 inhibition approach.

Keywords: *tumor, stress proteins, Hsp70, RNA interference, chitosan nanoparticles*

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. TUMORSKE STANICE I SPOSOBNOST ODOLIJEVANJA PROGRAMIRANOJ STANIČNOJ SMRTI 2

1.1.1. Glavna obilježja tumorskog tkiva i tumorskih stanica 2

1.1.2. Tumorske stanice i sposobnost odolijevanja različitim oblicima stanične smrti 4

1.1.3. Povećana ekspresija antiapototičkih proteina kao podloga za rast i razvoj tumora 7

1.2. PROTEINI TOPLINSKOG STRESA 9

1.2.1. Glavna obilježja i stanična uloga proteina toplinskog stresa 9

1.2.2. Porodice HSP27, HSP70 i HSP90 i njihova antiapoptotička uloga 11

1.2.3. Inhibicija Hsp27 i Hsp90 kao antitumorska terapija 15

1.2.4. Inhibicija Hsp70 kao antitumorska terapija 16

1.2.5. Izvanstanični Hsp70 i njihova uloga u tumorogenezi 18

1.3. RNA INTERFERENCIJA 19

1.3.1. Mehanizam i uloga RNA interferencije 19

1.3.2. Viralni i neviralni vektori za unos siRNA u stanice 21

1.3.3. Kitozanske nanočestice kao vektori za unos siRNA 22

1.4. SVRHA I CILJEVI RADA 24

2. EKSPERIMENTALNI DIO 25

2.1. MATERIJALI 26

2.1.1. Instrumenti i uređaji 26

2.1.2. Stanične linije 27

2.1.3. Standardne kemikalije i puferi 27

2.1.4. Kemikalije i kompleti kemikalija s posebnom namjenom 30

2.2. METODE 33

2.2.1. Kultura stanica 33

2.2.2. Priprema i karakterizacija kitozanskih nanočestica 34

2.2.3. Transfekcija stanica i utišavanje Hsp70 36

2.2.4. Određivanje stanične vijabilnosti i proliferacije 37
2.2.5. Određivanje oblika stanične smrti 41
2.2.6. Određivanje genske ekspresije 44
2.2.7. Određivanje ekspresije proteina 46
2.2.8. Statistička obrada rezultata 50

3. REZULTATI 51

3.1. UVODNI PREGLED REZULTATA 52

3.2. ULOGA INDUCIBILNOG Hsp70 U ZAŠTITI OD STANIČNE SMRTI 53
3.2.1. Ekspresija inducibilnog Hsp70 u tumorskim stanicama u fiziološkim i stresnim uvjetima 53
3.2.2. Uloga Hsp70 u zaštiti od stanične smrti izazvane staurosporinom 55

3.3. KITOZANSKE NANOČESTICE I UTIŠAVANJE Hsp70 60
3.3.1. Fizikalna svojstva kitozanskih nanočestica 60
3.3.2. Učinkovitost uklapanja siRNA u kitozanske nanočestice 63
3.3.3. Toksičnosti kitozanskih nanočestica 65
3.3.4. Učinkovitost unosa siRNA u tumorske stanice pomoću kitozanskih nanočestica 68
3.3.5. Utišavanje Hsp70 70

3.4. BIOLOŠKA AKTIVNOST KITOZANSKIH NANOČESTICA S UKLOPLJENOM Hsp70 siRNA 71
3.4.1. Utjecaj kitozanskih nanočestica s uklopljenom Hsp70 siRNA na vijabilnost tumorskih stanica 71

3.5. ANTITUMORSKA AKTIVNOST Hsp70 I Hsp90 INHIBITORA 74
3.5.1. Promjena vijabilnosti tumorskih stanica uslijed inhibicije Hsp90 74
3.5.2. Udružena inhibicija Hsp70 i Hsp90 75
3.5.3. Ekspresija Hsp70 u stanicama nakon izlaganja kitozanskim nanočesticama s uklopljenom Hsp70 siRNA i celastrolu 76
3.5.4. Učinak inhibicije Hsp70 i Hsp90 u tumorskim sferoidima 81

4. RASPRAVA 85

4.1. ULOGA POVIŠENE EKSPRESIJE INDUCIBILNOG Hsp70 U ZAŠTITI OD PROGRAMIRANE STANIČNE SMRTI 88

4.1.1. Ekspresija inducibilnog Hsp70 u tumorskim stanicama u fiziološkim i stresnim uvjetima 88

4.1.2. Uloga Hsp70 u zaštiti od stanične smrti izazvane staurosporinom 88

4.2. RNA INTERFERENCIJA I ANTITUMORSKI TERAPEUTICI 91

4.2.1. Terapeutici temeljeni na RNA interferenciji 91

4.2.2. Fizikalna svojstva kitozanskih nanočestica 93

4.2.3. Učinkovitost uklapanja siRNA, toksičnost K-TPP-siRNA i utišavanje *hsp70* 95

4.2.4. Biološka aktivnost kitozanskih nanočestica s uklopljenom Hsp70 sljedno-specifičnom siRNA 96

4.3. ANTITUMORSKA AKTIVNOST Hsp70 I Hsp90 INHIBITORA 99

4.3.1. Udruženi tretman inhibitorima aktivnosti Hsp90 s utišavanjem ekspresije Hsp70 99

4.3.2. Učinkovitosti udruženog tretmana Hsp90 inhibitora i Hsp70 inhibitora u tumorskim sferoidima 101

***SMJERNICE ZA BUDUĆA ISTRAŽIVANJA* 104**

5. ZAKLJUČCI 106

6. LITERATURA 109

7. PRILOG 119

8. ŽIVOTOPIS 146

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA 150

BASIC DOCUMENTATION CARD 151

POPIS KRATICA

AGO	protein argonaut (*engl*. Argonaute)
Akt	protein kinaza B
Apaf-1	apoptozni proteazni aktivirajući faktor (*engl*. apoptosis protease activating factor-1)
Bad	Bcl-2 asociran promotor smrti (*engl.* Bcl-2-associated death promoter)
BAK	antagonist proteina Bcl-2 (*engl.* Bcl-2 homologous antagonist/killer)
Bax	Bcl-2 asociran protein X (*engl.* Bcl-2–associated X protein)
Bcl-2	protein Bcl-2 (*engl.* B-cell lymphoma 2)
BID	agonist koji stvara interakcije s BH3 (*engl.* BH3 interacting-domain death agonist)
BLK	kinaza B limfocita (*engl.* B lymphocyte kinase)
Bmf	modificirajući faktor proteina Bcl-2 (*engl.* Bcl-2-modifying factor)
BOK	protein srodan proteinu Bcl-2 (*engl.* Bcl-2 related ovarian killer)
BrdU	bromodeoksiuridin
CPZ	kloropromazin
DGCR8	kompleks proteina koji prepoznaje miRNA u citoplazmi (*engl*. DiGeorge syndrome critical region 8)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (*engl.* deoxyribonucleic acid)
DISC	kompleks proteina za induciranje stanične smrti (*engl*. death inducing signaling complex)
ELISA	enzimski imunotest na čvrstoj fazi (*engl*. Enzyme-linked immunosorbent assay)
FasL	FAS ligand
FasR	receptor za FAS ligand
FBS	goveđi fetalni serum (*engl*. foetal bovine serum)
GAPDH	gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza
HIF1α	transkripcijski faktor induciran nedostatkom kisika (*engl.* hypoxia-inducible factor 1α)
Hrk	protein aktivator apoptoze (*engl.* activator of apoptosis harakiri)
HSE	element toplinskog stresa (*engl*. heat shock element)
Hop	Hsp70-Hsp90 organizirajući protein (*engl*. Hsp70-Hsp90 organizing protein)
HSF1	transkripcijski faktor toplinskog šoka 1 (*engl*. heat shock transcription factor 1)

HSP proteini toplinskog stresa (*engl.* heat shock proteins)

IAP proteini inhibitori apoptoze (*engl*. inhibitors of apoptosis)

IKK I-κB kinaza (*engl*. I-κB kinase)

LD letalna doza

LKB1 gen za jetrenu proteinsku kinazu B1 (*engl*. liver kinase B1)

K-TPP kitozanske nanočestice s TPP-om i uklopljenom siRNA

K-TPP-siRNA kitozanske nanočestice s TPP-om i uklopljenom siRNA

K-TPP-Hsp70 siRNA kitozanske nanočestice s TPP-om i uklopljenom siRNA sljedno-specifičnom za inducibilni oblik Hsp70

K-TPP-negativna siRNA kitozanske nanočestice s TPP-om i uklopljenom ne-specifičnom siRNA

miRNA mikro RNA (*engl.* micro RNA)

mRNA glasnička RNA (*engl*. messenger RNA)

MOMP permeabilizacija vanjske mitohondrijske membrane (*engl*. mitochondrial outer membrane permeabilization)

mTOR vezni protein za rapamicin (*engl.* mammalian target of rapamycin)

NADPH nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (*engl*. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)

NF-κB jezgreni faktor kappa B (e*ngl.* nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells)

NF2 neurofibromin

PARP poli (ADP-riboza) polimeraza (*engl*. poly ADP- ribose polymerase)

PBS fosfatni pufer (*engl*. phosphate buffer saline)

PEI polietilenimin (*engl*. polyethyleneimine)

PFA *p*-formaldehid

PI propidij jodid

PI3KI fosfatidil inozitid 3-kinaza (*engl*. phosphatidylinositide 3-kinase)

PS penicilin-streptomicin

p53 protein 53

rb protein asociran s retinoblastoma (*engl.* retinoblastoma associated)

RIP kinaza koja je u interakciji s receptorima (*engl*. receptor interacting protein kinase)

RISC kompleks proteina za utišavanje induciran s RNA (*engl*. RNA induced silencing complex)

RNAi	RNA interferencija
SDS	natrijev dodecil sulfat (*engl*. sodium dodecyl sulphate)
shRNA	mala omčasta RNA (*engl*. small hairpin RNA)
siRNA	mala interferirajuća RNA (*engl*. small interfering RNA)
STS	staurosporin
TNF	tumorski nekrotizirajući faktor (*engl*. tumor necrosis factor)
TPP	natrijev tripolifosfat
TRBP	TAR protein koji veže RNA (*engl*. TAR RNA-binding protein)
TRAIL-R	receptor za ligand koji inducira apopotozu, a srodan je TNF-u (*engl*. TNF related apoptosis inducing ligand receptor)
VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta (*engl*. vascular endothelial growth factor)
17-AAG	17-alilamino 17-demetoksigeldanamicin

1. UVOD

1.1. TUMORSKE STANICE I SPOSOBNOST ODOLIJEVANJA PROGRAMIRANOJ STANIČNOJ SMRTI

1.1.1. Glavna obilježja tumorskog tkiva i tumorskih stanica

Tumor je patološka promjena koja nastaje kada zdrave stanice organizma započnu nekontroliran rast i razvoj. U ljudskom organizmu može se razviti čak 200 različitih vrsta tumora, budući da u tijelu postoji jednak broj različitih vrsta stanica. Tumor može nastati kao dobroćudna (benigna) tvorevina koja ne može metastazirati, ali može ipak imati negativne posljedice za ljudski organizam ili kao zloćudna (maligna) tvorevina, odnosno rak koja može metastazirati i dovesti do kobnih posljedica za zdravlje i konačno do smrti organizma. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (*engl*. World Health Organization, WHO) u 2008. godini rak je bio uzrok smrti u čak 7,6 milijuna osoba, a procjenjuje se da bi se ta brojka mogla udvostručiti do 2030. godine. Stoga je razumljivo da rak kao bolest predstavlja izrazit sociološki i ekonomski teret za ljudsko društvo.

Tijekom proteklih 20 godina brojnim istraživanjima usmjerenim prema nalaženju načina prevencije i liječenja ove bolesti utvrđeno je nekoliko obilježja zajedničkih različitim vrstama tumora:

1) stalna proliferacija,
2) neosjetljivost na signale za kontrolu rasta,
3) odolijevanje staničnoj smrti,
4) izlučivanje proupalnih molekula,
5) odolijevanje imunološkom odbacivanju,
6) neograničeno umnožavanje DNA,
7) induciranje angiogeneze,
8) invazija u zdrava tkiva i metastaziranje,
9) ″aerobna glikoliza″,
10) nestabilnost genoma (Hanahan i Weinberg, 2000; Hanahan i Weinberg, 2011).

Za razliku od zdravog tkiva u kojem postoji stroga kontrola stvaranja i otpuštanja faktora koji potiču rast i razvoj stanica ta je homeostaza, odnosno ravnoteža između rasta i kontrole rasta, u tumorskim tkivima poremećena. Povećani izražaj receptora za faktore rasta na površini stanice, poticanje okolnih zdravih stanica na proizvodnju faktora rasta (Witsch i sur., 2010) te nepravilnosti u mehanizmima povratne inhibicije proliferativnog staničnog signaliziranja, poput onih u signalnom putu veznog proteina za rapamicin (mTOR-a, od *engl*. mammalian target of rapamycin; Guertin i Sabatini, 2005), samo su neki od načina na koji si tumorske stanice osiguravaju stalnu proliferaciju. Neosjetljivost malignih tumorskih stanica na signale za kontrolu rasta temelji se na mutacijama bilo u tumorskim supresorskim genima poput retinoblastoma gena (*rb,* od *engl*. retinoblastoma associated) i gena za protein 53 (*p53,* od *engl*. tumor protein 53; Burkhart i Sage, 2008) koji u normalnim stanicama sudjeluju u kontroli stanične diobe u glavnim kontrolnim točkama staničnog ciklusa ili u mutacijama u genima odgovornima za kontrolu rasta na temelju kontaktne inhibicije kao što su neurofibromin gen (*NF2,* od *engl*. neurofibromin 2; Curto i sur., 2007) i gen za jetrenu proteinsku kinazu B1 (*LKB1,* od *engl*. liver kinase B1; Shaw, 2009).

Maligne tumorske stanice odolijevaju programiranoj staničnoj smrti, bilo da se radi o autofagiji koja rezultira staničnom smrću ili o apoptozi. Međutim, učestalost umiranja tumorskih stanica nekrozom povećana je, posebice u brzo rastućim malignim tumorskim tkivima. Na taj način oslobađaju se proupalne molekule koje privlače upalne stanice poput podvrsta makrofaga, zatim neutrofile te T i B limofocite. Otpuštanjem faktora rasta upalne stanice osiguravaju daljnji razvoj tumora. Uz to, maligna tumorska tkiva odolijevaju prepoznavanju od strane upalnih stanica te ne dolazi do njihovog imunološkog uništavanja (Hanahan i Weinberg, 2011).

Povećana ekspresija telomeraze, enzima koji sprječava skraćivanje telomera tijekom stanične diobe, osigurava neograničeno umnožavanje DNA u tumorskim stanicama (Buseman i sur., 2012), a prekomjerna ekspresija vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF, od *engl*. vascular endothelial growth factor; Carmeliet, 2005) inducira proces angiogeneze u malignim tumorskim tkivima. Zbog neprestanih dioba metabolizam tumorskih stanica usmjeren je prema aerobnoj glikolizi. Tako se osiguravaju energija i prekursori za neograničeno umnožavanje DNA koje je podloga za nestabilnost genoma te u konačnici dovodi do mutacija koje pridonose daljnjem razvoju malignih tumorskih tkiva (Hanahan i Weinberg, 2011).

1.1.2. Tumorske stanice i sposobnost odolijevanja različitim oblicima stanične smrti

Stanična smrt definira se kao pojava u kojoj je došlo do gubitka cjelovitosti plazmatske membrane, fragmentacije stanice i/ili stanične jezgre te probavljanja stanice ili njenih dijelova od strane susjednih vijabilnih stanica. Istraživanja su pokazala da se različite vrste stanične smrti događaju kao rezultat strogo kontroliranih interakcija unutar i izvan stanice. Poznato je da različitim poticajima u zdravim i tumorskim stanicama mogu biti izazvana tri osnovna programirana katabolička događaja: apoptoza, donedavno opisivana kao jedini oblik programirane stanične smrti, autofagija koja ne mora nužno dovesti do smrti stanice i nekroza (Kroemer i sur., 2009).

Apoptoza, prvi puta opisana 1972. godine (Kerr i sur., 1972), vrsta je stanične smrti kod koje dolazi do smanjivanja staničnog volumena, kondenzacije i fragmentacije jezgre, bubrenja stanične membrane te gubitka adhezivnih interakcija sa susjednim stanicama. Biokemijske promjene koje se događaju u apoptozi uključuju kidanje DNA na mono- i oligo-nukleosomalne fragmente, izražaj fosfatidilserina na vanjskoj strani plazmatske membrane te aktiviranje unutarstaničnih proteaza (Ouyang i sur., 2012; Kroemer i sur., 2009). Apoptoza je genetički reguliran proces koji igra važnu ulogu u homeostazi tijekom rasta i razvoja organizma, stoga je razumljivo da poremećaji u regulaciji ovog tipa programirane stanične smrti mogu biti primarni uzrok različitih bolesti uključujući tumorske i autoimune bolesti te različite degenerativne poremećaje.

Apoptoza može biti potaknuta na dva načina: a) unutarstanično, kroz niz događaja ovisnih o mitohondrijima ili b) nakon vezanja liganada na receptore smrti. Unutarstanični put apoptoze aktivira se kada je stanica izložena vanjskom stresnom utjecaju poput UV ili gama zračenja, toplinskog stresa, virusnih infekcija ili nedostatka faktora rasta (Plati i sur., 2011). Signal vanjskog stresnog utjecaja prenosi se unutarstanično do mitohondrija, što ima za posljedicu permeablizaciju vanjske mitohondrijske membrane (MOMP, od *engl.* mitochondrial outer membrane permeabilization) i difuziju proteina koji su prethodno bili vezani uz mitohondrijsku membranu u citosol. Bcl-2 (od *engl*. B-cell lymphoma 2) porodica proteina ima glavnu ulogu u regulaciji MOMP-a, a čine ju tri klase: antiapoptotički proteini (koje su članovi Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Bcl-10 i Bcl-2 srodni protein A1), pro-apoptotički proteini (koje su članovi BAK, od *engl.* Bcl-2 homologous antagonist/killer, Bax, od *engl.* Bcl-2–associated X protein, Bcl-rambo, Bcl-xs i BOK, od *engl.* Bcl-2 related ovarian killer) i pro-apoptotički proteini s BH3 domenom koji kontroliraju aktivnost antiapoptotičkih Bcl-2 proteina (Bad, od *engl.* Bcl-2-associated death promoter, BID, od *engl*. BH3 interacting-domain death agonist, BLK, od *engl*. B lymphocyte kinase, Bmf, od *engl.* Bcl-2-modifying

factor i Hrk, od *engl.* activator of apoptosis harakiri; Cory i Adams, 2002). Ravnoteža u aktivnosti između pro-apoptotičkih i antiapoptotičkih Bcl-2 proteina ključni je čimbenik koji određuje hoće li štetni vanjski utjecaj uzrokovati MOMP. Ukoliko se ravnoteža pomakne prema povećanoj aktivnosti pro-apoptotičkih Bcl-2 proteina, citokrom c se nakon otpuštanja iz mitohondrija veže na apoptozni proteazni aktivirajući faktor (Apaf-1, od *engl*. apoptosis protease activating factor-1), pri čemu nastaje apoptosom koji kida prokaspazu-9. Aktivna kaspaza-9 nizvodno aktivira krajnje izvršitelje apoptoze, kaspaze -3, -6 i -7, što konačno dovodi do stanične smrti (Bouchier-Hayes i sur., 2005; Wang, 2001; Plati i sur., 2011). U tumorskim stanicama različitog podrijetla ravnoteža je redovito pomaknuta prema povećanoj aktivnosti antiapoptotičkih Bcl-2 proteina, što objašnjava njhovu otpornost prema staničnoj smrti posredovanoj ovim signalnim putem (Placzek i sur., 2010).

Vezanje liganda na receptore stanične smrti izražene na vanjskoj strani stanične membrane dovodi do pokretanja apoptoze koja ne mora uključivati promjene u mitohondrijskim membranama. Receptori smrti podčlanovi su obitelji receptora za tumorski nekrotizirajući faktor (TNF, od *engl*. tumor necrosis factor) i obuhvaćaju TNF-α receptor, receptor za FAS ligand (FasL), receptor1 za ligand koji inducira apopotozu, a srodan je TNF-u (TRAIL-R1, od *engl*. TNF related apoptosis inducing ligand receptor 1) i TRAIL receptor 2 (TRAIL-R2). Signal koji se sa stanične membrane prenosi od receptora smrti u unutrašnjost stanice događa se kroz oligomerizaciju receptora i unutarstaničnog motiva receptora, tzv. domene smrti (DD, od *engl*. death domain) te agregaciju proteina s istim motivom u strukturi, odnosno unutarstaničnog proteina s domenom smrti koji se može vezati na FAS receptor (FADD, od *engl*. FAS-associated death domain protein) i na TNFR1. Agregirani proteini u svojoj strukturi imaju i izvršnu domenu smrti (DED, od *engl*. death effector domain) koja je odgovorna za vezanje prokaspaza-8 i -10. Aktivacija receptora stanične smrti putem vezanja liganda na vanjskoj površini stanice dovodi do stvaranja tzv. signalnog kompleksa za induciranje stanične smrti (DISC, od *engl*. death inducing signaling complex) kojega čine svi prethodno navedeni faktori, aktivacije kaspaze-8, te nizvodno aktivacije izvršnih kaspaza-3, -6 i -7, (Guicciardi i Gores, 2009; Jin i El-Deiry, 2005). Tumorske stanice obično sadrže smanjene koncentracije receptora stanične smrti ili se u sastavu njihovih staničnih membrana nalaze receptori koji ne mogu vezati ligand čime su tumorske stanice zaštićene od apoptoze koja može biti potaknuta ovim putem.

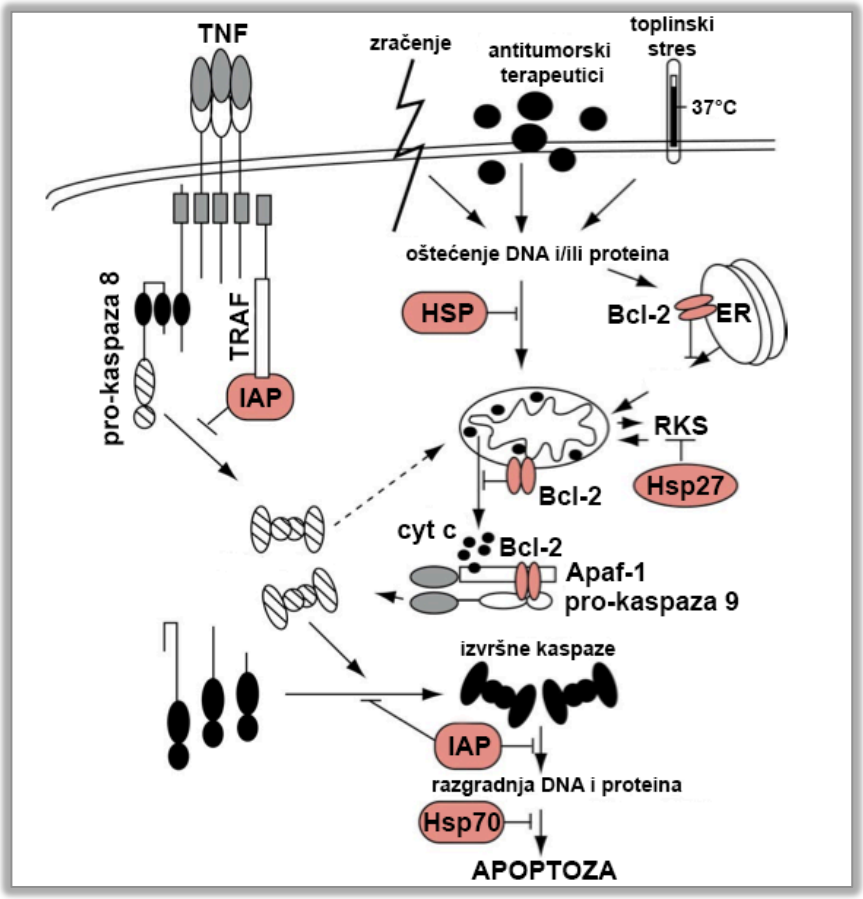
Autofagija je evolucijski konzerviran katabolički proces koji igra ključnu ulogu u preživljenju stanica tijekom razdoblja nedostatnih količina hrane ili faktora rasta i koji može dovesti do stanične smrti. Na makromolekularnoj razini autofagija započinje stvaranjem vakoula, autofagosoma koje obavijaju stanični sadržaj predoređen za recikliranje. Autofagosomi se stapaju s lizosomima u autofagolizosome u kojima se stanični sadržaj razgradi i preradi u nove gradivne molekule koje stanica može iskoristiti kada uvjeti budu povoljni (He i Klionsky, 2009). Glavni regulator autofagije koja dovodi do smrti stanice je mTOR. PI3KI (od *engl*. phosphatidylinositide 3-kinase) i Akt (sinonim za protein kinazu B), signalne kinaze aktivne u signalnim putevima koji potiču staničnu proliferaciju, inhibiraju mTOR. Prekomjerna ekspresija ovih kinaza pokazana je u stanicama različitih vrsta malignih tumora te se pretpostavlja da je i izvršenje autofagije zbog toga u njima inhibirano (Osaki i sur., 2004; S. Chen i sur., 2010).

Nekroza je oblik stanične smrti o kojem se shvaćanje bitno promijenilo u proteklih deset godina. Naime donedavno je smatrano da se nekroza događa kao nekontroliran proces u kojem dolazi do prsnuća stanice međutim, novija istraživanja pokazuju da se povećanje staničnog volumena koje rezultira lizom stanice događa kao strogo kontroliran proces i da se aktivira u uvjetima kada je spriječeno izvršenje apoptoze. Glavni posrednici programirane nekroze su: kinaze koje su interakciji s receptorima (RIP, od *engl*. receptor interacting protein kinase), poli(ADP-riboza) polimeraze (PARP, od *engl*. poly ADP- ribose polymerase), NADPH oksidaze i kalpaini (Galluzzi i Kroemer, 2008; Portt i sur., 2011). Programirana nekroza može inducirati upalu i time promovirati rast tumorskog tkiva zbog novo dopremljenih nutrijenata od strane upalnih stanica. Međutim, pokazano je da se rast nekih vrsta tumora može spriječiti induciranjem nekroze agensima koji oštećuju staničnu DNA (Zong i sur., 2004).

Između apoptoze, autofagije i programirane nekroze, iako svaki od ovih oblika stanične smrti uključuje sebi svojstvene morfološke i biokemijske promjene, odigravaju se brojne interakcije. U nekim slučajevima apoptoza može biti inducirana sinergistički s autofagijom, a u nekima izvršenje autofagije može biti provedeno samo onda kada je apoptoza spriječena (Amelio i sur., 2011), dok se programirana nekroza aktivira kao rezervni mehanizam za apoptozu kada je spriječena aktivnost kaspaza. U dizajniranju antitumorskih lijekova usmjerenih k promoviranju bilo kojeg tipa programirane stanične smrti bitno je obratiti pozornost na kompleksnost ovih interakcija.

1.1.3. Povećana ekspresija antiapototičkih proteina kao podloga za rast i razvoj tumora

U tumorskim stanicama utvrđena je povećana ekspresija niza proteina koji sprječavaju apoptozu i omogućavaju proliferaciju. Povećana ekspresija antiapoptotičkih proteina može uzrokovati agresivan i brzi rast tumorskih tkiva te rezistenciju na antitumorske lijekove. Članovi porodice Bcl-2 proteina, članovi porodice inhibitora apoptoze (IAP, od *engl.* inhibitors of apoptosis) te proteini toplinskog stresa ili stresni proteini (HSP, od *engl.* heat shock proteins) ključni su faktori za koje je pokazano da pridonose zaštiti tumorskih stanica od spontane ili inducirane apoptoze (*slika 1.1.*; Jäättelä, 1999a; Adams i Cory, 2007; Cory i Adams, 2002; Sreedhar i Csermely, 2004).



Slika 1.1. *Prikaz mehanizama kojima antiapoptotički članovi porodice Bcl-2 te članovi porodica IAP i HSP mogu spriječiti izvršenje apoptoze u tumorskim stanicama (ER - endoplazmatski retikul, Cyt c – citokrom c). Preuzeto i prilagođeno iz Jäättelä, 1999a.*

Kako je prikazano na *slici 1.1*. antiapoptotički članovi porodice Bcl-2 proteina inhibiraju otpuštanje citokroma c iz mitohondrija, stvaranje kompleksa Apaf-1/prokaspaza-9 i otpuštanje Ca^{2+} iz endoplazmatskog retikula. Uloga ravnoteže između pro-apoptotičkih i antiapototičkih članova ove porodice u nastanku i razvoju tumora već je prethodno opisana (odjeljak 1.1.2.; stranica 4.). Članovi porodice IAP inhibiraju aktivnost kaspaza, dok je inhibiranje nastajanja reaktivnih kisikovih spojeva, RKS-a, samo jedna od prepoznatih uloga HSP-ova (Jäättelä, 1999a; Q. Chen i sur., 2003; Rohde i sur., 2005; LaCasse i sur., 2008). U narednom poglavlju detaljnije će biti razmatrana uloga HSP-a u tumorogenezi temeljnoj na sprječavanju apoptoze.

1.2. PROTEINI TOPLINSKOG STRESA

1.2.1. Glavna obilježja i stanična uloga proteina toplinskog stresa

Proteini toplinskog stresa ili stresni proteini, porodica su proteina s vrlo konzerviranim slijedom aminokiselina od bakterija do čovjeka. Kako samo ime nalaže, stresni proteini bivaju jače izraženi u različitim stresnim uvjetima Prvotno su otkriveni nakon izlaganja stanica toplinskom stresu (Tissières i sur., 1974), no danas je dobro poznato da se ekspresija stresnih proteina povećava i uslijed prisutnosti drugih vrsta stresa poput reaktivnih kisikovih spojeva, teških metala, različitih citotoksičnih spojeva te bakterijskih i virusnih infekcija. U sisavaca HSP-ovi su klasificirani u 6 porodica prema relativnoj molekulskoj masi: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 i porodica malih HSP (15 do 30 kDa). HSP-ovi s velikom molekulskom masom su šaperoni ovisni o adenozin-trifosfatu (ATP), dok je aktivnost malih HSP-a neovisna o prisutnosti ATP-a. U *tablici 1.1.* prikazana je podjela ljudskih HSP-a u porodice prema relativnoj molekulskoj masi te njihova stanična lokalizacija.

Uloga HSP-a u organizmu je monogostruka. HSP-ovi nisu aktivni u stanici samo uslijed staničnog stresa nego i u normalnim fiziološkim stanjima. Oni igraju kritičnu ulogu u održavanju stanične homeostaze, prvenstveno regulacijom puteva stanične proliferacije i programirane stanične smrti, ali i regulacijom transporta proteina kroz membrane. Kao šaperoni HSP-ovi sudjeluju u strukturiranju staničnih proteina, pomičući tako ravnotežu organizma od denaturiranih nefunkcionalnih proteina prema proteinima s funkcionalnom konformacijom (Khalil i sur., 2011). Povećani izražaj HSP-a kao odgovor na stres, prepoznat kroz nakupljanje denaturiranih proteina, reguliran je aktivnošću transkripcijskog faktora toplinskog šoka 1 (HSF1, od *engl*. heat shock transcription factor 1). HSF1 regulira transkripciju *hsp* gena vezanjem na specifični nukleotidni slijed, nazvan element toplinskog stresa (HSE, od *engl*. heat shock element), predstavljen u većem broju kopija uzvodno od promotora *hsp* gena, a prepoznaje se kao tandem suprotno orijentiranih ponavljanja 5 baznih parova AGGAN. U odsutnosti staničnog stresa transkripcijska aktivnost HSF1 inhibirana je njegovim vezanjem za HSP-ove. Pojava denaturiranih proteina u stanici uslijed stresa dovodi do disocijacije HSF1-HSP kompleksa, nakon čega dolazi do hiperfosforilacije HSF1 koja je praćena trimerizacijom ovog faktora i njegovim premještanjem u jezgru. U jezgri se HSF1 veže na HSE i potiče transkripciju *hsp* gena (Wu, 1995).

Tablica 1.1. *Podjela ljudskih HSP-ova prema relativnoj molekulskoj masi i unutarstanična lokalizacija nekih od članova porodica. Preuzeto i prilagođeno iz Khalil i sur., 2011.*

Porodica	***Najzastupljeniji članovi (alternativni nazivi)***	***Molekulska masa (kDa)/ broj aminokiselina u slijedu***	***Unutarstanična lokacija***
porodica malih HSP-a	Hsp10	10/102	mitohondriji
	Hsp27	22/205	citosol, jezgra
HSP40/DNAJ	Hsp40	38/340	citosol
	DNAJA1	44/397	jezgra, citosol
	DNAJA3	1: 52/480; 2: 49/453*	citosol, mitohondriji
	DNAJB4	37/337	citosol, stanična membrana
	DNAJB6	1: 36/326; 2: 2/241; 3: 35/325*	jezgra, citosol
	DNAJB9	25/223	endoplazmatski retikulum
	DNAJC9	29/260	jezgra
	DNAJC12	1: 23/198; 2: 12/107*	NA
	DNAJC15	16/150	citosol
	CYP40	40/370	citosol
HSP60	Hsp60	61/573	mitohondriji
	CCT1	60/556	citosol
	CCT2	57/535	jezgra
	CCT3	60/545	citosol
	CCT4	57/539	citosol
	CCT5	59/541	citosol
	CCT6A	58/531	citosol
	CCT6B	57/530	citosol
	CCT7	59/543	citosol
HSP70	Hsp70-1 (HSP72, HSPA1A)	70/641	citosol
	Hsp70-2 (HSPA1B)	70/641	citosol
	HSC70 (HSP73, HSPA8)	70/639	citosol
	Grp/Mortalin (HSPA9)	73/679	mitohondriji
	Grp78 (HSPA5)	72/654	endoplazmatski retikulum
HSP90	Hsp90A	86/732	citosol
	Hsp90B	84/724	citosol
	Grp94	92/803	endoplazmatski retikulum
	TRAP1	75/704	mitohondriji

* 1, 2 i/li 3 označava izoforme proteina

U stanicama različitih vrsta tumora nađene su povećane koncentracije članova različitih HSP porodica i upravo se njihova prekomjerna prisutnost smatra razlogom za slabi odgovor na antitumorske lijekove. Tumorske stanice, zbog neprestanih dioba, imaju veće metaboličke potrebe u odnosu na netransformirane stanice što predstavlja jedan od razloga povećane ekspresije HSP-a u njima. Glavna posljedica povećane ekspresije HSP-a je osigurana zaštita od programirane stanične smrti u stanicama tumorskih tkiva, međutim, ustanovljena je i uloga HSP-a u promoviranju angiogeneze i metastaziranju tumora (Zhou i sur., 2004).

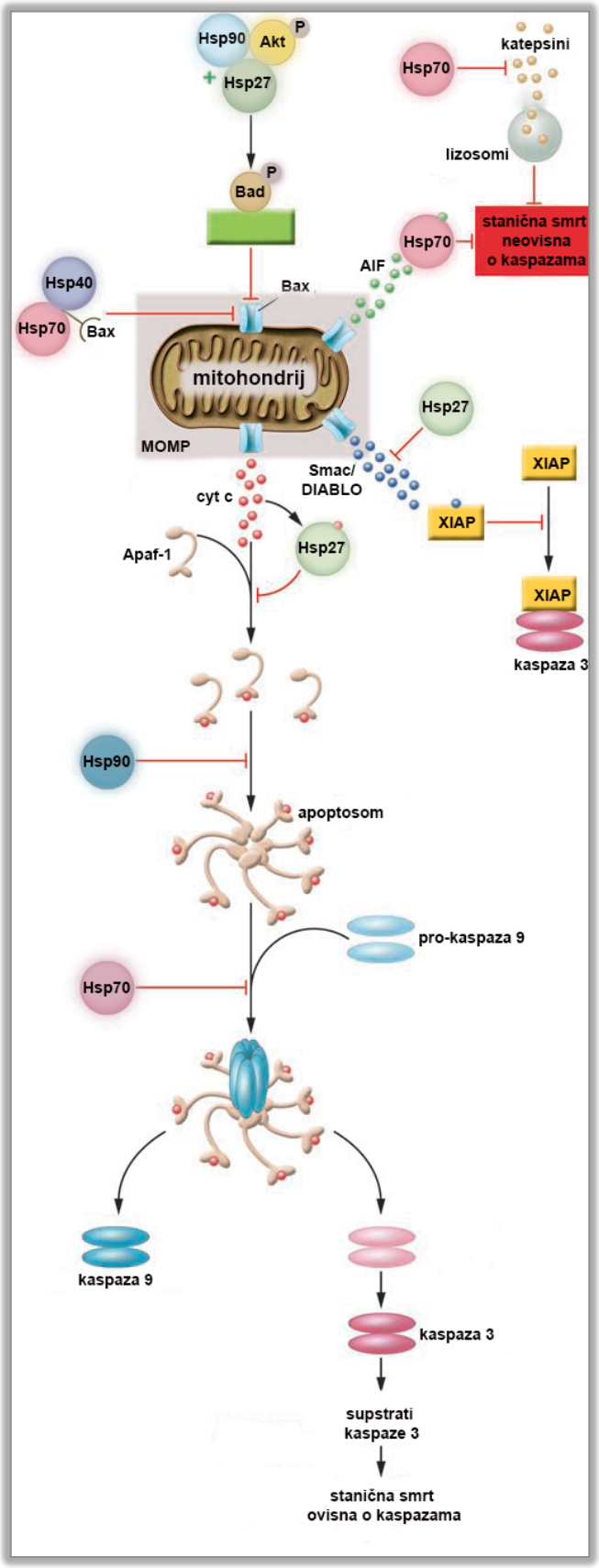
1.2.2. Porodice HSP27, HSP70 i HSP90 i njihova antiapoptotička uloga

Hsp27 pripada porodici malih HSP-a koji su uključeni u stabilizaciju proteina staničnog skeleta i u zaštitne mehanizme usmjerene protiv potencijalno štetnih unutarstaničnih reaktivnih kisikovih spojeva. Visoke koncentracije Hsp27 nađene su u mnogim tipovima tumora, a tumorogeni potencijal Hsp27 pokazan je i u mnogim eksperimentalnim modelima. Hsp27 ne samo da ima ulogu u zaštiti stanica od apoptoze nego pridonosi i invaziji i metastaziranju tumora (Khalil i sur., 2011).

HSP70 porodicu stresnih proteina čini 13 članova. 4 člana porodice su najistraživanija i najčešće se mogu naći u literaturnom pregledu: konstitutivno eksprimirani član porodice, HSC70 (Hsp73 ili HspA8), inducibilno eksprimirani Hsp70-1 (HSPA1A ili Hsp72) i Hsp70-2 (HSPA1B), Grp78 (HSPA5) član porodice prvenstveno smješten u endoplazmatskom retikulu te mitohondrijski Grp (mortalin). Ostali članovi porodice su kako slijedi: HSPA1L, HSPA2, HSPA5, HSPA6, HSPA7, HSPA9, HSPA12A, HSPA12B, HSPA13, HSPA14. Glavni inducibilni članovi porodice, Hsp70-1 i Hsp70-2, razlikuju se u aminokiselinskom slijedu u samo jednoj aminokiselini, a u strukturi oba člana mogu se prepoznati dvije funkcionalne regije: C-terminala regija koja veže peptid i N-terminalna ATP-azna domena. Domena koja veže peptid sadrži šaperonski EEVD motiv i odgovorna je za vezanje supstrata i njegovo prevođenje u funkcionalni oblik. ATP-azna domena omogućava otpuštanje supstrata uslijed hidrolize ATP-a (Kampinga i sur., 2009; Goloudina i sur., 2012).

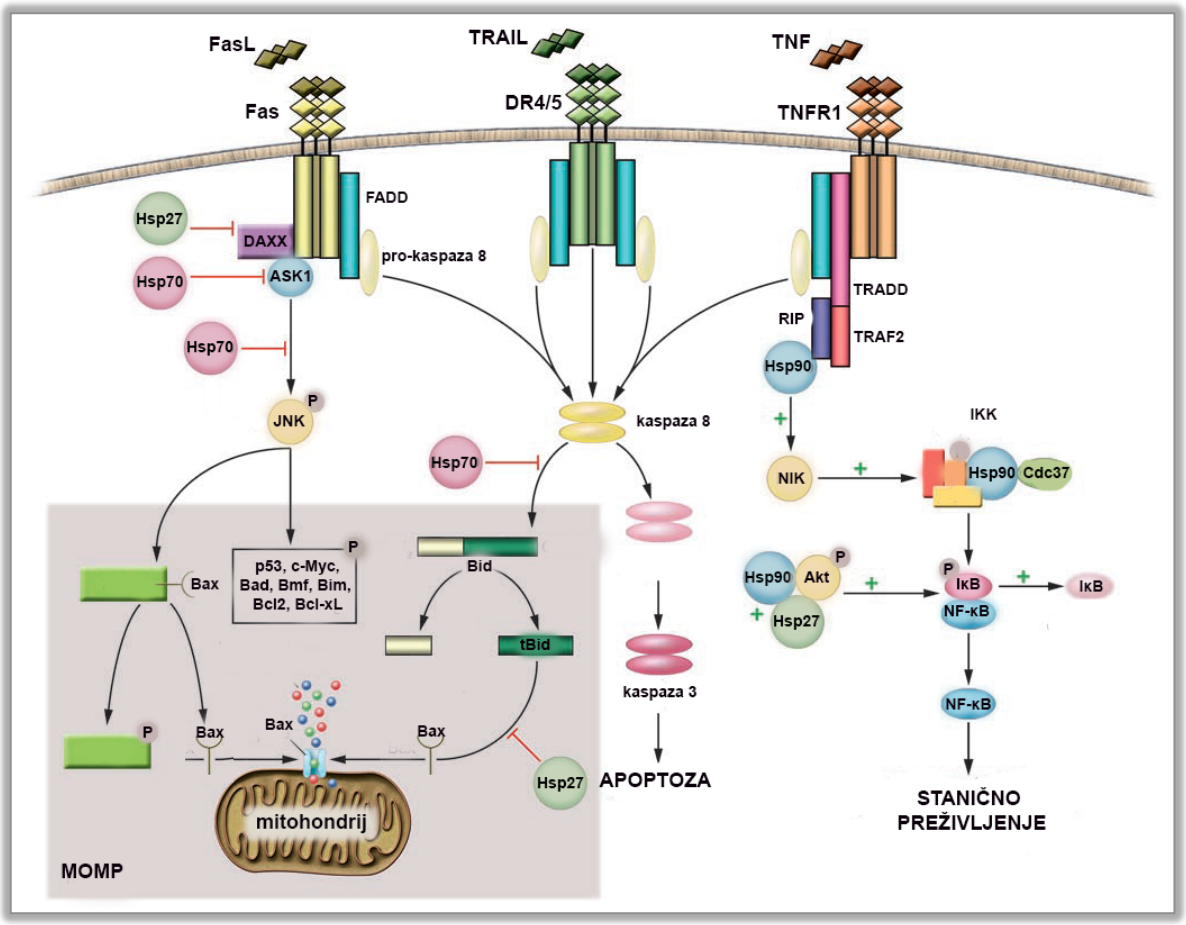
HSP90 porodicu proteina također čine konstitutivno i inducibilno eksprimirani članovi, a aktivni su u istim signalnim putevima u stanici te locirani u istim staničnim odjeljcima kao i članovi porodice HSP70. Ovaj podatak upućuje na važnu interakciju između HSP70 i HSP90 porodice proteina koja se odražava na mnoge stanične procese (Stetler i sur., 2010). HSP90 porodica proteina čini čak 1-2% svih staničnih proteina. Slično kao kod HSP70, šaperonska aktivnost HSP90 ovisi o hidrolizi ATP-a u N-terminalnoj domeni (Sreedhar i sur., 2004).

Proteini Hsp27, Hsp70 i Hsp90 reguliraju unutrašnji, mitohondrijski, put odvijanja apoptoze na nekoliko razina (*slika 1.2.*). Ovi Hsp-ovi mogu inhibirati otpuštanje citokroma c iz mitohondrija sprječavanjem translokacije Bax-a iz citoplazme u mitohondrije, a time sprječavaju i MOMP (Beere, 2005). Nadalje, Hsp70 specifičnom interakcijom s AIF-om sprječava njegovu translokaciju u jezgru, a time i daljnje signaliziranje koje bi inače dovelo do stanične smrti (Ravagnan i sur., 2001). Hsp70 može spriječiti i staničnu smrt neovisnu o kaspazama održavanjem integriteta membrane lizosoma i sprječavanjem otpuštanja katepsina u citosol (Kirkegaard i sur., 2010; Nylandsted i sur., 2004). Nastanak apoptosoma, kao ključni korak u apoptozi posredovanoj mitohondrijima, može biti onemogućen vezanjem Apaf-1 i prokaspaze-9 od strane Hsp70 i Hsp90 (Beere i sur., 2000; Pandey i sur., 2000). Hsp27 također može spriječiti stvaranje apoptosoma vezanjem citokroma c nakon njegova otpuštanja iz mitohondrija.



Slika 1.2. *Hsp27, Hsp70 i Hsp90 u regulaciji mitohondrijski ovisnog puta apoptoze. Preuzeto i prilagođeno iz Beere, 2005.*

Proteini HSP porodice također reguliraju i put odvijanja apoptoze ovisan o signaliziranju s receptora stanične smrti smještenih na vanjskoj površini stanice (*slika 1.3.*). Interakcije HSP-a s pojedinim proteinima u ovom apoptotičkom putu mogu dovesti i do poticanja i do sprječavanja izvršenja apoptoze. Poznato je da različiti HSP-ovi mogu spriječiti aktivnost fosfolipaze A2, nastajanje reaktivnih kisikovih spojeva te aktivnost fosfataza. Hsp70, primjerice, može sprječavanjem aktivacije kaspaze-8 inhibirati otpuštanje citokroma c iz mitohondrija inducirano TNF-α-om (Gabai i sur., 2002; Komarova i sur., 2004). Sposobnost Hsp27 i Hsp90 da reguliraju staničnu smrt posredovanu receptorima povezana je s njihovom regulacijom NF-κB (od *engl.* nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells) signalnog puta odgovornog za stanično preživljenje. Ova regulacija se događa na razini stvaranja IKK (od *engl.* I-κB kinase) kompleksa. Hsp90 se veže u IKK kompleks sa svojim ko-šaperonom Cdc37 i omogućava daljnje signaliziranje ovog puta ka preživljenju stanice (G. Chen i sur., 2002).



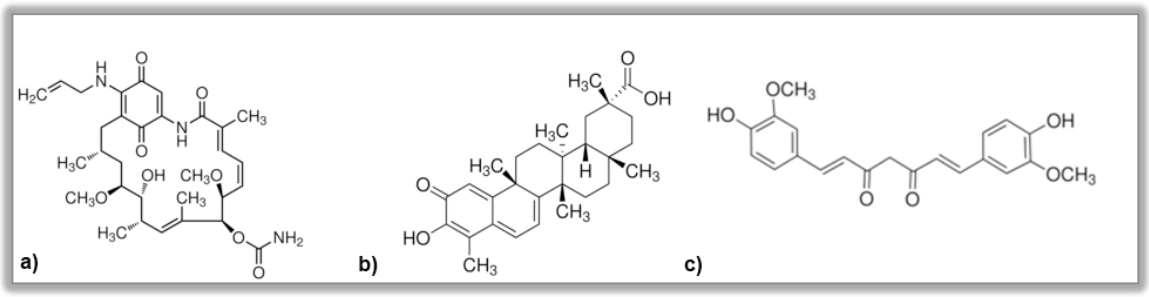
Slika 1.3. *Hsp27, Hsp70 i Hsp90 u regulaciji apoptoze potaknute vezanjem liganada na receptore stanične smrti. Preuzeto i prilagođeno iz Beere, 2005.*

1.2.3. Inhibicija Hsp27 i Hsp90 kao antitumorska terapija

Antiapoptotička svojstva Hsp27 ovisna su o statusu oligomerizacije ovog proteina. Prekomjerna ekspresija Hsp27 nađena je u tumorima poput tumora dojke, tumora jajnika, osteokarcinomu, tumoru endometrija i različitim leukemijama. Utišavanje gena za Hsp27 putem RNA interferencije u staničnim linijama izvedenim iz ovih vrsta tumora izazvalo je umiranje malignih tumorskih stanica programiranom staničnom smrću, apoptozom. Također je uočen sinergistički učinak utišavanja Hsp27 na djelovanje proteasomalnog inhibitora Velcade (PS-341) u kombiniranoj terapiji za liječenje multiplog mijeloma (Chauhan i sur., 2003).

Hsp90 dio je multišaperonskog kompleksa u kojem je ovaj protein u interakciji sa brojnim ko-šaperonima poput p23, Hop ili CHIP. Otkriveno je više od stotinu proteina čije strukturiranje ovisi o stabilnosti i funkcioniranju kompleksa Hsp90 i njegovih ko-šaperona. Mnogi od tih proteina konformacijski su nestabilni prenosioci unutarstaničnih signala i igraju ključnu ulogu u preživljenju stanice, kontroli rasta i razvoja tkiva. Mnogi proteini vezani uz nastanak te rast i razvoj tumora također su identificirani kao proteini čije strukturiranje ovisi o Hsp90. Među njih ubrajamo steroidne receptore (androgene, progesterone, glukokortikoidne receptore), tirozin kinazne receptore (HER2, FLT3, EGFRR, itd.), kinaze porodice SRC (SRC, LCK, itd.) serin/treonin kinaze (AKT, RAF-1, itd.), kinaze G2 kontrolne točke staničnog ciklusa (WE1, MYT1, itd.), transkripcijske faktore (p53, HSF1, HIF1) i dr. (Whitesell i Lindquist, 2005; Lu i sur., 2012; Travers i sur., 2011). Povećana ekspresija Hsp90 nađena je u stanicama tumora dojke, leukemije, Hodginkove bolesti i brojnim drugim vrstama tumora te se stoga inhibicija aktivnosti Hsp90 smatra obećavajućom strategijom za liječenje tumorskih bolesti. Po uzoru na prirodne inhibitore Hsp90, poput radikokola, makrocikličnog antigljivičnog antibiotika orginalno izoliranog iz gljivice *Monocillium nordinii*, geldanamicina, benzokinona anzamicina koji je pokazao antitumorska svojstva na životinjskim modelima, razvijen je, tijekom proteklog desetljeća, i cijeli niz sintetskih inhibitora Hsp90. Prirodni inhibitori Hsp90 vežu se na N-terminalnu domenu proteina odgovornu za vezanje ATP-a puno većim afinitetom nego prirodni unutarstanični nukleotid i stoga sprječavaju izmjenu konformacije Hsp90 iz ADP-vezne u ATP-veznu. Time se inhibira šaperonska aktivnost ovog proteina što dovodi do usmjeravanja proteina čije strukturiranje ovisi o Hsp90 k proteosomalnoj razgradnji (Didelot i sur., 2007). U dizajniranju sintetskih inhibitora nastojalo se inhibirati N-terminalnu ATP-aznu aktivnost Hsp90. Osmišljen je analog geldanamicina, 17-alilamino 17-demetoksi geldanamicin (17-AAG; *slika 1.4. a*), za kojeg je u 2011. godini uspješno završena faza II kliničkih ispitivanja u različitim tipovima

raka (Modi i sur., 2011). No, daljnja potraga za prirodnim inhibitorima Hsp90 je nastavljena. Nađeno je tako da spojevi poput celastrola (*slika 1.4. b*), izoliranog iz korijenskog dijela kore biljke *Trypterygium wilfordii* (Peng i sur., 2010), te kurkumina (*slika 1.4. c*), tradicionalnog začina indijske kuhinje (Kunnumakkara i sur., 2008), osim što inhibiraju aktivnost Hsp90 sprječavanjem vezanja ATP-a dodatno i onemogućuju interakciju Hsp90 s njegovim ko-šaperonom Cdc37, što ih čini još boljim kandidatima za antitumorsku terapiju temeljenu na Hsp90 inhibitorima.



Slika 1.4. *Kemijske strukture 17-AAG (a), celastrola (b) i kurkumina (c). Preuzeto i prilagođeno od Sigma-Aldrich (2013).*

1.2.4. Inhibicija Hsp70 kao antitumorska terapija

Glavni inducibilni članovi porodice HSP70, Hsp70-1 i Hsp70-2, prisutni su u velikim količinama u tumorskim stanicama i tkivima, dok je njihova ekspresija pri bazalnim razinama u zdravim stanicama i tkivima vrlo niska. Pretpostavlja se da si tumorske stanice genetičkim promjenama osiguravaju neprestanu i visoku ekspresiju Hsp70 koji im onda šaperonskom aktivnošću pomaže u odolijevanju od posljedica različitih oštećenja koja se mogu pojaviti tijekom tumorogeneze i izazivati smrt stanice te prestanak rasta tumora.

Najraniji pristupi inhibiranja Hsp70 bili su usmjereni k sprječavanju njegove ekspresije preko HSF1, transkripcijskog faktora odgovornog za transkripciju *hsp* gena. Pokazano je primjerice da bioflavonoid kvercetin inhibira aktivnost Hsp70 upravo inhibicijom aktivnosti HSF1 (Hosokawa i sur., 1992). Novija istraživanja usmjerila su se na mogućnost inhibicije samog Hsp70 te se inhibitori Hsp70 danas mogu podijeliti u tri skupine:

1) oni koji se ciljno vežu na C-terminalnu domenu koja veže peptid
2) oni koji se ciljno vežu na N-terminalnu domenu koja veže ATP
3) oni koji se ciljno vežu na ko-šaperone Hsp70

Među inhibitorima iz prve skupine najzanimljvijim se pokazao 2-feniletinsulfonamid (PES), nazvan pifitrin-l. PES narušava interakcije između Hsp70 i njegovih ko-šaperona, primjerice Hsp40, odnosno proteina poput Apaf-1 i p53 što dovodi do nakupljanja destabiliziranih proteina, destabilizacije membrane lizosoma i konačno do stanične smrti neovisne o kaspazama. Dodatno, intraperitonealni unos PES-a spriječio je razvoj tumora u *in vivo* modelima limfoma u miševa (Leu i sur., 2009).

Prvi inhibitor Hsp70 iz druge skupine, prirodni imunosupresiv 15-deoksispergualin, 15-DSG identificiran je 1994. godine. Od tada je pretraživanjem kemijskih entiteta na svojstvo inhibicije ATP-azne aktivnosti Hsp70 identificiran niz molekula s tim svojstvom: dihidropirimidin NSC 630668, MAL3-101, spoj izveden iz adenozina, VER-155008, zatim azur C, miricitin, apoptozol, sfingolipidi i dr. Pokazano je također da brojne molekule identificirane kao spojevi za inhibiciju ATP-azne aktivnosti Hsp70 također imaju i sposobnost narušavanja interakcija Hsp70 s njegovim ko-šaperonima (skupina 3). MAL3-101, spoj je koji inhibira Hsp40 u vezanju za Hsp70, dok je za neke pirimidotriazindione pokazano da narušavaju stabilnost Hop kompleksa (Goloudina i sur., 2012).

Uz spojeve inhibitore proteinske aktivnosti Hsp70, tijekom proteklog desetljeća pojavila se i nova skupina inhibitora Hsp70 koji djelovanje temelje na utišavanju genske ekspresije mehanizmom RNA interferencije. Nylandstedt i suradnici (Nylandsted i sur., 2000) adenoviralnim unosom Hsp70 sljedno-specifičnog cDNA fragmenata uspjeli su spriječiti transkripciju *hsp70* i nastanak Hsp70 te time promovirati staničnu smrt u nekoliko staničnih linija tumora dojke: MCF-7, MDA-MB-468, SK-BR-3 i BT-549. Ista grupa istraživača pokazala je učinkovitost ovakvog postupka na *in vivo* modelima tumora mozga, dojke i debelog crijeva u miševa (Nylandsted i sur., 2002). Nadalje, pokazano je da utišavanje *hsp70* pomoću sljedno-specifičnih malih interferirajućih RNA (siRNA, od *engl*. small interfering RNA) dovodi do zaustavljanja proliferacije u G1 kontrolnoj točki ciklusa u stanicama tumora cerviksa, HeLa, tumora dojke, MCF-7, tumora jetre, HuH-7 i tumora prostate, PC-3 (Rohde i sur., 2005). Rezultati navedenih istraživanja upućuju na veliki potencijal RNA interferencije kao novog pristupa u smanjenju ekspresije *hsp70* gena, a time i aktivnosti Hsp70 te predstavljaju novu generaciju potencijalnih antitumorskih lijekova temeljenih na inhibiciji Hsp70.

1.2.5. Izvanstanični Hsp70 i njihova uloga u tumorogenezi

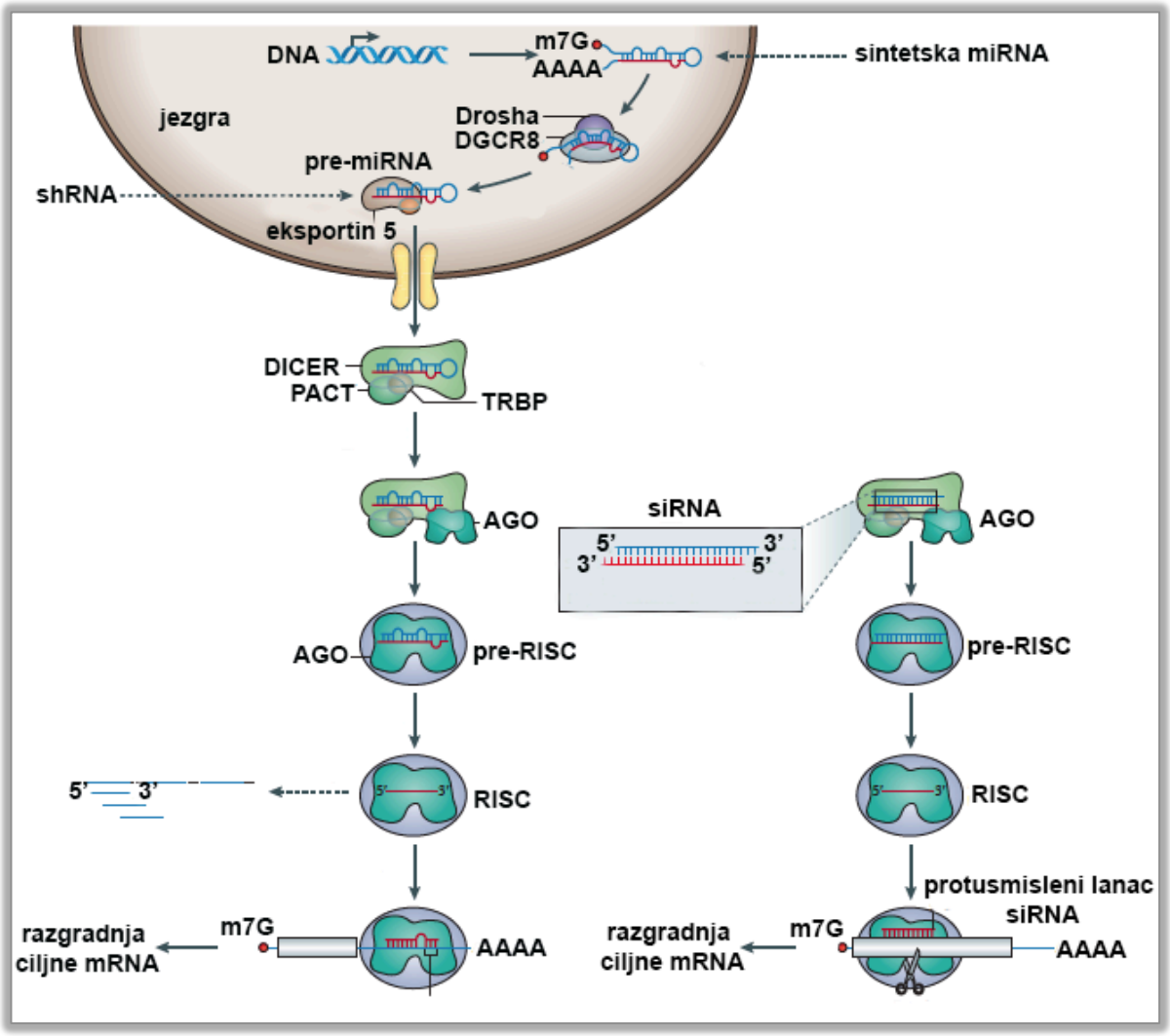
Kod razmatranja inhibicije Hsp70 kao mogućeg pristupa u liječenju tumora potrebno je obratiti pozornost na činjenicu da Hsp70 nisu prisutni samo unutar stanice nego i izvanstanično te da imaju važnu ulogu u odgovoru organizma na tumore. Kako u zdravim tako i u tumorskim stanicama, Hsp70 unutarstanično vežu peptidne antigene i prenose ih na vanjsku stranu stanica. Na vanjskoj površini stanica na taj način nastaju proteinski kompleksi koji prezentiraju antigen. Te komplekse mogu prepoznati CD8+ T stanice, stanice ubojice, koje potencijalno mogu uništiti tumorsku stanicu. Očito je stoga da i u tumorskim stanicama postoji svojevrsna homeostaza, odnosno stroga kontrola između dovoljno velikih količina Hsp70 koje moraju biti eksprimirane da bi tumorska stanica preživjela stresne pojave tijekom tumorogeneze, ali da pri tom iste te količine moraju biti dovoljno niske kako Hsp70 ne bi prezentiranjem antigena na vanjskoj strani stanične membrane omogućio prepoznavanje tumorskih stanica od strane CD8+ T stanica, odnosno prouzročio imunosnu reakciju (Goloudina i sur., 2012).

1.3. RNA INTERFERENCIJA

1.3.1. Mehanizam i uloga RNA interferencije

RNA interferencija (RNAi) uočena je prvi put u biljkama u kasnim 1980.-tim godinama, ali njen mehanizam potpuno je objašnjen tek u kasnim 1990.-tima kada je pokazano da je RNAi prisutna u vrsti *Caenorhabditis elegans* i da se radi o mehanizmu utišavanja gena evolucijski konzerviranom od biljaka do ljudi (Fire i sur., 1998). Danas je poznato da je RNAi uključena u normalan stanični mehanizam obrane protiv virusa i u premještanje transpozona u genomu.

Razvoj lijekova temeljenih na RNAi počeo je nakon brojnih istraživanja koja su dovela do potpunog razumijevanja mehanizma nastanaka i nestanka malih RNA u stanici. Endogeno su u eukariotskim stanicama prisutne mikro RNA (miRNA, od *engl.* micro RNAs) koje posreduju post-transkripcijsko utišavanje miRNA gena, a nastaju iz endogenih transkripata djelovanjem RNA polimeraze II. Najprije nastaju primarne miRNA (pri-miRNA, od *engl.* primary miRNAs) sačinjene od 80-tak nukleotida komplementarno sparenih u omčastu strukturu s nekoliko nesparenih nukleotida u sredini i na krajevima strukture. Pri-miRNA nakon nastanka bivaju prepoznate od kompleksa proteina kojeg sačinjavaju proteini DGCR8 (od *engl*. DiGeorge syndrome critical region 8) i Drosha (enzim RNaza III, klase 2), a koji omogućuje nastanak pre-miRNA. Pre-miRNA se zbog nesparenih nukleotida na 3' kraju mogu vezati s proteinom eksportinom 5, koji im omogućuje transport iz jezgre u citoplazmu. U citoplazmi kompleks proteina sačinjen od proteina Dicer (endoribonukleaza RNaza III porodice), TRBP (od *engl*. TAR RNA-binding protein) i PACT omogućava nastanak zrelih miRNA. Dvolančane miRNA, sada znatno kraće od pri-miRNA, dalje bivaju preuzete od kompleksa proteina RISC (od *engl*. RNA induced silencing complex), koji razdvaja lance miRNA helikaznom aktivnošću. Protusmisleni lanac miRNA veže se na ciljni transkript, glasničku RNA (mRNA, od *engl*. messenger RNA) pomoću proteina AGO (od *engl*. Argonaute) i izaziva njenu razgradnju. siRNA egzogeno unsene u citoplazmu stanice mogu poput zrelih miRNA aktivnošću kompleksa proteina RISC biti vođene do ciljnog transkripta. U konačnici to dovodi do komplementarnog sparivanja egzogene siRNA sa ciljnim transkriptom, razgradnje ciljnog transkripta te utišavanja ciljnog gena (*slika 1.5*.; Davidson i McCray, 2011).



Slika 1.5. *Nastanak i procesiranje miRNA i siRNA u stanicama sisavaca. Preuzeto i prilagođeno iz Davidson i McCray, 2011.*

1.3.2. Viralni i neviralni vektori za unos siRNA u stanice

Mehanizam RNA interferencije u organizmu može biti potaknut i egzogenim unosom molekula poput shRNA (od *engl*. small hairpin RNA), miRNA ili umjetno sintetiziranih siRNA. Mogućnost utišavanja gena ovim molekulama može se iskorisiti za dizajniranje novih lijekova usmjerenih k liječenju brojnih bolesti kojima je podloga genetska promjena. Međutim, glavno ograničenje primjeni RNAi u terapeutske svrhe jest prvenstveno brza razgradnja RNA molekula u krvnoj plazmi, ali i nemogućnost prodiranja ovih molekula kroz stanične membrane zbog hidrofilnosti i polarnosti koja je posljedica jakog negativnog naboja fosfatnih skupina. U svrhu iskorištavanja RNAi u terapeutske svrhe tijekom proteklog desetljeća brojna istraživanja usmjerila su se k osmišljavanju načina dostave siRNA u stanice koja bi ovim molekulama osigurala zaštitu od razgradnje, specifično usmjeravanje k ciljnim stanicama, učinkovit unos u stanice, otpuštanje iz endosoma/lizosoma u citosol i konačno uključivanje u endogeni RNAi mehanizam te utišavanje ciljnih gena.

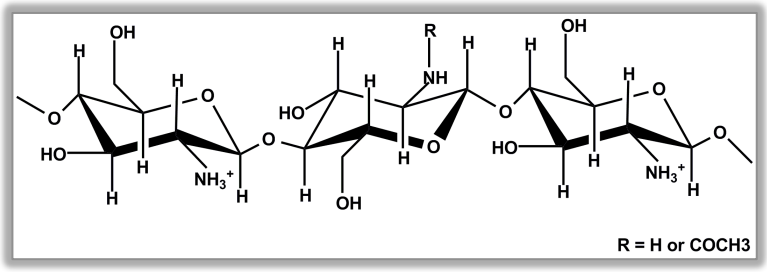
Pokazano je da se ekspresija egzogenih shRNA ili miRNA u stanicama može postići njihovom ugradnjom u viruse, poput lentivirusa, adenovirusa, adeno-asociranih virusa i herpesvirusa, koji mogu biti unešeni u ciljnu stanicu i svoju genetičku informaciju ugraditi u genomsku DNA stanice domaćina. Time se sljedovi koje ovi vektori sadrže, u ovom slučaju predsljedovi shRNA ili miRNA, mogu prepisivati u funkcionalne transkripte uobičajenim staničnim mehanizmima uključenim u ekspresiju gena. Nakon transkripcije, nastale miRNA ugrađuju se u kompleks proteina Drosha-DGCR8 i prenose u citoplazmu gdje se staničnim mehanizmom RNA interferencije omogućava utišavanje gena. shRNA dizajnirane su tako da oponašaju omčastom strukturom miRNA te se zbog toga u stanici procesiraju na isti način kao i endogene miRNA (Davidson i McCray, 2011).

Dizajniran je također i veliki broj neviralnih vektorskih sustava za unos siRNA dugih od 19 do 25 nukleotida poput lipidnih, polimernih te sustava temeljenih na upotrebi peptida i proteina. Lipidni sustavi mogu se pripremiti od lipida kationskih svojstava, PEG-lipida ili neutralnih lipida, poput kationskih ili neutralnih liposoma, nazvanih lipopleksi. Oni su veličine oko 100 nm što im olakšava prijenos u stanice. U stanicama se ovi sustavi procesiraju u endosomima, a oslobođene prethodno uklopljene siRNA uključuju se zatim u endogeni mehanizma RNAi. Nadalje, polimerni sustavi mogu se svrstati u dvije podskupine; podskupina polimernih sustava pripremljenih iz prirodnih polimera poput kitozana i atelokolagena i podskupina polimernih sustava pripremljenih iz sintetskih polimera poput PEI (od *engl*. polyethyleneimine) ili dendrimera.

Neviralni vektori općenito moraju zadovoljiti nekoliko preduvjeta kako bi mogli biti upotrijebljeni za dostavu siRNA *in vivo*. Kako siRNA nakon apliciranja u organizam mogu biti brzo razgrađene u serumu, bitno je da su uklopljene u sustav koji ih štiti sve do isporuke u ciljne stanice. Stabilnost sustava i ne-/mogućnost razgradnje aktivnošću serumskih proteina, svojstvo je koje prvenstveno ovisi o naboju i veličini sustava i glavni je preduvjet za zaštitu uklopljene siRNA. Kada sustav konačno dopremi siRNA do ciljne stanice, bitno je, također, da sustav može biti unešen u stanice endocitozom, što se također postiže kontrolom veličine sustava (David i sur., 2010).

1.3.3. Kitozanske nanočestice kao vektori za unos siRNA

Kitozan je kationski polimer izoliran iz hitina, građevnog elementa vanjskog skeleta *Crustacea* i jedan od najzastupljenijih polimera. Građen je od alternirajućih podjedinica D-glukozamina i N-acetil-D-glukozamina povezanih β-1,4-glikozidnim vezama (*slika 1.6.*) te za razliku od mnogih drugih polikationskih polimera, pokazuje izvrsnu biokompatibilnost, biorazgradivost te nisku toksičnost (Rao i Sharma, 1997).



Slika 1.6. *Kemijska struktura kitozana.*

Kitozan je slaba baza, s pKa vrijednošću amino skupina deacetiliranih podjedinica od oko 6,5 te je stoga topljiv u kiselom mediju poput octene kiseline, limunske kiseline, i brojnih drugih kiselina, a netopljiv u alkalnom mediju. Topljivost kitozana, osim toga, ovisi i o stupnju deacetilacije ove molekule, molekulskoj masi te ionskoj jakosti otopine u kojoj se nalazi. Potencijal kitozana kao vektora za dostavu siRNA u stanice temelji se na njegovim kationskim svojstvima. Kako naboj molekule kitozana jako ovisi o pH medija u kojem se nalazi, pri vrijednostima pH nižim od 6,5 molekula je protonirana. Protonirani amini u ovim uvjetima omogućuju kitozanu da elektrostatskim interakcijama veže polianinoske molekule poput DNA ili siRNA. Ove interakcije dovode do spontanog nastajanja polipleksa nano veličina, tzv. nanokompleksa. Nastali nanokompleksi, pripremljeni u odgovarajućem N:P

omjeru (omjeru koji odgovora količini naboja kojeg nose amino skupine kitozana prema naboju kojeg nose fosfatne skupine nukleinske kiseline), obično su veličina koje promoviraju ulazak nanokompleksa u stanice endocitozom te lizosomalno oslobađanje siRNA u citoplazmu.

Osim N:P omjera, molekulska masa kitozana iskorištenog za pripremu nanokompleksa često se navodi kao ključni parametar koji određuje fizikalno kemijska svojstva kompleksa sa siRNA, poput veličine, zeta potencijala koji označava površinski naboj čestice, zatim morfologije i stabilnosti kitozan-siRNA kompleksa. Stabilnost je nužna kako bi se omogućila izvanstanična zaštita nanokompleksa u serumu tijekom sistemske administracije, međutim, stabilnost ne smije biti temeljena na prejakim interakcijama koje bi onemogućile disocijaciju siRNA nakon ulaska nanokompleksa u stanice (Mao i sur., 2010). U istraživanju utjecaja molekulske mase kitozana na veličinu pripremljenih nanokompleksa pokazano je da kitozani molekulske mase od prosječno 110 kDa stvaraju komplekse sa siRNA manjih hidrodinamičkih polumjera od onih stvorenih s kitozanima molekulske mase od prosječno 270 kDa (Katas i Alpar, 2006). Stupanj deacetilacije (DD), soli vezane na molekulu kitozana, pH sustava u kojem se nanokompleksi pripremaju kao i metode pripreme nanokompleksa, dodatni su čimbenici koji utječu na fizikalno-kemijska svojstva kitozanskih kompleksa sa siRNA.

1.4. SVRHA I CILJEVI RADA

Stresni proteini pripadaju skupini unutarstaničnih proteina koji su eksprimirani konstitutivno i kao odgovor na fizikalni odnosno biološki stres. U staničnom odgovoru na stres HSP-ovi imaju ulogu stabiliziranja proteina i peptida čime promoviraju preživljenje stanice. Hsp27 i Hsp70 inhibitori su različitih čimbenika apoptoze, dok je glavna uloga Hsp90 osiguravanje aktivnost čimbenika uključenih u proliferaciju stanica. Sposobnost stresnih proteina da zaustave proces programirane stanične smrti predstavlja bitan aspekt njihove povezanosti s malignom proliferacijom. Glavni cilj i svrha ovog istraživanja je procijeniti ulogu Hsp70 u zaštiti od programirane stanične smrti u tumorskim stanicama *in vitro*. U tu svrhu ekspresija Hsp70 u tumorskim stanicama bit će eksperimentalnim postupkom ili inducirana (toplinski stres) ili utišana (RNAi). U svrhu utišavanja ekspresije Hsp70 koristit će se tehnologija koja počiva na specifičnoj razgradnji ciljne mRNA pomoću kratke siRNA uklopljene u nanočestice. Sljedeći specifični cilj ovog istraživanja je dizajnirati nanočestice za dostavu Hsp70 sljedno-specifične siRNA uz upotrebu biokompatibilnog polimera kitozana za kojeg je pokazano da učinkovito veže negativno nabijene molekule siRNA. Ispitat će se fizikalna svojstva kitozanskih nanočestica, učinkovitost uklapanja siRNA i utišavanja Hsp70. Specifičnim utišavanjem Hsp70 procijenit će se utjecaj utišavanja ovog stresnog proteina na osiguravanje stanične vijabilnosti u tumorskim stanicama i učinkovitost siRNA nanoterapijskoga sustava *in vitro*.

Posljednji specifični cilj ovog istraživanja je ispitati antitumorsku učinkovitost istovremene inhibicije aktivnosti Hsp90 i utišavanja ekspresije Hsp70. Inhibicija aktivnosti Hsp90 postići će se pomoću celastrola, a utišavanje ekspresije Hsp70 pomoću dizajniranog kitozanskog sustava s uklopljenom siRNA. Uspješnost antitumorske terapije temeljene na inhibiciji Hsp70/Hsp90 biti će ispitana i na trodimenzionalnim modelima tumora.

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. MATERIJALI

2.1.1. Instrumenti i uređaji

U ovom istraživanju korišteni su sljedeći uređaji:

- centrifuga Biofuge Stratos Heraeus (*Kendro Laboratory Products*)
- centrifuga za mikrotitarske pločice (*Thermo Scientific*)
- čitač mikrotitarskih pločica, VICTOR^3, 1420 Multilabel Counter (*PerkinElmer*)
- invertni fluorescentni mikroskop (Leica DMI4000B) povezan s digitalnom kamerom, (Leica DFC350FX) (*Leica Microsystems*)
- suha kupelj, Termomixer comfort (*Eppendorf AG*)
- sustav za SDS-poliakrilamidnu elektroforezu, Mini Protean II Cell (*BioRad*)
- sustav za western prijenos, Mini Trans-Blot Cell (*BioRad*)
- sustav za elektroforezu SEA 2000 (*Elchrom Scientific AG*)
- sustav za hlađenje MultiTemp III (*Amersham Biosciences*)
- sustav za slikanje gelova (*Uvitec*)
- spektrofotometar UV/Vis, CECIL 7200 (*Cecil instruments Limited*)
- uređaj za foton korelacijsku spektroskopiju, Zetasizer 3000 HS (*Malvern Instruments*)
- uređaj za snimanje ploča za uzgoj stanica, Operetta (*PerkinElmer*)
- uređaj za protočnu citometriju, Cytomics FC 500 MPL (Beckman Coulter)
- uređaj za razvijanje fotografskog filma (Kodak X-OMAT 2000A Processor)
- uređaj za kvantitativnu lančanu reakciju polimeraze u stvarnom vremenu, AB 7500 Real Time PCR System (*Applied Biosystems*)
- UV lampa (*Bioblock Scientific*)
- tresilica, Vibromix 313 EVT (*Tehtnica*)

2.1.2. Stanične linije

U ovom istraživanju korištene su sljedeće tumorske stanične linije:

- stanična linija izvedena iz humane akutne T stanične leukemije, Jurkat, American type culture collection (ATCC): TIB-152
- stanična linija izvedena iz humanog glioblastoma, U251N (priskrbljena ljubaznošću Dr. Josephine Nalbantoglu, Montreal Nuerological Institute)
- stanična linija izvedena iz humanog karcinoma dojke, MCF-7, ATCC: HTB-22
- stanična linija izvedena iz humanog hepatocelularnog karcinoma, HepG2, ATCC: HB-065
- stanična linija izvedena iz humanog adenokarcinoma pluća, A549, ATCC: CCL-185

2.1.3. Standardne kemikalije i puferi

U ovom istraživanju korištene su sljedeće standardne kemikalije:

- agaroza (*Invitrogen*)
- acetatna kiselina (*Sigma-Aldrich*)
- akrilamid/bisakrilamid, 30% (*Sigma-Aldrich*)
- albumin iz seruma goveda, BSA (od *engl.* bovine serum albumine) (*Sigma-Aldrich*)
- amonijev persulfat, APS (*Sigma-Aldrich*)
- β-merkaptoetanol (*Sigma-Aldrich*)
- bromfenolno plavilo (*Kemika*)
- DNA standard za elektroforezu, O'RangeRuler^{TM} 50bp DNA ladder (*Fermentas*)
- ditiotreitol, DTT (*Sigma-Aldrich*)
- etilen *di*-amin tetra octena kiselina, EDTA (*Sigma-Aldrich*)
- etilen glikol-bis (2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetra octena kiselina, EGTA (*Sigma-Aldrich*)
- etanol, EtOH (*Kemika*)
- etidijev bromid (*Roche*)
- fenil metan sulfonil fluorid, PMSF (*Sigma-Aldrich*)
- glicerol (*Kemika*)
- glicin (*Sigma-Aldrich*)
- HEPES, 4-(2-hidroksietil) piperazin-1-etansulfonična kiselina (*Sigma-Aldrich*)
- kalcijev klorid *di*-hidrat, $CaCl_2x2H_2O$ (*Sigma-Aldrich*)
- kalijev klorid, KCl (*Sigma-Aldrich*)

- kalijev *di*-hidrogen fosfat, KH_2PO_4 (*Sigma-Aldrich*)
- kloridna kiselina, HCl (*Sigma-Aldrich*)
- ksilen cijanol (*Sigma-Aldrich*)
- magnezijev klorid, $MgCl_2$ (*Sigma-Aldrich*)
- metanol (*Sigma-Aldrich*)
- natrijev acetat (*Sigma-Aldrich*)
- natrijev azid, NaN_3 (*Sigma-Aldrich*)
- natrijev klorid, NaCl (*Sigma-Aldrich*)
- natrijev fluorid, NaF (*Sigma-Aldrich*)
- *di*-natrijev hidrogen fosfat *hepta*-hidrat, $Na_2HPO_4x7H_2O$ (*Sigma-Aldrich*)
- natrijev dodecilsulfat, SDS (*Sigma-Aldrich*)
- natrijev ortovanadat, Na_3VO_4 (*Sigma-Aldrich*)
- *di*-metil sulfoksid, DMSO (*Sigma-Aldrich*)
- *p*-formaldehid, PFA (*Sigma-Aldrich*)
- proteinski standard za SDS-poliakrilamidnu elektroforezu, 10-170 kDa (*Bio Basic*)
- saharoza (*Invitrogen*)
- N,N,N',N'-tetrametil-etilen-*di*-amin, TEMED (*Sigma-Aldrich*)
- Tris, tris [hidroksimetil] aminometan hidroklorid, Tris-Hcl (*Sigma-Aldrich*)
- Triton X-100 (*Sigma-Aldrich*)
- Tween®20 (*Sigma-Aldrich*)

Tablica 2.1. *Popis standardnih pufera korištenih u istraživanju:*

Pufer	***Sastav***
Fosfatni pufer, PBS (od *engl*. phosphate buffer saline)	NaCl (137 mM), KCl (2,7 mM), KH_2PO_4 (4 mM), $Na_2HPO_4x7H_2O$ (4,3 mM)
TAE pufer za provođenje agarozne elektroforeze	Tris-HCl (0,04 M), Na-acetat (5 mM), EDTA (0,04 mM), pH 7,9
Pufer za nanošenje uzoraka na agarozni gel	saharoza (30%), bromfenolno plavilo (0,25%), ksilen cijanol (0,25%)
Pufer za liziranje stanica	Tris-HCl (50 mM; pH 8,0, podešen s 1N HCl), NaCl (137 mM), Tween 20 (1%), glicerol (10%), Na_3VO_4 (1 mM), NaF (1 mM), 1x tableta za inhibiciju aktivnosti proteaza (1x/25ml) (*Roche*)
Laemmlijev pufer za denaturaciju proteina	Tris-HCl (0,375 M; pH 6,8), SDS (12%), glicerol (3%), bromfenolno plavilo (0,2%), β-merkaptoetanol (12%)
Pufer za provođenje SDS-polikakrilamidne elektroforeze	Tris-Hcl (25 mM), glicin (0,2 M), SDS (1%)
Pufer za western prijenos proteina na nitroceluloznu membranu	Tris-Hcl (15,6 mM), glicin (120 mM), metanol (20%)
Pufer za ispiranje nitrocelulaznih membrana, TBS-T	Tris-HCl (20 mM), NaCl (150 mM), Tween®20 (0,05%), pH 7,6

Svi puferi pripremljeni se u ultra čistoj destiliranoj H_2O.

2.1.4. Kemikalije i kompleti kemikalija s posebnom namjenom

a) Kultura stanica:

- hranidbeni medij Gibco® DMEM (*Life Technologies*)
- hranidbeni medij Gibco® MEM (*Life Technologies*)
- hranidbeni medij Gibco® RPMI 1640 (*Life Technologies*)
- Gibco® goveđi fetalni serum, FBS (od *engl*. foetal bovine serum; *Life Technologies*)
- Gibco® tripsin-EDTA, 0,05% (*Life Technologies*)
- Gibco® penicilin-streptomicin, PS (*Life Technologies*)

b) Priprema nanočestica i transfekcija:

- kitozan glutamat, ultračisti, PROTASAN ULTRAPURE G113, <200 kDa, 75-90% DA (*Novamatrix*)
- natrijev tripolifosfat, TPP (*Sigma-Aldrich*)
- siRNA navedene u tablici 2.2. (*Life Technologies*)

Tablica 2.2. *Osnovne informacije o siRNA korištenima u istraživanju:*

Naziv proizvoda	***Kataloški broj (siRNA ID)***	***Ciljni gen (NCBI RefSeq)***	***Slijed nukleotida***
Silencer® Select siRNA	4392420 (s6966)	Hsp70 (Hsp70-1, Hsp72 ili HSPA1A) (NM_005345.5)	smisleni: 5'-CGG UUU CUA CAU GCA GAG Att-3' protusmisleni: 5'-UCU CUG CAU GUA GAA ACC Gga-3'
Silencer® negative control siRNA	AM4611	ne postoji	smisleni: 5'-NNU ACU GCU UAC GAU ACG GNN-3'
Silencer® siRNA -cy3	AM16211	Hsp70 (Hsp70-1, Hsp72 ili HSPA1A) (NM_005345.5)	smisleni: 5'-CGG UUU CUA CAU GCA GAG A-3' protusmisleni: 5'-UCU CUG CAU GUA GAA ACC G-3'

- reagens za transfekciju stanica sa siRNA, HiPerFect (*Qiagen*)
- reagens za transfekciju stanica sa siRNA, Lipofectamine 2000 (*Invitrogen*)

c) Induciranje stanične smrti:

- staurosporin iz *Streptomyces* sp. (*Sigma-Aldrich*)
- celastrol, 3-hidroksi-9β,13α- dimetil-2-okso-24,25,26-trinorolean-1(10),3,5,7-tetraen-29-ska kiselina (*Cayman Chemical*)
- 17-AAG, 17-alilamino geldanamicin (*Sigma-Aldrich*)
- kurkumin, iz biljke *Curcuma longa*, (E,E)-1,7-bis (4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion (*Sigma-Aldrich*)

d) Određivanje stanične vijabilnosti:

- tripansko plavilo, Trypan Blue (*Life Technologies*)
- Hoechst 33342 boja (*Invitrogen*)
- MTT, 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan (*Sigma-Aldrich*)
- ELISA komplet za kolorimetrijsko određivanje stanične proliferacije na temelju ugradnje bromodeoksiuridina (*Roche*)

e) Određivanje oblika stanične smrti:

- aneksin V obilježen bojom AlexaFluor 488 (*Invitrogen*)
- propidij jodid, PI (*Sigma-Aldrich*)
- ELISA komplet za fotometrijsko određivanje fragmentacije DNA (*Roche*)
- komplet za kolorimetrijsko određivanje katalitičke aktivnosti kaspaze 3 (*Sigma-Aldrich*)

f) Određivanje genske ekspresije:

- komplet za izolaciju RNA, Ambion® RNAqueous®-4PCR Kit (*Life Technologies*)
- komplet za reverznu transkripciju RNA u cDNA, High Capacity RNA-to-cDNA kit (*Applied Biosystems*)
- smjesa početnica za HSPA1A/HSPA1B, obilježene FAM-om, TaqMan genotyping Assay, Assay ID: Hs00359147_s1; FAM-5'-GGC CTA CTT CAA CGA CTC GCA GCG C-3' (*Applied Biosystems*)
- smjesa početnica za GAPDH, obilježene FAM-om, TaqMan genotyping Assay, Assay ID: Hs99999905_m1; FAM-5'-GGG CGC CTG GTC ACC AGG GCT GCT T-3' (*Applied Biosystems*)
- smjesa enzima i nukleotida u puferu, TaqMan Gene Expression Master Mix (*Applied Biosystems*)

g) Western analiza:

- komplet za određivanje koncentracije proteina, BCA protein Assay kit (BCA reagens A: natrijev karbonat, natrijev bikarbonat, bikinkonična kiselina, *eg*. BCA, natrijev tartarat; BCA reagens B: bakreni sulfat, 4%; *Thermo Scientific*)
- primarna protutijela:
  mišje protutijelo za aktin (*Milipore*, MAB1501R),
  zečje protutijelo za Hsp70/72 (*StressGen*, SPA-812),
  mišje protutijelo za citokrom c (*Santa Cruz Biotechnology*, sc-13560)
- sekundarna protutijela:
  ovčje protutijelo za mišji imunoglobulin (IgG), obilježeno peroksidazom iz hrena (HRP, od *engl.* horseradish peroxidase; *GE Healthcare*, NA931V),
  magareće protutijelo za zečji IgG, obilježeno s HRP (*GE Healthcare*, NA934).
- reagens za detekciju kemiluminiscencije, Luminata Classico HRP Substrate (*Milipore*)

h) Kolorimetrijsko određivanje proteinske ekspresije inducibilnog oblika Hsp70:

- ELISA komplet za kolorimetrijsko određivanje ekspresije inducibilnog oblika Hsp70 (*Enzo Life Sciences*)

i) Imunocitokemija:

- kolagen iz repa štakora (*Sigma-Aldrich*)
- kozji serum (*Sigma-Aldrich*)
- primarno protutijelo: zečje protutijelo za Hsp70/72 (*StressGen*, SPA-812)
- sekundarno protutijelo obilježeno AlexaFluor488-om, α-rabbit (*Invitrogen*)
- otopina za očuvanje fluorescentnog signala, Vectashield (*Vector labs*)

2.2. METODE

2.2.1. Kultura stanica

Stanice su kultivirane u sterilnom prostoru inkubatora pri temperaturi od 37°C, u struji zraka opskrbljenoj s 5% CO_2 i vlažnosti od 95%. Kao hranidbeni medij za uzgoj staničnih linija Jurkat, A549 i MCF-7 korišten je Gibco® RPMI 1640, za uzgoj stanične linije U251N Gibco® DMEM, a za uzgoj stanične linije HepG2 Gibco® MEM. Sve tri vrste medija bile su obogaćene L-glutaminom (2 mM), FBS-om (10%), penicilinom (100 U/mL) i streptomicinom (100 μg/mL). Tijekom uzgoja stanica, hranidbeni medij zamijenjen je svježim svaka 3 dana, uz ispiranje stanica u PBS-u. Stanice staničnih linija U251N, MCF-7, HepG2 i A549 pri tome su odvojene od podloge djelovanjem otopine tripsin-EDTA (0,05%). 24 sata prije tretmana prikladan broj stanica nasađen je na ploče za uzgoj s 6, 24 ili 96 jažica, ovisno o metodi koja je korištena nakon tretmana, kako bi se postigla konfluentnost od 70% na dan tretmana.

Dodatno, uz uzgoj stanica u jednom adherirajućem sloju, iz U251N stanica pripremljeni su tumorski sferoidi. Pripremljena je 2% otopina agaroze (u DMEM mediju bez FBS-a), autoklaviranjem tijekom 20 minuta na 120°C. Odmah po vađenju iz uređaja za autoklaviranje, 75 μL otopine naneseno je u svaku jažicu ploče s 96 mjesta. Korištene su ploče s ravnim dnom, u kojima je otopina agaroze tijekom hlađenja u narednih 30 minuta formirala želatinozni sloj s konkavnim udubljenjem (Friedrich i sur., 2009). Ploče obložene agaroznim gelom korištene su potom za pripremu tumorskih sferoida od U251N stanica, po uzoru na "liquid overlay technique" (Carlsson i Yuhas, 1984). 200 μL DMEM medija (obogaćenog 10% FBS-om i 1% PS-om) s $5x10^3$ stanica naneseno je u svaku od jažica ploče. Ploča je zatim ostavljena na uređaju za laganu vrtnju na sobnoj temperaturi tijekom 5 minuta, nakon čega je premještena u inkubator (37°C, 5% CO_2 i vlažnosti od 95%). Nakon 2 dana, 50% medija u jažicama zamijenjeno je svježim medijem. U251N sferoidi tretirani su četvrti dan rasta u kulturi i to 4 sferoida po tretmanu te su korišteni isključivo sferoidi odgovarajućeg oblika.

2.2.2. Priprema i karakterizacija kitozanskih nanočestica

a) Priprema kitozanskih nanočestica

Kitozan-TPP nanočestice s uklopljenom siRNA (K-TPP-siRNA) pripremljene su prema modificiranoj metodi ionotropnog geliranja kitozana TPP-om (Katas i Alpar, 2006). Za pripremu nanočestica, 15 µl siRNA (1,33 µg/µl, *eg*. 100 µM; u destiliranoj H_2O) dodano je u 200 µl otopine TPP (0,84 mg/ml; u destiliranoj H_2O; sterilno profiltrirana). Nanočestice su pripravljene ukapavanjem smjese otopina siRNA i TPP-a u otopinu kitozana (2 mg/mL; u 0,1 M acetatnom puferu, pH 4,5) uz miješanje na magnetskoj miješalici. Do korištenja za transfekciju pripravljene nanočestice ostavljene su na sobnoj temperaturi narednih 30 minuta.

b) Određivanje fizikalnih svojstava kitozanskih nanočestica: veličina, indeks polidisperznosti i zeta potencijal

Prosječna veličina (hidrodinamički promjer) i indeks polidisperznosti (PDI, od *engl*. polydispersity index) K-TPP i K-TPP-siRNA nanočestica određena je foton korelacijskom spektroskopijom (PCS, od *engl*. photon correlation spectroscopy). U mjernim sustavima korišten je monokromatski koherentni 10 mW He-Ne laser (λ = 633 nm), a kut detekcije raspršene svjetlosti bio je 90°. Mjerenja su provedena pri 25°C. Hidrodinamički promjer nanočestica izračuna se iz autokorelacijske funkcije intenziteta svjetlosti raspršene na česticama, uz pretpostavku sferičnog oblika nanočestica. Zeta-potencijal nanočestica određen je putem laserske Doppler anemometrije, upotrebom istog uređaja. Za mjerenje, 500 µl uzorka K-TPP-siRNA ili K-TPP nanočestica razrijeđeno je otopinom NaCl (1,5 mL, 10 mM, u destiliranoj H_2O) i injektirano u elektroforetsku cjevčicu u kojoj je uspostavljen potencijal od 150 mV. Mjerenja su provedena pri 25°C.

c) Određivanje učinkovitosti uklapanja siRNA u kitozanske nanočestice

Učinkovitost uklapanja siRNA u K-TPP nanočestice izračunata je određivanjem apsorbancije (pri 260 nm) slobodne siRNA preostale u nadsloju nakon centrifugiranja otopine K-TPP-siRNA nanočestica pri 13 000 g tijekom 15 minuta. Nadsloj dobiven centrifugiranjem K-TPP nanočestica bez uklopljene siRNA korišten je kao slijepa proba mjerenja. Učinkovitost uklapanja izračunata je prema sljedećoj formuli:

$$Učinkovitost\ uklapanja\ (\%) = (c1 - \frac{c2}{c1}) \times 100$$

c1 – koncentracija siRNA upotrijebljene za pripremu nanočestica (μg/mL)

c2 – koncentracija siRNA u nadsloju (μg/mL) izračunata po formuli A_{260nm} * 44,19 * R

A_{260nm} – apsorbancija siRNA mjerena na valnoj duljini od 260 nm

44,19 – apsorbancija 1,0 odgovara koncentraciji dvolančane RNA od 44,19 μg/mL

R – razrjeđenje uzorka prilikom mjerenja apsorbancije

Učinkovitost vezanja siRNA u K-TPP nanočestice određena je dodatno i elektroforezom na agaroznom gelu. Agarozni gel pripremljen je otapanjem 4 g agaroze uz zagrijavanje u 100 mL TAE pufera. Nakon što se agaroza otopila i ohladila na oko 60°C u otopinu je dodano 5 μL etidijevog bromida (0,5 μg/mL). 10 μL svakog od uzoraka pomiješano je s 2 μL pufera za nanošenje uzorka na agarozni gel i naneseno na agarozni gel. Elektroforetsko razdvajanje odvijalo se u TAE puferu, tijekom 60 minuta, uz napon od 55 V i temperaturu od 15 °C. Vizualizacija siRNA nakon provedene elektroforeze provedena je pomoću UV lampe, a slike su snimljene sustavom za slikanje gelova.

U svrhu određivanja stabilnosti siRNA uklopljene u K-TPP nanočestice u serumu jednaki volumeni nanočestica pomiješani su s jednakim volumenima hranidbenog medija koji je sadržavao različite koncentracije FBS-a (0, 10 i 50%). Smjesa je inkubirana na 37°C tijekom 30 minuta, 1, 2, 6 ili 24 sata prije provođenja elektoroforeze na agaroznom gelu na način kako je opisano u prethodnom odijeljku.

2.2.3. Transfekcija stanica i utišavanje Hsp70

Za transfekciju stanice su inkubirane s K-TPP-Hsp70 siRNA nanočesticama u kompletnom hranidbenom mediju na 37°C u različitim vremenskim razdobljima. Stanice tretirane "praznim" K-TPP nanočesticama ili K-TPP nanočesticama s uklopljenom negativnom siRNA predstavljale su negativnu kontrolu tretmana. Transfekcija stanica K-TPP-siRNA ili K-TPP nanočesticama provedena je upotrebom različitih volumena otopina nanočestica koji su odgovarali određenoj koncentraciji uklopljene siRNA, a izračunati su na temelju učinkovitosti uklapanja siRNA u nanočestice. Transfekcija siRNA lipidnim sustavom za transfekciju HiPerFect ili lipofektamin 2000 korištena je za procjenu učinkovitosti transfekcije K-TPP-siRNA nanočesticama.

a) Određivanje učinkovitosti transfekcije pomoću kitozanskih nanočestica

Za određivanje učinkovitosti unosa siRNA pomoću kitozanskih nanočestica $1x10^4$ U251N stanica nasađeno je u 200 μL DMEM medija (obogaćenog 10% FBS-om i 1% PS-om) u svaku od jažica sterilne ploče za uzgoj s 96 mjesta i s crnom stijenkom. Transfekcija je provedena s kitozanskim nanočesticama koje su sadržavale uklopljenu Hsp70 siRNA obilježenu fluorescentnom bojom cy3. 20 minuta prije kraja tretmana u medij je dodano 10 μL boje Hoechst 33342 (0,2 mM) za obilježavanje jezgara. Nakon tretmana uklonjen je medij iz nadsloja, s kojim su uklonjene i nevijabilne stanice kao i suvišak siRNA obilježene cy3-om koji nije unešen u stanice. Vijabilne stanice koje su ostale adherirane na dnu jažica isprane su inkubiranjem u 200 μL PBS-a (pH 5,5; podešen 1M octenom kiselinom) tijekom 5 minuta u svrhu uklanjanja polimera kitozana i cy3 siRNA vezanih na vanjsku površinu stanične membrane. PBS iz prvog ispiranja zatim je uklonjen te je u jažice nanesen PBS uobičajenog pH (7,4). Analiza intenziteta signala za cy3 provedena je izravno iz ploča za uzgoj pomoću uređaja za snimanje ploča za uzgoj (Operetta, Perkin Elmer). Učinkovitost unosa siRNA u stanice izračunata je na osnovu omjera intenziteta signala za cy3 u pojedinoj jažici prema ukupnom broju stanica u istoj jažici, a izražena je kao intenzitet signala za cy3 po stanici. Broj stanica po jažici dobiven je na temelju obilježavanja jezgara Hoechst-om 33342.

2.2.4. Određivanje stanične vijabilnosti i proliferacije

a) Brojanje stanica nakon bojanja tripan plavilom

Tripansko plavilo je diazo boja koja ne prolazi kroz cjelovitu staničnu membranu. Žive, vijabilne stanice nakon izlaganja tripanskom plavilu nisu obojane, za razliku od mrtvih stanica u koje, zbog oštećenja stanične membrane, prodire boja te se one vide kao plavo obojane stanice.

Za brojanje stanica nakon bojanja tripanskim plavilom stanice su nasađene ($1x10^4$ U251N stanica/jažici ili $1x10^5$ Jurkat stanica/jažici) i tretirane u pločicama s 96 mjesta u 200 µl hranidbenog medija po jažici. Nakon tretmana, 80 µl stanične suspenzije iz svake jažice, pomiješano je s 20 µl tripanskog plavila. 10 µl smjese je zatim naneseno na Neubauerovu komoricu, zaštićeno pokrovnim stakalcem i promatrano pod svjetlosnim mikroskopom uz objektiv s povećanjem 20x. Stanična vijabilnost izračunata je prema sljedećoj formuli:

$$Stanična\ vijabilnost\ (\%) = \left(\frac{N1}{N2}\right) \times 100$$

N1 - broj neobojanih, odnosno živih stanica u tretiranom uzorku

N2 - broj neobojanih, odnosno živih stanica u negativnoj kontroli

b) Brojanje jezgara nakon bojanja bojom Hoechst 33342

Hoechst 33342 boja prodire kroz stanične membrane i specifično se veže za adenin-timin dinukleotidna ponavljanja u DNA. Ekscitacija ove boje postiže se na 325 nm, a emisija se vidi na 480 nm. Hoechst 33342 se koristi za obilježavanje jezgara, a često i za prepoznavanje apoptoze, jer se piknotične jezgre stanica u apoptozi lako razaznaju ukoliko su obilježene ovom bojom.

Za određivanje stanične vijabilnosti upotrebom boje Hoechst 33342 stanice su nasađene u sterilne ploče za uzgoj s 24 jažice. Nasađeno je $5x10^4$ U251N stanica/jažici, $1x10^5$ HepG2 stanica/jažici te $2x10^5$ MCF-7 stanica/jažici. Stanice su potom tretirane citotoksičnim poticajem i/ili transfekcijom pomoću kitozan-TPP-siRNA nanočestica. Nakon tretmana uklonjen je medij iz nadsloja, s kojim su uklonjene i nevijabilne stanice. Vijabilne stanice koje su ostale adherirane na dnu jažica isprane su inkubiranjem u 500 µL PBS-a u tri navrata po 5 minuta. Stanice su fiksirane otopinom PFA (400 µL; 4% u PBS-u) tijekom 10 minuta. Nakon fiksacije, stanice su ponovno isprane inkubiranjem u 500 µL PBS-a u tri navrata po 5 minuta, a zatim su inkubirane otopinom boje Hoechst 33342 (400 µL; 10 µM u PBS-u)

tijekom 10 minuta. Nakon bojanja, stanice su ponovno isprane inkubiranjem u 500 µL PBS-a u tri navrata po 5 minuta te je izvršena analiza pomoću mikroskopa. Mikroskopske slike dobivene su uz upotrebu fluorescentnog mikroskopa spojenog s digitalnom kamerom, te programa Leica Application Suite V4, a analizirane su pomoću programa Image J. Stanična vijabilnost izračunata je prema sljedećoj formuli:

$$Stanična\ vijabilnost\ (\%) = \left(\frac{N1}{N2}\right) \times 100$$

N1 - broj jezgara obojenih s Hoechst 33342 u tretiranom uzorku
N2 - broj jezgara obojenih s Hoechst 33342 u negativnoj kontroli

c) MTT test

MTT test je kolorimetrijska metoda koja se temelji na određivanju metaboličke aktivnosti stanica (Mosmann, 1983). U stanicama koje su vijabilne odnosno žive dolazi do redukcije blijedo žute tetrazolijeve soli (MTT) u plavo obojene kristale formazana djelovanjem staničnih dehidrogenaza. Primjenom DMSO otapaju se kristali formazana, a intenzitet obojenja određuje se spektrofotmetrijski na čitaču mikrotitarskih pločica pri valnoj duljini od 595 nm.

Za određivanje metaboličke aktivnosti stanice su nasađene u sterilne ploče za uzgoj s 24 jažice. Nasađeno je 100 000 Jurkat stanica/jažici, 50 000 A549 stanica/jažici, $5x10^4$ U251N stanica/jažici, $1x10^5$ HepG2 stanica/jažici te $2x10^5$ MCF-7 stanica/jažici. Stanice su potom tretirane citotoksičnim poticajem i/ili transfekcijom pomoću kitozan-TPP-siRNA nanočestica. Nakon tretmana uklonjen je medij iz nadsloja. Stanice su zatim inkubirane s 500 µL MTT otopine (0,5 mg/mL; u hranidbenom mediju). Nakon 60 minuta inkubacije na 37°C uklonjena je MTT otopina te je u jažice dodan jednak volumen DMSO kako bi se lizirale stanice i otopio formazan. Ploče su ostavljene na tresilici nekoliko minuta, a zatim je mjerena apsorbancija formazana pomoću čitača mikrotitarskih pločica pri 595 nm prema DMSO kao slijepoj probi. Netretirane stanice koje su rasle u kompletnom mediju tijekom tretmana predstavljale su negativnu kontrolu. Tretmani i mjerenja napravljeni su u triplikatu (n=9). Metabolička aktivnost izračunata je prema sljedećoj formuli:

$$Metabolička\ aktivnost\ (\%) = \left(\frac{Abs1}{Abs2}\right) \times 100$$

Abs1 – vrijednost apsorbancije na 595 nm u tretiranom uzorku
Abs2 – vrijednost apsorbancije na 595 nm u negativnoj kontroli

d) Obilježavanje tumorskih sferoida propidij jodidom i Hoechst-om 33342

Hoechst 33342 boja prodire kroz stanične membrane i specifično se veže za adenin-timin dinukleotidna ponavljanja u DNA. Propidij jodid (PI) ne prodire kroz staničnu membranu te je stoga pokazatelj stanične smrti kod koje je došlo do oštećenja stanične membrane, odnosno nekroze. Bojanje tumorskih sferoida Hoechst-om 33342 i PI-om provedeno je kako bi se izmjerila promjena vijabilnosti i integriteta tumorskih sferoida nakon tretmana.

Tumorski sferoidi pripremljeni su na način kako je to opisano u odijeljku 2.2.1. Nakon provedenih tretmana 50% medija (100 μL) u kojem je proveden tretman je uklonjeno i zamijenjeno s jednakim volumenom medija koji je sadržavao otopinu boje Hoechst 33342 (10 μM) i PI (1,5 μM). Tumorski sferoidi su zatim inkubirani 2 sata pri 37°C (95% vlažnosti i 5% CO_2). Neposredno prije analize pomoću fluorescentnog mikroskopa, 50% medija (100 μL) s bojama pažljivo je uklonjeno i zamijenjeno medijom bez boja. Mikroskopske slike dobivene su uz upotrebu fluorescentnog mikroskopa spojenog s digitalnom kamerom te programa Leica Application Suite V4, a analizirane su pomoću programa Image J u svrhu dobivanja brojčanih vrijednosti relativnih intenziteta fluorescencije PI i Hoechst 33342.

e) Kolorimetrijsko određivanje stanične proliferacije

Proliferacija stanica zahtijeva umnožavanje genomske DNA. Stoga, praćenje sinteze DNA može poslužiti kao pokazatelj stanične proliferacije, čak i onda kad umnožavanje DNA nije popraćeno diobom stanice. Za određivanje stanične proliferacije u ovom istraživanju korišten je ELISA komplet kemikalija za kemiluminiscentnu detekciju ugradnje bromodeoksiuridina (BrdU) u DNA tijekom njene sinteze.

Za određivanje stanične proliferacije $1x10^5$ Jurkat stanica u 200 μL RPMI medija (obogaćenog 10% FBS-om i 1% PS-om) nasađeno je u svaku od jažica sterilne ploče za uzgoj s 96 mjesta. Stanice su tretirane citotoksičnim poticajem i/ili s otopinom K-TPP-siRNA nanočestica. 12 sati prije završetka tretmana u svaku od jažica dodano je 20 μL reagensa za obilježavanje koji je sadržavao BrdU (100 μM) i ploča sa stanicama je inkubirana na 37°C te

5% CO_2 i vlažnosti od 95%, do kraja tretmana. Po završetku tretmana ploča je centrifugirana pri brzini od 300 g tijekom 10 minuta. Nakon centrifugiranja nadsloj je pažljivo odsisan aspiracijom, a na talog u svaku od jažica dodano je 200 µL reagensa za fiksiranje stanica te je ploča inkubirana na sobnoj temperaturi tijekom narednih 30 minuta. Reagens za fiksiranje je zatim pažljivo odstranjen, a u svaku jažicu dodano je 100 µL reagensa koji je sadržavao anti-BrdU-peroksidazu. Ploča je inkubirana na sobnoj temperaturi tijekom narednih 90 minuta. Reagens je zatim pažljivo odstranjen, a stanice su isprane puferom za ispiranje u tri navrata (300 µL po jažici). Pufer je svaki put odstranjen aspiracijom. Nakon zadnjeg ispiranja u jažice je dodano po 100 µL reagensa sa supstratom za peroksidazu i inkubirano na sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta ili do pojave blijedo plave boje. Apsorbancija je zatim mjerena na čitaču mikrotitarskih pločica pri valnoj duljini od 370 nm. Stanična proliferacija izračunata je prema sljedećoj formuli:

$$Stanična\ proliferacija\ (\%) = \left(\frac{Abs1}{Abs2}\right) \times 100$$

Abs1 – vrijednost apsorbancije na 370 nm u tretiranom uzorku

Abs2 – vrijednost apsorbancije na 370 nm u negativnoj kontroli

2.2.5. Određivanje oblika stanične smrti

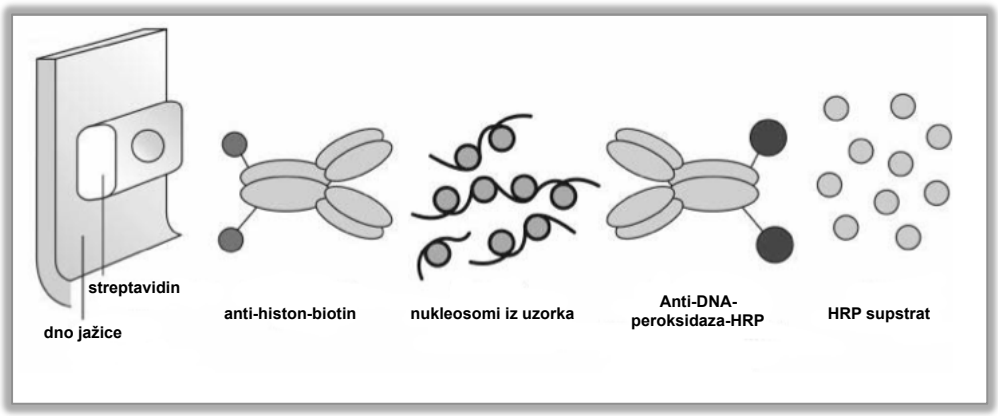
a) Protočna citometrija nakon obilježavanja aneksinom V i propidij jodidom

Tijekom apoptoze dolazi do translokacije fosfatidil serina s unutrašnje strane plazmatske membrane na vanjsku, čime fosfatidil serin biva ispoljen na vanjskoj površini stanice. Aneksin V je protein ovisan o Ca^{2+} s visokim afinitetom vezanja za fosfatidil serin pa se stoga koristi za detekciju ispoljavanja fosfatidil serina. Kako translokacija fosfatidil serina nije svojstvena isključivo za apoptozu, nego se događa i u nekrotičnoj vrsti stanične smrti, obilježavanje s aneksinom V se obično provodi u kombinaciji s bojom propidij jodid (PI). PI ne prodire kroz staničnu membranu te je stoga pokazatelj vrste stanične smrti kod koje je došlo do oštećenja stanične membrane, odnosno nekroze. Obilježavanjem stanica aneksinom V i PI-om mogu se razlikovati tri populacije: vijabilne stanice (aneksin V-/PI-), stanice u apoptozi (aneksin V+/PI-) i stanice u nekrozi (aneksin V+/PI+; Vermes i sur., 1995).

Za određivanje oblika stanične smrti $1x10^5$ Jurkat stanica u 500 µL RPMI medija (obogaćenog 10% FBS-om i 1% PS-om) nasađeno je u svaku od jažica sterilne ploče za uzgoj s 24 mjesta. Stanice su tretirane citotoksičnim poticajem i/ili otopinom K-TPP-siRNA nanočestica. Nakon završetka tretmana stanice su prebačene u epruvete za analizu na protočnom citometru i centrifugirane pri brzini 300 g tijekom 5 minuta. Nadsloj je odstranjen aspiracijom te je u svaku epruvetu dodano po 100 µL pufera za aneksin V (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM $CaCl_2x2H_2O$) koji je sadržavao 0,5 µL aneksina V i 1 µL otopine PI (1 µg/µL; u destiliranoj H_2O). Nakon 15 minuta inkubacije u tami i na sobnoj temperaturi, smjesa je korištena za analizu na uređaju za protočnu citometriju Cytomics FC 500 MPL (Beckman Coulter). Analiza mjerenja izvršena je pomoću programa FlowJo.

b) Fotometrijsko određivanje fragmentacije DNA

U kasnim stadijima apoptoze, djelovanjem staničnih endonukleaza dolazi do fragmentacije dvolančane genomske DNA u dijelovima lanca između nukleosoma pri čemu nastaju mono- i oligo-nukleosomalni DNA fragmenti bogati histonima. Udio fragmentacije DNA nakon tretmana može se odrediti izlaganjem staničnog lizata otopini protutijela specifičnog za histone. Za određivanje fragmentacije DNA u ovom istraživanju korišten je ELISA komplet kemikalija koji osim protutijela specifičnog za histone sadrži i protutijelo za dvolančanu molekulu DNA (*slika 2.1.*). Inkubacijom staničnog lizata u otopinama navedenih protutijela određuje se udio fragmentacije DNA u odnosu na netretirani uzorak. Određivanjem fragmentacije DNA u staničnom nadsloj odvojenom nakon tretmana određuje se udio nekroze.



Slika 2.1. *Shematski prikaz principa određivanja fragmentacije DNA. Preuzeto i prilagođeno iz Cell Death Detection ELISA^{PLUS}, Roche, 2008.*

Za određivanje fragmentacije DNA $1x10^4$ Jurkat stanica u 200 µL RPMI medija (obogaćenog 10% FBS-om i 1% PS-om) nasađeno je u svaku od jažica sterilne ploče za uzgoj s 96 mjesta. Nakon tretmana ploča je centrifugirana tijekom 10 minuta pri 200 g, nakon čega se u posebne epruvete odvojio nadsloj iz svake jažice, kako bi se mogla utvrditi moguća pojava nekroze tijekom tretmana. Na talog u svaku od jažica dodano je 200 µL pufera za liziranje stanica te je uslijedila inkubacija na sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta. Ploča je zatim centrifugirana tijekom 10 minuta pri 200 g. 20 µL staničnog lizata te 20 µL nadsloja za analizu nekroze (odvojenog nakon tretmana) naneseno je u ploče s 96 jažica obložene streptavidinom. U svaku od jažica dodano je po 80 µL reagensa za inkubaciju protutijela (18/20 volumena) obogaćenog protutijelom anti-DNA-peroksidaza (1/20 volumena) i protutijelom anti-histon-biotin (1/20 volumena). Ploča je inkubirana na sobnoj temperaturi tijekom 2 sata uz laganu trešnju. Reagens za inkubaciju protutijela je potom uklonjen, a jažice su isprane u tri navrata sa po 300 µL istog reagensa, ali bez protutijela. U svaku od jažica dodano je 100 µL reagensa sa supstratom za peroksidazu te je ploča inkubirana 20 minuta na sobnoj temperaturi uz laganu trešnju. U svaku od jažica dodano je na kraju 100 µL reagensa za blokiranje reakcije supstrata i peroksidaze te je izmjerena apsorbancija na 405 nm. Fragmentacija DNA izračunata je prema sljedećoj formuli:

$$Fragmentacija\ DNA\ = \frac{Abs1}{Abs2}$$

Abs1 – vrijednost apsorbancije na 405 nm u tretiranom uzorku

Abs2 – vrijednost apsorbancije na 405 nm u negativnoj kontroli

c) Kolorimetrijsko određivanje aktivnosti kaspaze 3

Aktivacija enzima kaspaze 3 igra ključnu ulogu u izvršnom dijelu apoptoze. U ovom istraživanju korišten je komplet kemikalija za kolorimetrijsko određivanje aktivnosti kaspaze 3 koje se temelji na detekciji signala p-nitroanilina (p-NA) na 405 nm. Do nastajanja p-nitroanilina u uzorku dolazi hidroliziranjem peptidnog supstrata acetil-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilida (Ac-DEVD-pNA) aktivnošću kaspaze 3.

Za određivanje aktivnosti kaspaze 3 $1x10^5$ Jurkat stanica u 200 µL RPMI medija (obogaćenog 10% FBS-om i 1% PS-om) nasađeno je u svaku od jažica sterilne ploče za uzgoj s 96 mjesta. Nakon tretmana stanice su prebačene u epruvete i centrifugirane tijekom 5 minuta pri 600 g, nakon čega je uklonjen nadsloj. Talog je ispran s 200 µL PBS-a i epruvete su ponovno centrifugirane. Talog u epruvetama je zatim inkubiran u 100 µL pufera za liziranje, na ledu, tijekom 20 minuta. Uslijedilo je centrifugiranje na 20 000 g pri temperaturi od 4°C tijekom 15 minuta. 5 µL staničnog lizata naneseno je u po dvije jažice pločice sa 96 mjesta. U jednu od jažica dodan je inhibitor kaspaze 3 (10 µL) i peptidni supstrat, Ac-DEVD-pNA (10 µL), a u drugu samo peptidni supstrat (10 µL). U jažice je nanesen pufer za reakciju do ukupnog volumena 100 µL. Nakon inkubacije od 90 minuta, na 37°C, izmjerena je apsorbancija na 405 nm. Aktivnost kaspaze 3 izračunata je na temelju apsorbancije standarda pripremljenog iz otopine p-nitroanilina (0,001, 0,002, 0,005, 0,01, 0,02 µmol/100 µL) po sljedećoj formuli:

$$Aktivnost\ kaspaze\ 3\ (\%)\ (\mu\text{mol pNA}/\frac{\text{min}}{\text{mL}}) = \frac{\mu\text{mol pNA} \times \text{d}}{t \times V}$$

V – volumen uzorka u mL

d – faktor razrjeđenja

t – vrijeme reakcije u minutama

2.2.6. Određivanje genske ekspresije

Izolacija RNA

Za izolaciju RNA stanice su nasađene u sterilne ploče za uzgoj sa 24 jažice ($1x10^5$ Jurkat stanica/jažici). Nakon tretmana stanice su centrifugirane pri 300 g tijekom 6 minuta. Na talog stanica dodano je 400 µL lizirajućeg pufera iz kompleta za izolaciju RNA i smjesa je dobro promiješana. Zatim je dodano 400 µL etanola (64%) i ponovno dobro promiješano na tresilici. Lizat je prenesen na kolonicu s filterom od staklenih niti te je uslijedilo centrifugiranje na 15 000 g tijekom 1 minute. Sloj ispod filtera je zatim odliven, a u kolonicu je naneseno 700 µL otopine za ispiranje te su epruvete ponovno centrifugirane na 15 000 g tijekom 1 minute. Postupak ispiranja ponovljen je još dva puta. Nakon toga, na filter je naneseno 100 µL otopine za eluciju RNA te se centrifugiranjem na 15 000 g tijekom 1 minute dobila RNA u epruveti. Onečišćenje uzorka RNA genomskom DNA onemogućeno je inkubacijom otopine RNA s otopinom DNaze (prema uputama proizvođača), enzima koji katalizira hidrolizu DNA. Učinkovitost uklanjanja genomske DNA određena je provođenjem elektroforeze na 1% agaroznom gelu u TAE puferu uz napon struje 80V tijekom 60 minuta. Na agarozni gel naneseno je po 10 µL uzorka DNazom tretirane, izolirane RNA pomiješane s 2 µL pufera za nanošenje uzorka na agaroznu elektroforezu. Koncentracija ukupne stanične RNA nakon uklanjanja genomske DNA određena je mjerenjem apsorbancije na 260 nm i izračunata prema sljedećoj formuli:

$$c(RNA)\ (\mu g/mL) = A260nm \times 44{,}19 \times R$$

A260nm – apsorbancija RNA mjerena na valnoj duljini od 260 nm

44,19 – apsorbancija 1,0 odgovara koncentraciji dvolančane RNA od 44,19 µg/mL

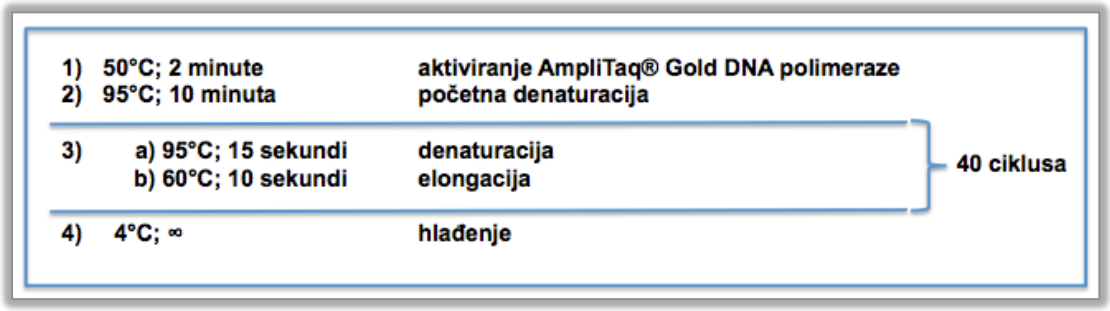
R – razrjeđenje uzorka RNA prilikom mjerenja

Reverzna transkripcija mRNA u cDNA

Reakcijska smjesa za prepisivanje glasničke RNA (mRNA, od *engl*. messenger RNA) iz uzorka ukupne stanične RNA sadržavala je 10 µL reakcijskog pufera (2x) i 1 µL otopine enzima reverzne transkriptaze (20x) iz kompleta za reverznu transkripciju. U smjesu je dodano 200 ng ukupne stanične RNA, te H_2O oslobođena od nukleaza do ukupnog volumena smjese od 20 µL. Reverzna transkripcija provedena je tijekom 60 minuta na 37°C, nakon čega je uslijedilo blokiranje enzima reverzne transkriptaze tijekom 5 minuta na 95°C te skladištenje cDNA na 4°C do upotrebe za lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu.

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Reakcijska smjesa za analizu genske ekspresije upotrebom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR, od *engl.* real-time polymerase chain reaction) sadržavala je 12,5 µL TaqMan reakcijske smjese (2x) sastavljene od AmpliTaq Gold® DNA polimeraze, deoksiribonukleotida i reakcijskog pufera, 1,25 µL smjese početnica za analizu ekspresije gena (navedene u popisu kemikalija) te 9,25 µL ultračiste H_2O oslobođene od nukleaza. RT-PCR proveden je u uređaju AB 7500 Real Time PCR System, prema programu prikazanom na slici 2.2.



Slika 2.2. *Program za RT-PCR.*

Nakon provedenog RT-PCR-a ekspresija gena Hsp70 određena je prema komparativnoj C_T metodi $2^{-\Delta\Delta C_T}$ upotrebom programa 7500 System SDS Software, a prema ekspresiji gena za gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH) kao endogenoj kontroli.

2.2.7. Određivanje ekspresije proteina

a) Western analiza

Priprema staničnog lizata

Za analizu ekspresije proteina stanice su nasađene u sterilne ploče za uzgoj s 6 jažica ($2x10^6$ Jurkat stanica/jažici, $5x10^5$ U251N stanica/jažici) i zatm tretirane citotoksičnim poticajem i/ili nanočesticama. Nakon tretmana u svaku jažicu dodano je 500 μL otopine tripsin-EDTA (0,05%) kako bi se stanice odvojile od podloge te su ploče inkubirane tijekom 3 minute na 37°C. U svaku jažicu zatim je dodano 1 mL prethodno ugrijanog hranidbenog medija kako bi se inhibiralo djelovanje tripsina te su stanice u takvom mediju prebačene u epruvete. Jurkat stanice nisu bile izložene djelovanju otopine tripsin-EDTA, nego su prebačene iz ploča za uzgoj izravno u epruvete za centrifugiranje. Uslijedilo je centrfiguiranje pri 500 g tijekom 5 minuta. Nadsloj s hranidbenim medijem potom je odstranjen aspiracijom. Nakon toga stanice su isprane u dva navrata s 1 mL hladnog PBS-a centrifugiranjem pri 500 g tijekom 5 minuta. Svaki put nadsloj je odstranjen aspiracijom te je talog korišten za daljnju izolaciju proteina. Na posljednji talog dodano je 100 μL hladnog (+4°C) pufera za liziranje stanica. Nakon 20 minuta inkubacije na ledu smjesa je centrifugirana u prethodno ohlađenom uređaju (+4°C) pri 10 000 g tijekom 10 minuta. 20 μL nadsloja odvojeno je za određivanje koncentracije proteina, a u 80 μL je dodano 16 μL Laemmlijevog pufera za denaturaciju proteina (6x). Uzorci su potom zagrijani na 95°C, tijekom 3 minute, ohlađeni na ledu i pohranjeni na –20°C do izvođenja SDS-poliakrilamidne elektroforeze.

Priprema frakcije citosola za određivanje citokroma c

U pripremi frakcije citosola za liziranje stanica korišten je S-100 pufer (250 mM saharoza, 20 mM HEPES, 10 mM KCl, 1,9 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 mM PMSF, 1 mM DTT). Nakon ispiranja stanica u PBS-u na stanični talog dodano je 100 μL hladnog (+4°C) S-100 pufera. Nakon 30 minuta inkubacije na ledu smjesa je centrifugirana u prethodno ohlađenom uređaju (+4°C) pri 20 000 g tijekom 15 minuta. 20 μL nadsloja odvojeno je za određivanje koncentracije proteina, a u 80 μL dodano je 16 μL Laemmlijevog pufera za denaturaciju proteina (6x). Uzorci su potom zagrijani na 95°C, tijekom 3 minute, ohlađeni na ledu i pohranjeni na –20°C do izvođenja SDS-poliakrilamidne elektroforeze i western analize.

Određivanje koncentracije proteina

Određivanje koncentracije proteina provedeno je uz upotrebu komercijalno dostupnog kompleta koji se temelji na redukciji Cu^{2+} u Cu^{1+} izazvanoj proteinima te kompleksiranju nastalog Cu^{1+} s dvije molekule bicinkonične kiseline (BCA, od *engl*. bicinchoninic acid) u ljubičasto obojeni produkt. Apsorbancija se mjeri na 562 nm i u izravnoj je vezi s koncentracijom proteina u uzorku.

Za određivanje koncentracije proteina najprije je pripremljen standard iz otopine BSA. Odvagano je 10 mg BSA i otopljeno u 1 mL pufera za liziranje stanica. Iz ove otopine pripremljena su razrjeđenja kako slijedi: 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,5 i 1 μg/μL. U pojedine jažice pločice s 96 mjesta naneseno je po 10 μL pufera za liziranje za 0 μg/μL BSA, zatim po 10 μL svakog od razrjeđenja BSA standarda te po 10 μL prethodno razrijeđenih uzoraka staničnog lizata (1:50; u puferu za liziranje). Zatim je pomiješano 50 mL BCA reagensa A s 1 mL BCA reagensa B te je po 200 μL ove smjese dodano u svaku od jažica. Pločica je zatim inkubirana tijekom 30 minuta na 37°C, nakon čega je određena apsorbancija na 562 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica. Koncentracija proteina određena je prema izmjerenoj apsorbanciji BSA standarda.

Izvođenje SDS-poliakrilamidne elektroforeze

Razdvajanje proteina tijekom elektroforeze u SDS-poliakrilamodnom gelu odvija se na temelju razlike u masi pri čemu je prijeđeni put pojedinog proteina u gelu obrnuto proporcionalan logaritmu njegove molekulske mase. Pri tome SDS, prisutan u Laemlijevom puferu za denaturaciju proteina, ali i u razdvajajućem i sabijajućem gelu, poništava endogeni naboj proteina, tako da se veže na proteine i daje im negativan naboj omogućavajući kretanje proteina prema anodi tijekom elektroforeze.

Za izvođenje SDS-poliakrilamidne elektroforeze najprije je pripremljena otopina za izradu gela za razdvajanje proteina (12%). U tu svrhu pomiješano je 3,35 mL destilirane H_2O, 2,5 mL Tris-HCl-a (1,5 M, pH 8,8), 100 μL SDS-a (10%), 4 mL akrilamid/bisakrilamida (30%), 50 μL APS-a (10%) i 5 μL TEMED-a (10%). Pripremljena otopina ulivena je između dva stakalca te nadslojena s etanolom (70%). Nakon 45 minuta pripremljena je otopina za izradu gela za sabijanje proteina (4%). U tu svrhu pomiješano je 6,01 mL destilirane H_2O, 2,5 mL Tris-HCl-a (0,5 M, pH 6,8), 100 μL SDS-a (10%), 1,3 mL akrilamid/bisakrilamida (30%), 50 μL APS-a (10%) i 10 μL TEMED-a (10%). Zatim je uklonjen etanol s gela za razdvajanje i nadomješten otopinom za izradu gela za sabijanje. Jažice za nanošenje uzorka proteina na gelu za sabijanje pripremljene su umetanjem plastičnih češljića u gel odmah

nakon njegovog ulijevanja između stakalaca. Stakalca s polimeriziranim gelovima za razdvajanje i sabijanje uronjena su u pufer za provođenje SDS-poliakrilamidne elektroforeze, u jažice su naneseni uzorci proteina (20 μg) te je u sustavu za elektroforezu omogućen protok struje napona 100 V tijekom 90 minuta.

Western prijenos proteina sa SDS-poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu

U svrhu prijenosa proteina poliakrilamidni gel je nakon provedene elektroforeze postavljen na nitrocelulznu membranu. Gel i nitrocelulozna membrana obloženi su filter papirima i spužvicama jednakih veličina te je "sendvič" smješten u sustav za prijenos pazeći pri tome na očekivani smjer kretanja proteina u sustavu. U sustav je uliven prethodno ohlađen pufer za prijenos (+4°C) te je umetnut led i magnet za miješanje tijekom prijenosa. Elektro-prijenos proteina s gela na membranu proveden je tijekom 60 minuta pri naponu struje od 100 V.

Određivanje ekspresije proteina

Nakon elektro-prijenosa proteina na membranu, membrana je isprana u odgovarajućem volumenu pufera TBS-T u 5 navrata po 5 minuta uz miješanje. Membrana je zatim smještena u odgovarajući volumen pufera za blokiranje nespecifičnog signala proteina (pufer TBS-T obogaćen 5% nemasnim mlijekom u prahu). Nakon 60 minuta uslijedila je inkubacija u otopini primarnog antitijela u odgovarajućoj koncentraciji (1:1000 za Hsp70/72, 1:500 za citokrom c, 1:1000 za aktin, u TBS-T-u) preko noći na +4°C, uz miješanje. Sljedeći dan membrana je isprana u 5 navrata po 5 minuta u puferu TBS-T na sobnoj temperaturi uz lagano miješanje te potom inkubirana u otopini sekundarnog protutijela tijekom 60 minuta na sobnoj temperaturi. Membrana je ponovno isprana u 5 navrata po 5 minuta u puferu TBS-T te potom inkubirana u 2 mL reagensa za detekciju kemiluminiscencije tijekom 3 minute. Nakon toga, višak reagensa je ocijeđen na filtar papir, a membrana je postavljena između plastičnih folija. Fotografski film za detekciju signala koji nastaje kao rezultat djelovanja HRP enzima vezanog na sekundarno protutijelo i supstrata za HRP iz reagensa za kemiluminiscenciju postavljen je uz membranu u kazeti u tamnoj komori. Nakon 10, 20 i 30 sekundi ili 1 i 2 minute izlaganja filma membrani, film je umetnut u aparat za detekciju signala. Intenzitet proteinskih pruga na filmu izmjeren je pomoću programa Image J.

b) Kolorimetrijsko određivanje ekspresije Hsp70

Određivanje ekspresije inducibilnog oblika Hsp70, provedeno je i upotrebom kompleta za kolorimetrijsko određivanje apsolutne koncentracije u staničnom lizatu.

Za kolorimetrijsko određivanje ekspresije Hsp70 $1x10^6$ Jurkat stanica u 2000 µL RPMI medija (obogaćenog 10% FBS-om i 1% PS-om) nasađeno je u svaku od jažica sterilne ploče za uzgoj s 6 mjesta. Nakon tretmana stanice su centrifugirane 10 minuta pri 200 g, na talog je dodano 1 mL reagensa za ekstrakciju (obogaćenog s inhibitorima proteaza) te je smjesa ostavljena tijekom 30 minuta na ledu uz povremeno miješanje. Uslijedilo je centrifugiranje tijekom 10 minuta pri brzini od 21 000 g u ohlađenoj centrifugi (+4°C). Po 100 µL nadsloja te 100 µL različitih razrjeđenja Hsp70 standarda iz kompleta (0,78, 1,56, 3,125, 6,25, 12,5, 25 i 50 ng/mL; pripremljeni u reagensu za otapanje standarda) naneseno je u jažice pločice s vezanim mišjim monoklonalnim protutijelom specifičnim za inducibilni Hsp70. Pločica s uzorcima inkubirana je na sobnoj temperaturi tijekom 2 sata. Jažice su zatim isprane u četiri navrata sa po 200 µL pufera za ispiranje te je u svaku naneseno po 100 µL zečjeg poliklonalnog protutijela specifičnog za inducibilni Hsp70. Pločica je inkubirana na sobnoj temperaturi tijekom jednog sata. Jažice su zatim isprane u četiri navrata sa po 200 µL pufera za ispiranje te je u svaku naneseno po 100 µL protutijela za zečji IgG konjugiranog s peroksidazom iz hrena. Pločica je inkubirana na sobnoj temperaturi tijekom jednog sata. Jažice su zatim isprane u četiri navrata puferom za ispiranje (200 µL po jažici) te je u svaku jažicu naneseno po 100 µL supstrata za peroksidazu, tetrametilbenzidina. Pločica je inkubirana na sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta. U jažice je zatim dodano po 200 µL otopine za zaustavljanje reakcije te je izmjerena apsorbancija na 450 nm.

c) Određivanje ekspresije proteina imunocitokemijskom analizom

Za analizu ekspresije proteina u sterilne ploče za uzgoj s 24 mjesta postavljena su okrugla stakalca i obložena otopinom kolagena iz repa štakora (u 0,1 N octenoj kiselini). Nakon dvokratnog ispiranja otopine kolagena PBS-om, U251N stanice ($3x10^3$ stanica/jažici) nasađene su u ploče te nakon 24 sata tretirane citotoksičnim poticajem i/ili nanočesticama. Nakon tretmana u svaku jažicu dodano je 400 µL PFA (4%; u PBS-u) i inkubirano tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Uslijedilo je trokratno ispiranje s po 500 µL PBS-a, svako u trajanju od 5 minuta, a zatim je naneseno 500 µL otopine Triton-X-100 (0,1%; u PBS-u) i inkubirano tijekom 5 minuta. Ponovno je uslijedilo trokratno ispiranje s po 500 µL PBS-a, svako u trajanju od 5 minuta. Stakalca sa stanicama su zatim inkubirana s 50 µL kozjeg seruma (10%; u PBS-u) tijekom 60 minuta u svrhu uklanjanja nespecifičnog signala proteina.

Otopina kozjeg seruma je uklonjena, a stakalca su zatim preko noći inkubirana u otopini primarnog protutijela za Hsp70/72 (1:200; u 10% kozjem serumu u PBS-u). Stakalca su trokratno isprana sa po 50 μL PBS-a. Uslijedila je inkubacija u otopini sekundarnog protutijela obilježenog bojom AlexaFluor488 (1:800; u 10% kozjem serumu u PBS-u) tijekom 60 minuta na sobnoj temperaturi u tami. Stakalca su zatim trokratno isprana s po 50 μL PBS-a. Konačno su stakalca inkubirana s 50 μL otopine Hoechst 33342 (10 μM; u PBS-u) tijekom 5 minuta, nakon čega su isprana s 50 μL destilirane H_2O, i postavljena u kapljici otopine za očuvanje fluorescentnog signala na mikroskopska stakalca te učvršćena nanošenjem laka za nokte na rubove. Mikroskopske slike dobivene su uz upotrebu fluorescentnog mikroskopa spojenog s digitalnom kamerom te programa Leica Application Suite V4, a analizirane su pomoću programa Image J.

2.2.8. Statistička obrada rezultata

Statistička obrada podataka dobivenih mjerenjima provedena je pomoću statističkog programskog paketa GraphPad Prism 6. Za testiranje značajnosti razlike između dviju ili više skupina brojčanih podataka korišten je test ANOVA (od *engl*. ANalysis Of Variance), te Bonferroni-ijeva metoda za *post–hoc* testiranje. Vrijednost $p<0,05$ smatrana je statistički značajnom.

3. REZULTATI

3.1. UVODNI PREGLED REZULTATA

Kako bi se ispitala uloga inducibilnog oblika Hsp70 u zaštiti tumorskih stanica od stanične smrti najprije je određena ekspresija ovog proteina u fiziološkim uvjetima. Za daljnje ispitivanje uloge Hsp70 u zaštiti od stanične smrti potaknute različitim spojevima te uloge Hsp70 u osiguravanju proliferacije tumorskih stanica, korištena su dva pristupa: izazivanje stanične smrti u uvjetima u kojima je ekspresija Hsp70 u tumorskim stanicama *in vitro* povećana te izazivanje stanične smrti u uvjetima u kojima ekspresija Hsp70 u tumorskim stanicama *in vitro* smanjena.

Povećana ekspresija Hsp70 postignuta je izlaganjem tumorskih stanica toplinskom stresu, odnosno uvjetima povišene temperature (43°C) tijekom 30 minuta. Nakon toplinskog stresa tumorske stanice su inkubirane u uvjetima uobičajeno korištenim tijekom kultiviranja svih staničnih linija (37°C, 95% vlažnosti, 5% CO_2) tijekom 4, 8 ili 12 sati. Stanice su potom bile izložene tretmanu staurosporinom (1 μM) tijekom 4 sata, kako bi se izazvala aktivacija programirane stanične smrti, apoptoze, te ispitala uloga Hsp70 induciranog toplinskim stresom u zaštiti od programirane stanične smrti uzrokovane ovim spojem.

Smanjena ekspresija Hsp70 u tumorskim stanicama postignuta je posttranskripcijskim utišavanjem gena *hsp70* pomoću siRNA uklopljene u kitozanske nanočestice. Nanočestice su pripremljene ionotropnim geliranjem kitozana (K) vodenom otopinom TPP-a ili smjesom vodenih otopina TPP-a i siRNA. Detalji o nukleotidnom slijedu Hsp70 sljedno-specifične siRNA korištene u ovom dijelu istraživanja mogu se naći u odjeljku 2.1.4. Ispitana su fizikalna svojstva kitozanskih nanočestica, njihova toksičnost te učinkovitost u utišavanju Hsp70, a zatim je promatrana i promjena u vijabilnosti tumorskih stanica uslijed izlaganja K-TPP nanočesticama s uklopljenom Hsp70 sljedno-specifičnom siRNA tijekom razdoblja od jednog do tri dana.

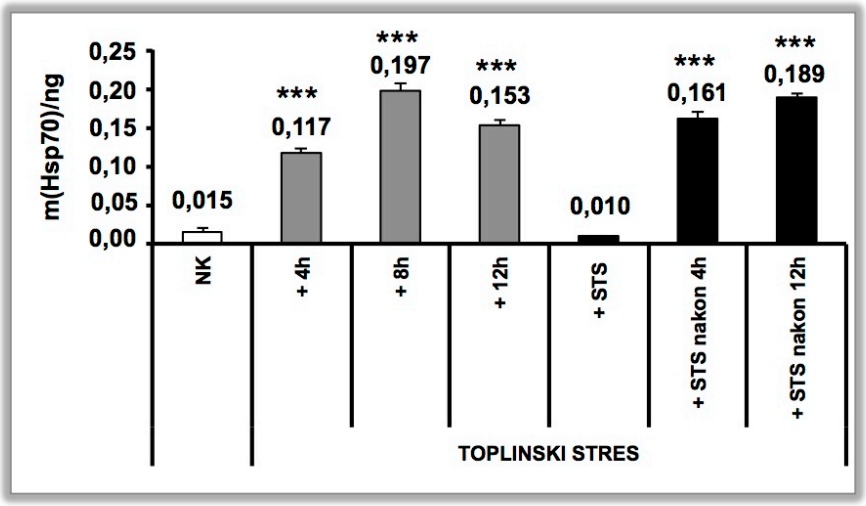
Konačno, ispitan je istovremeni tretman K-TPP-Hsp70 siRNA nanočesticama, kao sredstvom za utišavanje Hsp70, i celastrolom, inhibitorom aktivnosti Hsp90. Promatrana je promjena stanične vijabilnosti uslijed istovremene inhibicije Hsp90 i utišavanja ekspresije Hsp70 u tumorskim stanicama uzgojenima kao jedan sloj adherentnih stanica te u tumorskim stanicama uzgojenima u obliku tumorskih sferoida.

3.2. ULOGA INDUCIBILNOG Hsp70 U ZAŠTITI OD STANIČNE SMRTI

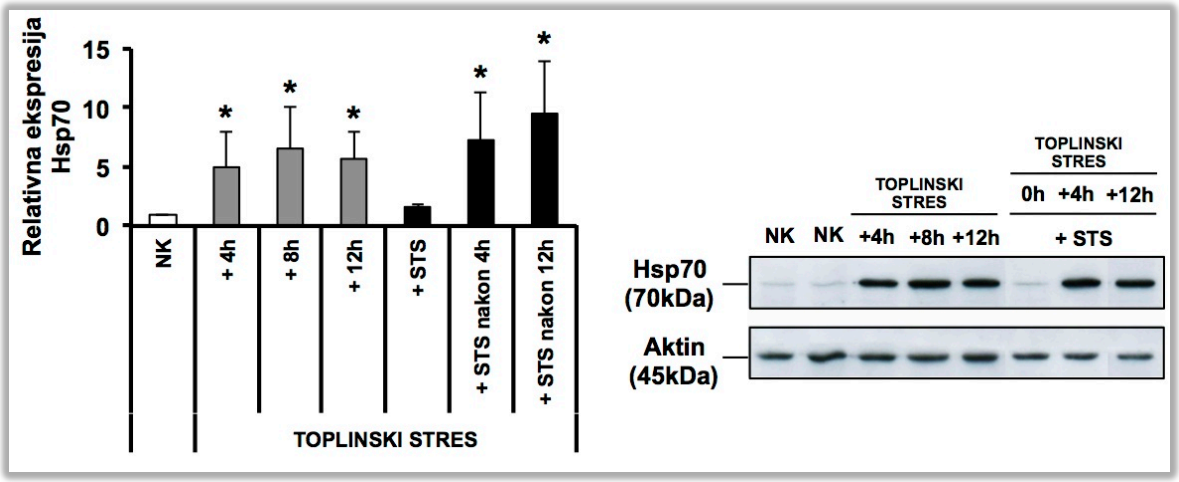
3.2.1. Ekspresija inducibilnog Hsp70 u tumorskim stanicama u fiziološkim i stresnim uvjetima

Kao model tumorskih stanica u ovom dijelu istraživanja korištene su Jurkat stanice. Ekspresija Hsp70 u ovim stanicama određena je ili u fiziološkim uvjetima rasta u mediju obogaćenom 10% FBS-om i 1% PS-om ili nakon izlaganja stanica toplinskom stresu. U ukupnoj količini staničnih proteina od 1 μg, izmjerena je apsolutna količina inducibilnog Hsp70 od 0,015 ng (± 0,06 ng). Uslijed toplinskog stresa ekspresija Hsp70 bila je značajno povećana 7,8 do 13,3 puta ($p<0,001$), ovisno o vremenu proteklom od izlaganja stanica toplinskom stresu do određivanja ekspresije proteina. Ekspresija Hsp70 bila je značajno povećana već 4 sata nakon izlaganja stanica toplinskom stresu, a između 8 i 12 sati dosegla je maksimum.

Budući da je u kasnijim eksperimentima staurosporin korišten za izazivanje apoptoze najprije su ispitane interakcije staurosporina s čimbenicima odgovornima za induciranje ekspresije Hsp70 uslijed toplinskog stresa. Utvrđeno je da u stanicama izloženima staurosporinu u koncentraciji od 1 μM u trajanju od 4 sata odmah nakon izlaganja toplinskom stresu ne dolazi do povećanja ekspresije Hsp70. Međutim, kada su stanice bile tretirane staurosporinom (1 μM, tijekom 4 sata) 4 ili 12 sati nakon njihovog izlaganja toplinskom stresu dolazilo je do indukcije ekspresije Hsp70. U tim je uvjetima ekspresija Hsp70 bila jednaka njegovoj ekspresiji utvrđenoj u stanicama 4 ili 12 sati nakon toplinskog stresa. Analiza ekspresije Hsp70 provedena je pomoću ELISA kompleta za mjerenje ekspresije inducibilnog oblika Hsp70 (*slika 3.1.*) i imunoblot analizom uz upotrebu protutijela specifičnih za ljudski inducibilni oblik Hsp70 (*slika 3.2.*).

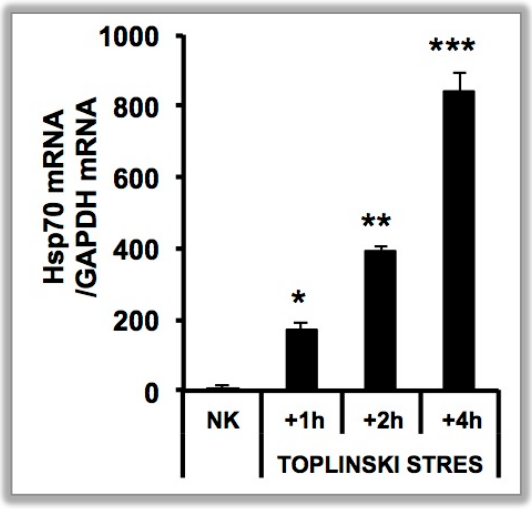


Slika 3.1. *Apsolutna količina inducibilnog Hsp70 u 1 µg staničnih proteina Jurkat stanica kultiviranih u fiziološkim uvjetima, 4, 8 ili 12 sati nakon toplinskog stresa (+ 4h, + 8h ili + 12h) te nakon izlaganja stanica staurosporinu (1 µM) izmjerena ELISA kompletom za inducibilni Hsp70. Prikazane su srednje vrijednosti količine Hsp70 ± SD dobivene u 3 neovisna pokusa. *** označava p<0,001 u odnosu na NK; NK – negativna kontrola, STS – staurosporin.*



Slika 3.2. *Relativna ekspresija inducibilnog Hsp70 u Jurkat stanicama u fiziološkim uvjetima, 4, 8 ili 12 sati nakon toplinskog stresa (+4h, +8h ili +12h) te nakon izlaganja staurosporinu (1 µM) utvrđena analizom imunoblota (desni prikaz). Prikazane su srednje vrijednosti ekspresije Hsp70 ± SD dobivene u tri neovisna pokusa. * označava p<0,05 u odnosu na NK; NK – negativna kontrola, STS – staurosporin.*

Povećana količina Hsp70 u tumorskim stanicama rezultat je povećane transkripcije *hsp70* gena. Za analizu ekspresije *hsp70* gena korišten je RT-PCR postupak. Utvrđeno je da već 1 sat nakon toplinskog stresa dolazi do značajnog ($p<0,05$) porasta transkripcije gena što je prikazano kao porast u količini Hsp70 mRNA u odnosu na količinu GAPDH mRNA u stanicama izloženim toplinskom stresu u odnosu na odnos količine Hsp70 mRNA i količine GAPDH mRNA u netretiranim stanicama (*slika 3.3.*).



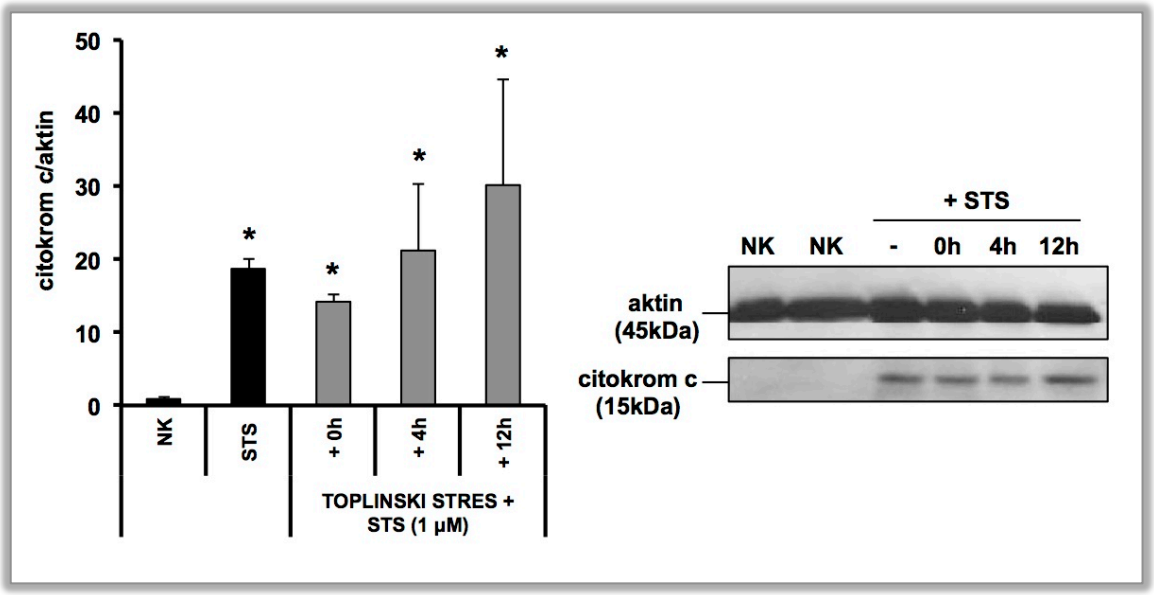
Slika 3.3. *RT-PCR analiza genske ekspresije Hsp70 u Jurkat stanicama kultiviranim u fiziološkim uvjetima te 1, 2 ili 4 sata nakon toplinskog stresa (+1h, +2h ili +4h). Prikazane su srednje vrijednosti ekspresije Hsp70 mRNA ± SD dobivene u tri neovisna pokusa. */**/*** označava $p<0,05$/ $p<0,01$/ $p<0,001$ u odnosu na negativnu kontrolu, NK.*

3.2.2. Uloga Hsp70 u zaštiti od stanične smrti izazvane staurosporinom

U svrhu ispitivanja djeluje li Hsp70 induciran toplinskim stresom u tumorskim stanicama u zaštiti stanica od stanične smrti inducirane staurosporinom Jurkat stanice izložene su najprije toplinskom stresu, a potom, nakon različitih vremenskih razdoblja oporavka od toplinskog stresa, staurosporinu u koncentraciji od 1 μM, tijekom 4 sata. Učinkovitost staurosporina u izazivanju programirane stanične smrti, apoptoze, bez izlaganja Jurkat stanica toplinskom stresu te nakon izlaganja Jurkat stanica toplinskom stresu, promatrana je kroz niz biokemijskih i morfoloških promjena koje se u stanicama događaju uslijed apoptoze:

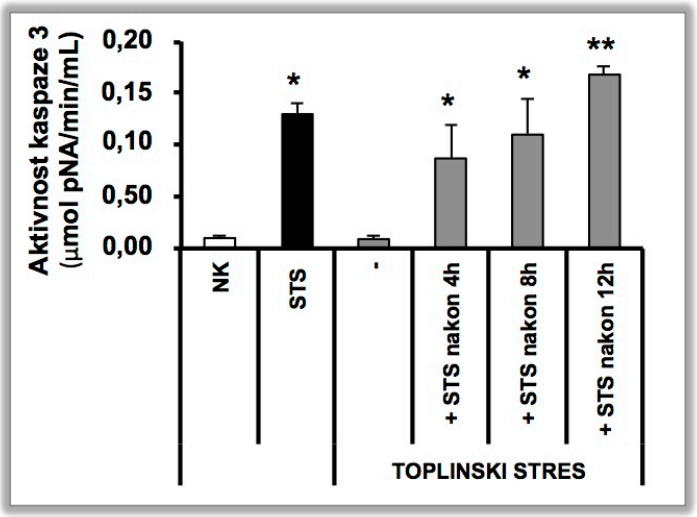
1) otpuštanje citokroma c iz mitohondrija u citosol,
2) aktivacija kaspaze 3,
3) ispoljavanje fosfatdilserina na vanjskoj strani stanične membrane,
4) fragmentacija DNA.

Tretman Jurkat stanica staurosporinom uzrokovao je značajno ($p<0,05$) otpuštanje citokroma c iz mitohonodrija u citosol kako je bilo i očekivano s obzirom na sposobnost staurosporina da potakne apoptozu posredovanu promjenama na razini mitohondrija i mitohondrijske membrane. U tretmanu u kojem je izlaganju staurosporinu prethodio toplinski stres s razdobljem oporavka od toplinskog stresa tijekom 4 ili 12 sati staurosporin je uzrokovao jednako otpuštanje citokroma c iz mitohondrija u citosol. Rezultati su prikazani na *slici 3.4.* i ukazuju da Hsp70 induciran toplinskim stresom nije spriječio proces apoptoze u Jurkat stanicama izloženim staurosporinu.



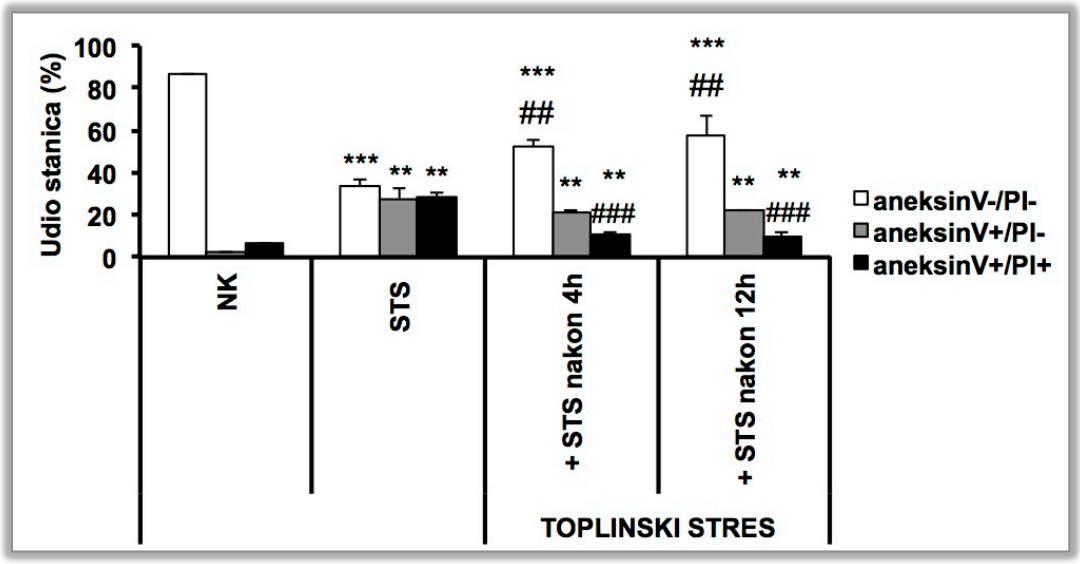
Slika 3.4. *Otpuštanje citokroma c u citosol u Jurkat stanicama izloženim samo staurosporinu (1 μM) ili staurosporinu nakon toplinskog stresa i oporavka stanica od 0, 4 i 12 sati. Prikazane su srednje vrijednosti omjera signala citokroma c i aktina ± SD dobivene u 3 neovisna pokusa (lijevi prikaz) te reprezentativni imunoblot (desni prikaz). * označava $p<0,05$ u odnosu na negativnu kontrolu, NK. STS – staurosporin.*

U Jurkat stanicama izloženim staurosporinu dolazi do značajne aktivacije kaspaze 3 ($p<0,05$; *slika 3.5.*). Međutim, ukoliko izlaganju stanica staurosporinu prethodi toplinski stres i oporavak (4, 8 i 12 sati) također dolazi do aktivacije kaspaze 3 unatoč povećanoj ekspresiji Hsp70. To bi ukazivalo na izostanak uloge Hsp70 u zaštiti tumorskih stanica od apoptoze koja se odvija ovisno o kaspazama. Izlaganje stanica toplinskom stresu nije utjecalo na promjenu u aktivnosti kaspaze 3.



Slika 3.5. *Aktivnost kaspaze 3 u Jurkat stanicama nakon tretmana staurosporinom te nakon toplinskog stresa popraćenog tretmanom staurosporinom (1 μM). Prikazane su srednje vrijednosti aktivnosti kaspaze 3 ± SD dobivene u 3 neovisna pokusa. */** označava p<0,05/p<0,01 u odnosu na NK; NK – negativna kontrola, STS – staurosporin.*

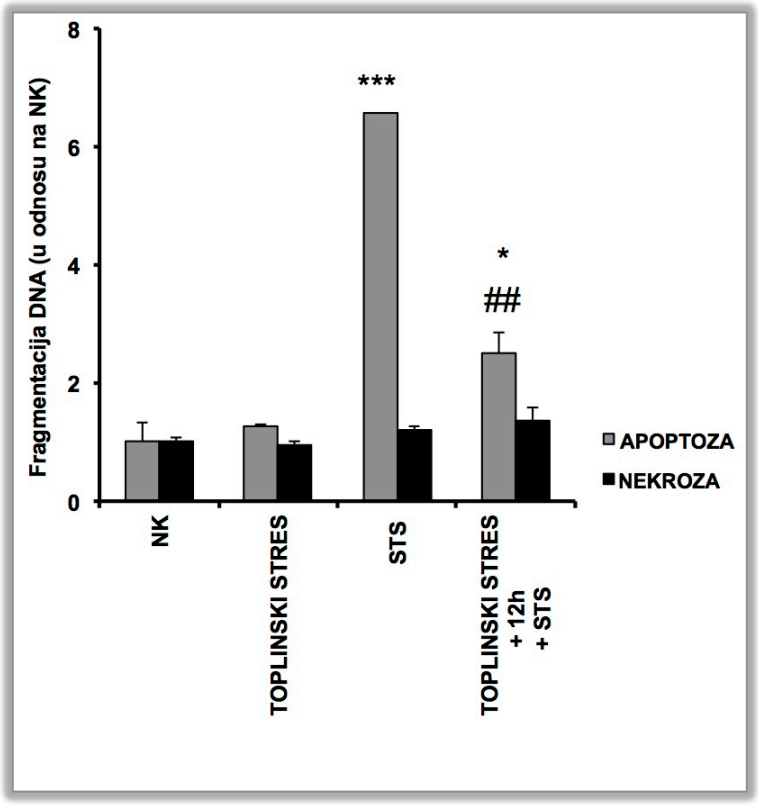
Poznato je da se programirana stanična smrt u stanicama može odvijati i putem neovisnim o promjenama na razini mitohondrija te neovisno o aktivaciji kaspaze 3. Pristupljeno je stoga analizi stanične smrti metodama koje omogućavaju mjerenje ukupnih morfoloških promjena koje se događaju u završnoj fazi stanične smrti, a uključuju ispoljavanje fosfatdilserina na vanjskoj strani stanične membrane te fragmentaciju DNA. Kada je analiziran oblik stanične smrti Jurkat stanica izloženih staurosporinu utvrđivanjem spomenutih morfoloških promjena nađeno je da staurosporin izaziva programiranu staničnu smrt, apoptozu, ali i druge oblike stanične smrti. Protočnom citometrijom i obilježavanjem stanica aneksinom V i propidij jodidom utvrđen je udio stanica koje umiru apoptozom i nekrozom. Udio živih stanica bio je značajno povećan ($p<0,01$) ako su stanice prije izlaganja staurosporinu bile izložene toplinskom stresu i oporavku od 4 i 12 sati, dok se udio apoptotičnih stanica nije značajno smanjio (*slika 3.6.*). Međutim, udio stanica koje su klasificirane kao stanice u kasnoj fazi apoptoze ili u nekrozi, bio je značajno ($p<0,001$) snižen ukoliko je izlaganju Jurkat stanica staurosporinu prethodio toplinski stres i razdoblje oporavka u trajanju od 4 ili 12 sati. Ovi rezultati sugeriraju značajnu ulogu Hsp70, induciranog toplinskim stresom, u zaštiti stanica od apoptoze i/ili nekroze izazvane staurosporinom.



Slika 3.6. *Udio različitih oblika stanične smrti određen protočnom citometrijom nakon izlaganja Jurkat stanica staurosporinu (1 μM) prije i nakon toplinskog stresa i oporavka. Na slici su naznačene različite populacije stanica od kojih aneksinV-/PI- predstavlja populaciju živih stanica, aneksinV+/PI- populaciju stanica u apoptozi, a aneksinV+/PI+ populaciju stanica u kasnoj apoptozi i/ili nekrozi. Prikazane su srednje vrijednosti udjela ± SD dobivene u 3 neovisna pokusa. **/*** označava p<0,01/p<0,001 u odnosu na negativnu kontrolu, NK; ##/### označava p<0,01/p<0,001 u odnosu na tretman staurosporinom, STS.*

Analiza fragmentacije DNA u Jurkat stanicama klasificira stanice s obzirom na oblik stanične smrti. Ukoliko su fragmenti DNA detektirani jedino u staničnom lizatu, pretpostavlja se da su stanice umirale programiranom staničnom smrti, apoptozom, prilikom koje nije došlo do oštećenja stanične membrane ali je došlo do fragmentacije DNA. Ukoliko su fragmenti DNA detektirani i u staničnom lizatu i u odvojenom staničnom nadsloju, pretpostavlja se da su stanice umirale i nekrozom uslijed koje je došlo do oštećenja staničnih membrana i oslobađanja fragmentirane DNA. Za analizu fragmentacije DNA Jurkat stanice tretirane su staurosporinom nakon toplinskog stresa s razdobljem oporavka od 12 sati.

Rezultati ukazuju da je udio apoptotičnih stanica bio značajno ($p<0,001$) smanjen kod izlaganja stanica staurosporinu uz prethodni toplinski stres i oporavak u trajanju od 12 sati (*slika 3.7.*). Istovremeno, može se uočiti da se udio nekrotičnih stanica nije značajno razlikovao između dva navedena tretmana. Ovi rezultati potvrdili su značajnu ulogu Hsp70, induciranog toplinskim stresom, u zaštiti stanica od apoptoze izazvane staurosporinom. Toplinski stres nije prouzročio umiranje stanica niti jednim od utvrđenih oblika stanične smrti.

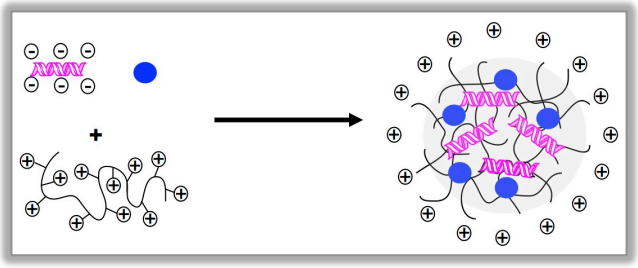


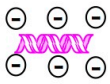
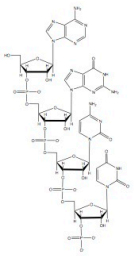
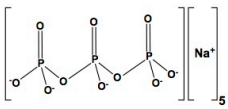
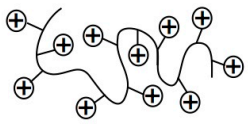
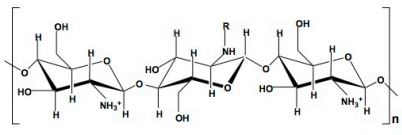
Slika 3.7. *Udio različitih oblika stanične smrti kod Jurkat stanica izloženih staurosporinu (1 μM) ili toplinskom stresu i staurosporinu nakon oporavka od toplinskog stresa u trajanju od 12 sati određen analizom fragmentacije DNA. Prikazane su srednje vrijednosti fragmentacije DNA ± SD dobivene u 3 neovisna pokusa. */*** označava p<0,05/p<0,001 u odnosu na negativnu kontrolu, NK; ## označava p<0,01 u odnosu na tretman staurosporinom, STS.*

3.3. KITOZANSKE NANOČESTICE I UTIŠAVANJE Hsp70

3.3.1. Fizikalna svojstva kitozanskih nanočestica

Kitozanske nanočestice pripremljene su prema modificiranoj metodi ionotropnog geliranja kitozana TPP-om. Nanočestice su sponatno nastajale prilikom ukapavanja otopine TPP-a u otopinu kitozana uslijed elektrostatskih interakcija između pozitivno nabijenih amino skupina kitozana i negativno nabijenih fosfatnih skupina TPP-a. Kitozanske nanočestice s uklopljenom siRNA priređuju se na isti način tako da se u otopinu kitozana ukapava otopina siRNA i TPP-a (*slika 3.8.*). Spontani nastanak nanočestica uočen je kao zamućenje.



Shematski prikaz molekule	Naziv molekule	Molekulska masa	Struktura molekule
	siRNA	13,3x10^3 g/mol	
	TPP	367,864 g/mol	
	kitozan	113 kDa	

Slika 3.8. *Shematski prikaz nastanka K-TPP-siRNA nanočestica te osnovne karakteristike molekula/spojeva upotrijebljenih za njihovu pripremu.*

U svim pripravcima nanočestica omjer dušika i fosfata, N:P iznosio je 100. N:P označava omjer molova amino skupina kitozana prema molovima fosfatnih skupina siRNA, a izračunava se iz mase upotrijebljenog polimera i siRNA. Pri tome se uzima u obzir da jedna amino skupina kitozana koja predstavlja jedan amino (N) naboj ima molekulsku masu 167,88 Da, a jedna fosfatna skupina RNA koja predstavlja jedan fosfatni (P) naboj ima molekulsku masu 325 Da. Iz mase polimera i RNA u supenziji nanočestica može se izračunati N:P. N:P u iznosu 100:1, označava 100 naboja amino skupina kitozana prema jednom naboju fosfatne skupine siRNA, što ima za posljedicu prevladavanje pozitivnog naboja u nanočesticama, što u konačnom kompleksu između ova dva spoja određuje zeta potencijal i posredno i veličinu nanočestica.

Tablica 3.1. prikazuje fizikalna svojstva nanočestica izmjerena odmah nakon njihove pripreme pomoću uređaja za foton korelacijsku spektroskopiju. Za mjerenje su korišteni pH uvjeti jednaki onima u kojima su nanočestice pripremljene (~ 4,5). Hidrodinamički promjer ukazuje na veličinu nanočestica, a zeta potencijal predstavlja površinski naboj. K-TPP nanočestice bez uklopljene siRNA imale su jednaka fizikalna svojstva kao i K-TPP nanočestice s uklopljenom siRNA.

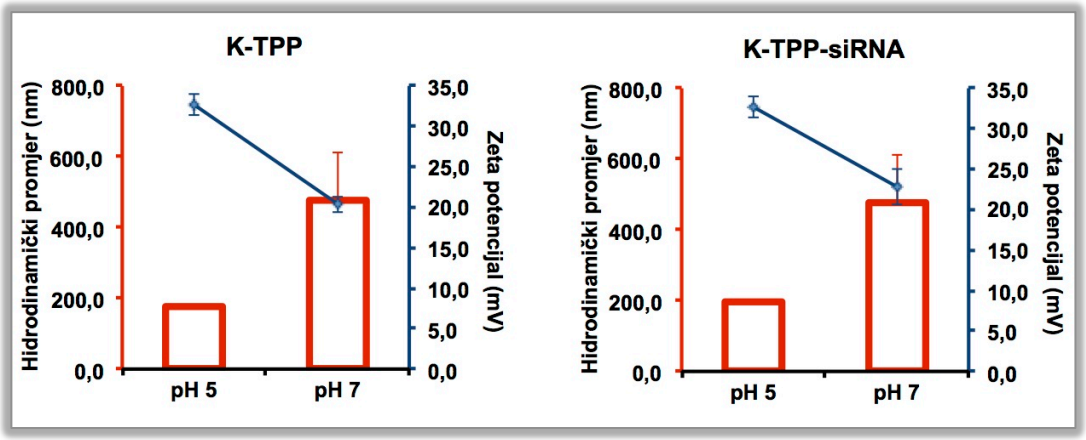
Tablica 3.1. *Veličina nanočestica, indeks polidisperznosti i zeta potencijal.*

Sastav nanočestica	***Veličina (nm) ± SD***	***Indeks polidisperznosti****	***Zeta potencijal (mV) ± SD***
K-TPP	174,5 ± 7,3	0,474 ± 0,074	+33,10 ± 0,7
K-TPP-negativna siRNA	214,8 ± 4,3	0,485 ± 0,062	+34,01± 0,5
K-TPP-Hsp70 siRNA	197,8 ± 4,3	0,454 ± 0,018	+33,71± 0,7

**Indeks polidisperznosti je arbitrarna vrijednost koja ukazuje na distribuciju izmjerenih veličina nanočestica u suspenziji. Maksimalna vrijednost indeksa polidisperznosti iznosi 1,0.*

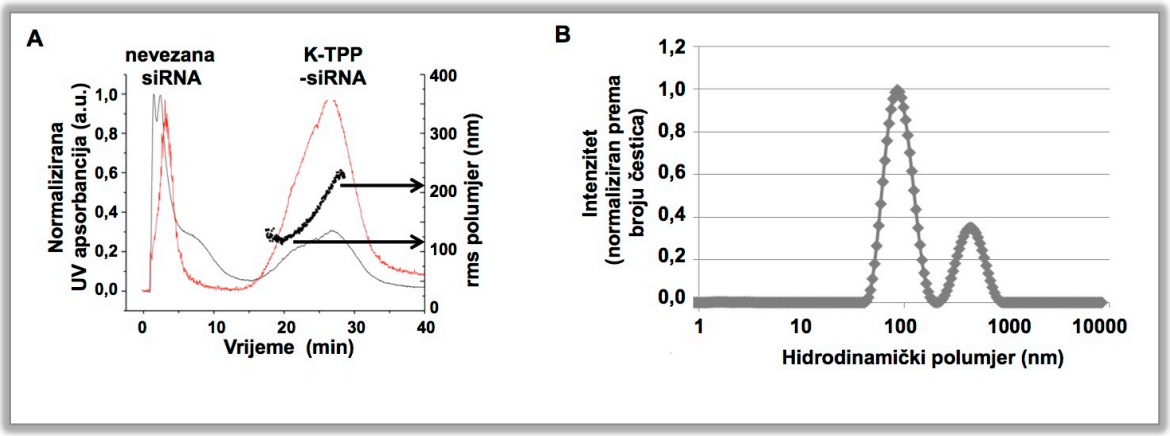
Kako pKa amino skupina kitozana iznosi 6,5, ukupni naboj kitozana može se promijeniti u ovisnosti o pH medija u kojem se kitozanske nanočestice nalaze. Kako bi se ispitao učinak promjene pH na promjenu fizikalnih svojstava nanočestica provedeno je određivanje hidrodinamičkog promjera i zeta potencijala u suspenziji nakon razrjeđivanja PBS-om kojemu je pH bio podešen na ~7,0 (u omjeru 1:10). Podešavanjem pH na ~7,0

imitirani su uvjeti u hranidbenom mediju korištenom za transfekciju tumorskih stanica s K-TPP-siRNA nanočesticama. *Slika 3.9*. prikazuje utjecaj pH medija na veličinu i zeta potencijal K-TPP i K-TPP-siRNA nanočestica. Za ovu analizu korištene su K-TPP nanočestice s uklopljenom negativnom siRNA. Može se uočiti da se i veličina i površinski naboj nanočestica mijenjaju u ovisnosti o pH medija u kojem se nalaze.



Slika 3.9. *Utjecaj pH na promjer (crveni stupci) i zeta potencijal (plave točke) K-TPP i K-TPP-siRNA nanočestica izmjeren pomoću uređaja za foton korelacijsku spektroskopiju. Prikazane su srednje vrijednosti 3 mjerenja (± SD).*

Kako bi se preciznije odredila veličina kitozanskih nanočestica te utjecaj pH na veličinu, provedena su i mjerenja pomoću AF4 sustava za mjerenje (od *engl*. Asymmetrical flow field-flow fractionation). AF4 mjerenje provedeno je na Zavodu za kemiju, Sveučilišta u Montrealu (Department of Chemistry, Université de Montréal) ljubaznošću dr. sc. Alex Moquin-a. Za AF4 korišten je sistem AFx2000MT (Postnova Analytics, Landsberg, Germany) udružen s detektorom za signal u UV valnom području (SPD-20A, Postnova Analytics) i detektorom za raspršenje svjetlosti (DLS, od *engl*. dynamic light scattering detector; Wyatt-QELS, Wyatt Technology). *Slika 3.10*. prikazuje fraktogram kao rezultat AF4 analize (A) u mediju pH 4,5 te hidrodinamički polumjer kitozanskih nanočestica u pH 7,4 kao rezultat DLS analize (B). Može se uočiti da se u pH 4,5 kitozanske nanočestice pojavljuju u rasponu rms polumjera (od *engl*. root-mean-square radius) od 100 do 200 nm. U pH 7,4 uočavaju se dvije populacije različitih veličina, čestice veličina ~100 nm u polumjeru i ~200 nm u promjeru te aglomerati ovih čestica (~500-1000 nm u promjeru).



Slika 3.10. A) *AF4 fraktogram kitozanskih nanočestica u pH 4,5. Crna linija predstavlja UV signal na 260 nm postavljen u odnosu na vrijeme eluiranja nanočestica iz sustava za analizu. Crvena linija predstavlja intenzitet raspršenog svjetla postavljen u odnosu na vrijeme eluiranja nanočestica iz sustava za analizu. Crne točke predstavljaju polumjer K-TPP-siRNA nanočestica;* ***B)*** *hidrodinamički polumjer izračunat na osnovu DLS analize u pH 7,4.*

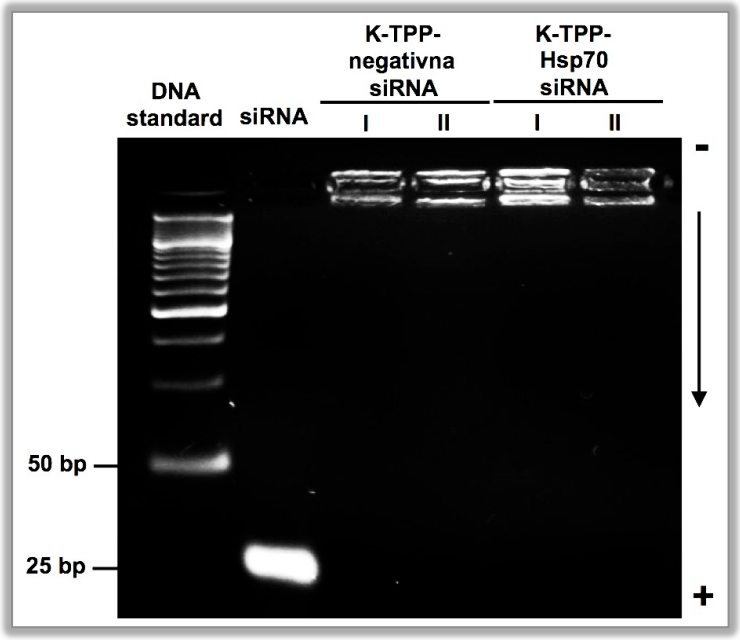
3.3.2. Učinkovitost uklapanja siRNA u kitozanske nanočestice

Nakon ispitivanja fizikalnih svojstava nanočestica ispitana je učinkovitost uklapanja siRNA u nanočestice. Učinkovitost uklapanja iznosila je 68,5% (±13,5), što je značilo da je od ukupne siRNA uključene u postupak pripremanja nanočestica, 68,5% (±13,5) siRNA u suspenziji bilo uklopljeno u K-TPP nanočestice, a ostatak je ostajao slobodan, odnosno nevezan za kitozan. Na osnovu srednje vrijednosti učinkovitosti uklapanja (68,5%) izračunati su volumeni suspenzija K-TPP-siRNA nanočestica koje je bilo potrebno koristiti u daljnjim eksperimentima kako bi se tijekom transfekcije osigurala odgovarajuća koncentracija siRNA (*tablica 3.2.*).

Tablica 3.2. *Volumeni suspenzije K-TPP-siRNA nanočestica te odgovarajuće koncentracije otopina kitozana i TPP-a korištenih u transfekciji tumorskih stanica.*

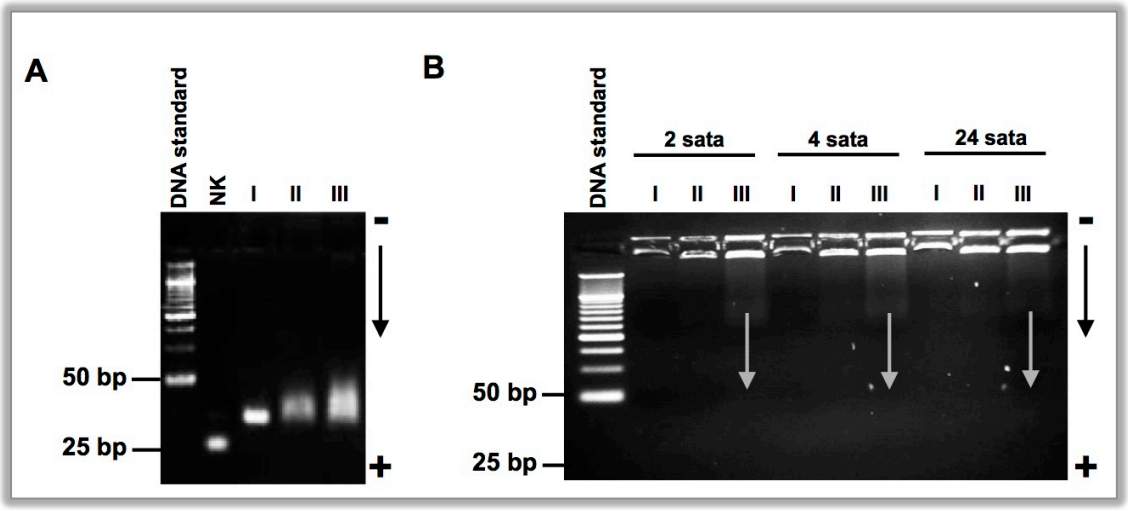
V(suspenzije K-TPP-siRNA nanočestica) /ukupni volumen	***c(siRNA) /nM***	***c(kitozan) /mg/mL***	***c(TPP) /mg/mL***
1/80	10	0,018	0,003
1/40	25	0,036	0,006
1/20	50	0,072	0,012
1/10	100	0,143	0,024

Uklapanje siRNA u K-TPP nanočestice dodatno je određeno elektroforezom na agaroznom gelu. *Slika 3.11*. prikazuje elferogram iz kojeg je razvidno da dolazi do smanjenja mobilnosti siRNA uklopljene u nanočestice u odnosu na slobodnu siRNA. Zbog učinkovitog vezanja s kitozanom siRNA u K-TPP-siRNA nanočesticama zaostajala je tijekom elektroforeze u jažici uz negativnu elektrodu u odnosu na slobodnu siRNA koja je nesmetano tijekom elektroforeze putovala prema pozitivno nabijenoj elektrodi.



Slika 3.11. *Uklapanje siRNA u K-TPP nanočestice analizirano agaroznom elektroforezom. Prikazani su DNA standard, slobodna siRNA te suspenzija K-TPP nanočestica s uklopljenom negativnom ili Hsp70 siRNA (I-suspenzija prije centrifugiranja; II-talog dobiven nakon centrifugiranja suspenzije K-TPP-siRNA nanočestica). Strelica označava očekivani smjer kretanja siRNA.*

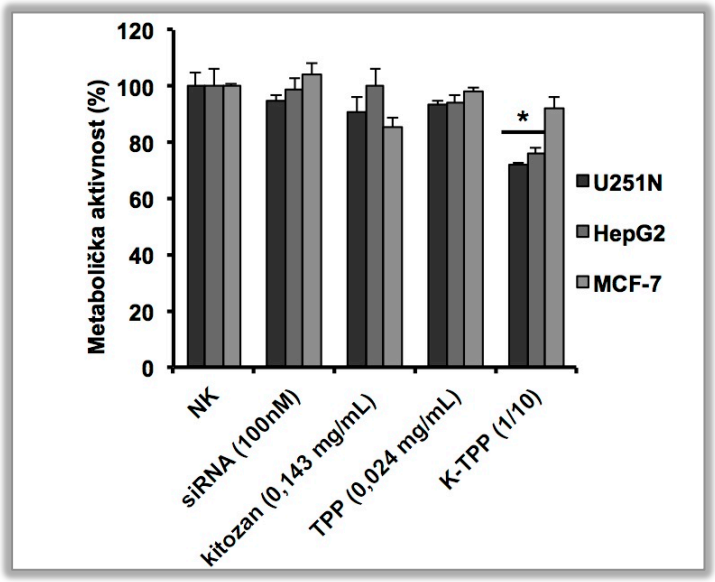
Stabilnost siRNA uklopljene u K-TPP nanočestice, odnosno sposobnost K-TPP nanočestica da zaštite siRNA od razgradnje djelovanjem serumskih proteina, ispitana je inkubacijom K-TPP-siRNA nanočestica u hranidbenom mediju s različitim udjelima FBS-a (0, 10 i 50%). Slobodna, "gola" siRNA bila je razgrađena u mediju obogaćenom s FBS-om već nakon 30 minuta inkubacije pri 37°C (*slika 3.12. A*). Međutim, pri izlaganju K-TPP-siRNA nanočestica mediju s 10% FBS-a, siRNA uklopljena u nanočestice ostala je cjelovita, čak i do 24 sata inkubacije u takvom mediju. Medij s 50% FBS-a dovodi do razaranja K-TPP-siRNA interakcija i oslobađanja siRNA iz K-TPP nanočestica, što se na agaroznoj elektroforezi može uočiti kao slabi difuzni signal već nakon 2 sata inkubacije pri 37°C (*slika 3.12. B*).



Slika 3.12. *Stabilnost siRNA.* ***A)*** *"gola" siRNA nakon 30 minuta inkubacije u hranidbenom mediju s različitim udjelima FBS-a;* ***B)*** *siRNA uklopljena u K-TPP nanočestice nakon 2, 4 ili 24 sata inkubacije u hranidbenom mediju s različitim udjelima FBS-a (I-0%, II-10%, III-50% FBS u hranidbenom mediju). Crna strelica označava očekivani smjer kretanja siRNA, sive strelice označavaju siRNA oslobođenu iz K-TPP nanočestica.*

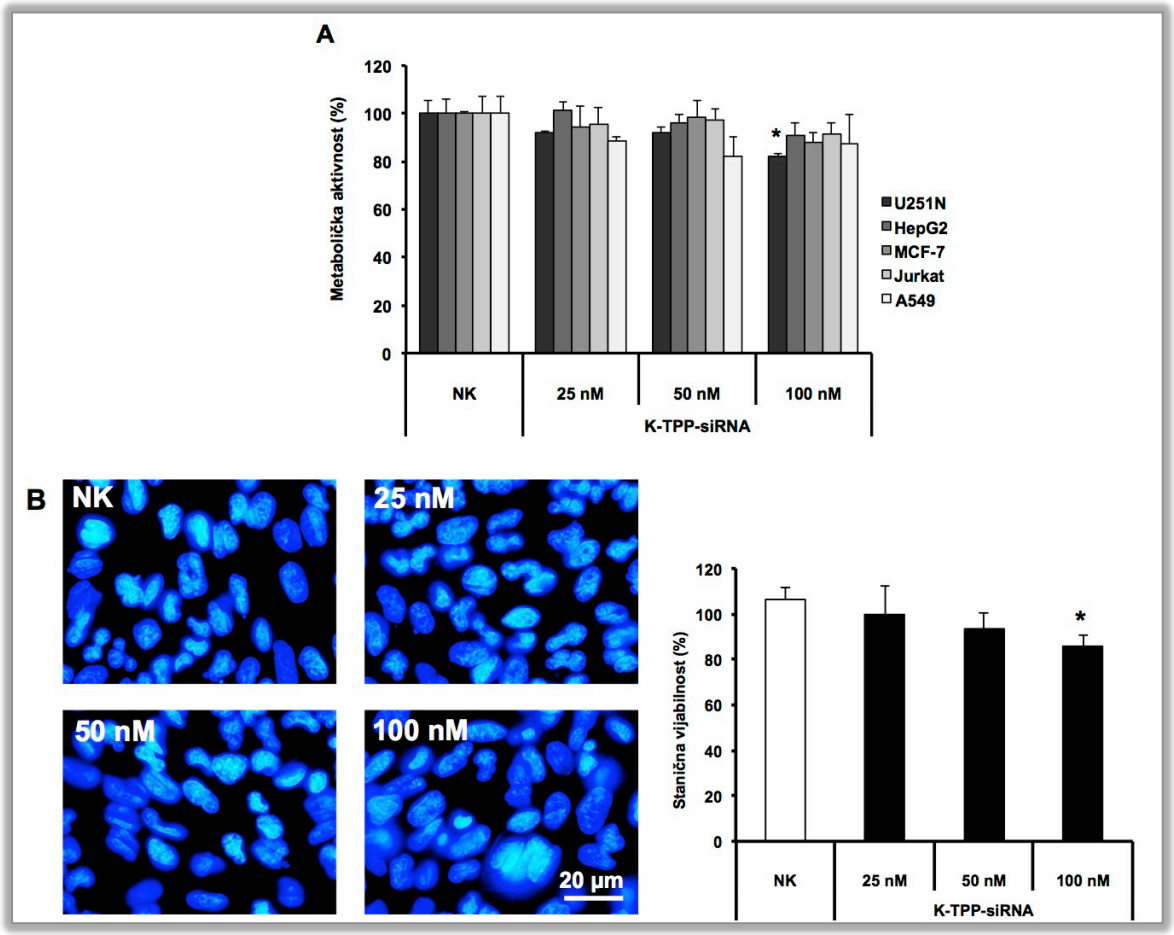
3.3.3. Toksičnosti kitozanskih nanočestica

Najprije je ispitana toksičnost pojedinih spojeva upotrijebljenih u pripremi K-TPP-siRNA nanočestica, otopine kitozana, otopine TPP-a i otopine siRNA u onom odnosu volumena koji je predstavljao najveću korištenu koncentraciju siRNA nakon pripreme nanočestica (100 nM). Različite tumorske stanice izložene su navedenim otopinama tijekom 24 sata. Nije uočeno značajno smanjenje stanične vijabilnosti osim kod U251N i HepG2 staničnih linija kod kojih je došlo do manjeg, ali značajnog ($p<0,05$), smanjenja stanične vijabilnosti nakon inkubacije sa suspenzijom K-TPP nanočestica (*Slika 3.13.).*



Slika 3.13. *Toksičnost otopina spojeva upotrijebljenih za pripremu K-TPP-siRNA nanočestica u različitim tumorskim staničnim linijama. Stanična vijabilnost izražena je kao metabolička aktivnost, a određena je MTT testom 24 sata po završetku inkubacije. Prikazane su srednje vrijednosti metaboličke aktivnosti ± SD dobivene u 3 neovisna pokusa. * označava p<0,05; NK – negativna kontrola.*

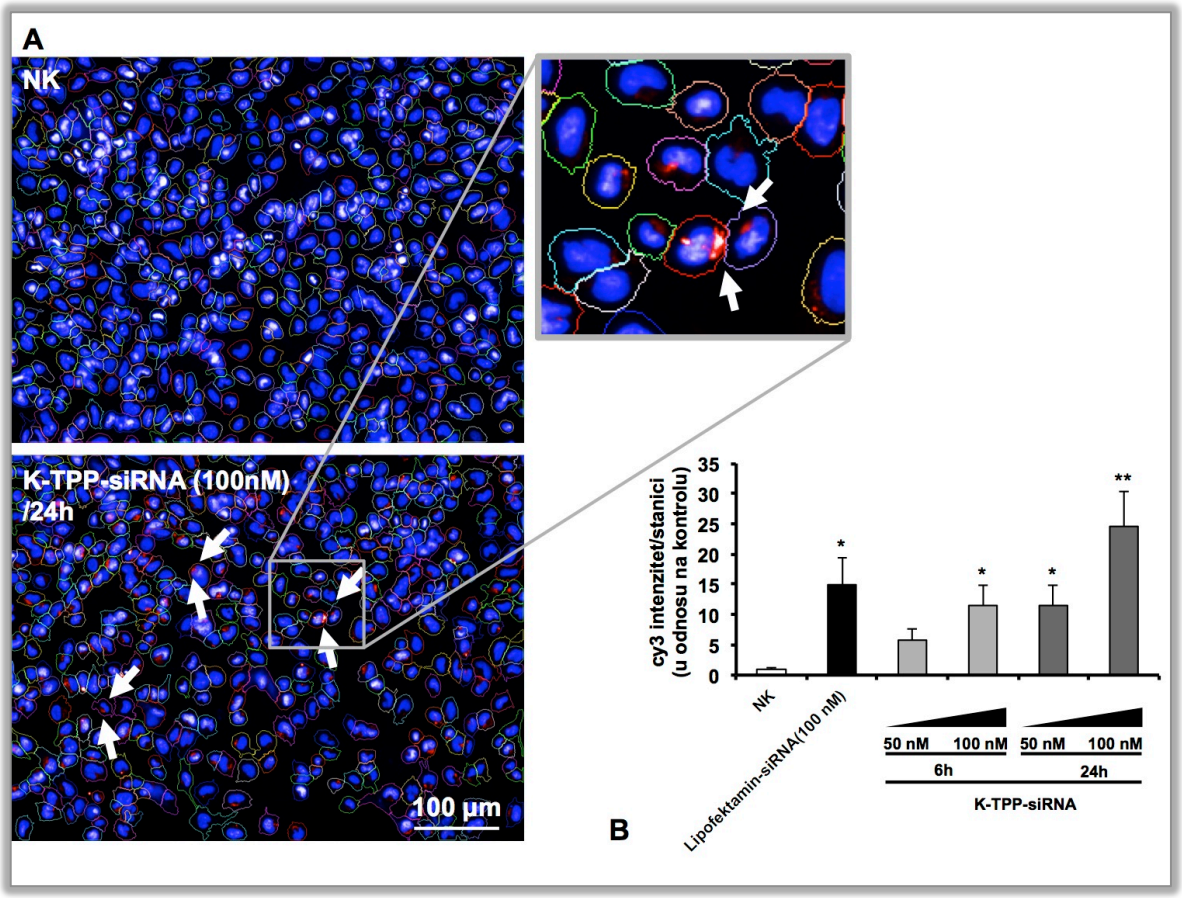
Nadalje, nakon utvrđivanja da spojevi koji su upotrijebljeni za pripremu K-TPP-siRNA nanočestica nisu značajno toksični u različitim tumorskim staničnim linijama ispitana je toksičnost suspenzije K-TPP nanočestica nakon uklapanja negativne siRNA u njih. K-TPP-siRNA nanočestica s uklopljenom negativnom siRNA različitih koncentracija (25, 50 ili 100 nM) također nisu pokazale značajnu toksičnost nakon tretmana u trajanju od 24 sata u različitim tumorskim staničnim linijama (*slika 3.14. A i B*). Manji, ali značajan pad vijabilnosti, uočen je jedino kod najviše primijenjene koncentracije nanočestica (100 nM siRNA). Kitozanske nanočestice u stanice prodiru stvaranjem udubljenja stanične membrane. Ukoliko je stanica izložena povećanom broju kitozanskih nanočestica, kako je to slučaj kod najviše primijenjene koncentracije nanočestica (100 nM siRNA), oštećenja nastala prilikom udubljenja stanične membrane ne mogu biti učinkovito uklonjena što dovodi do stanične smrti. Ukoliko je stanica izložena manjem broju nanočestica (< 100 nM siRNA), oštećenja nastala zbog ulaska nanočestica mogu biti učinkovito uklonjena te nema niti izraženog sniženja stanične vijabilnosti.



Slika 3.14. *Vijabilnost stanica određena je 24 sata nakon izlaganja kitozanskim nanočesticama s uklopljenom negativnom siRNA:* ***A)*** *u različitim tumorskim staničnim linijama MTT testom; prikazane su srednje vrijednosti metaboličke aktivnosti ± SD dobivene u 3 neovisna pokusa;* ***B)*** *u U251N stanicama brojanjem staničnih jezgara nakon obilježavanja bojom Hoechst 33342. Prikazane su reprezentativne mikroskopske slike različitih tretmana (lijevo) te srednja vijabilnost ± SD izražena prema netretiranom uzorku (desno). NK – negativna kontrola; 25, 50, 100 nM označava koncentracije uklopljene siRNA.*

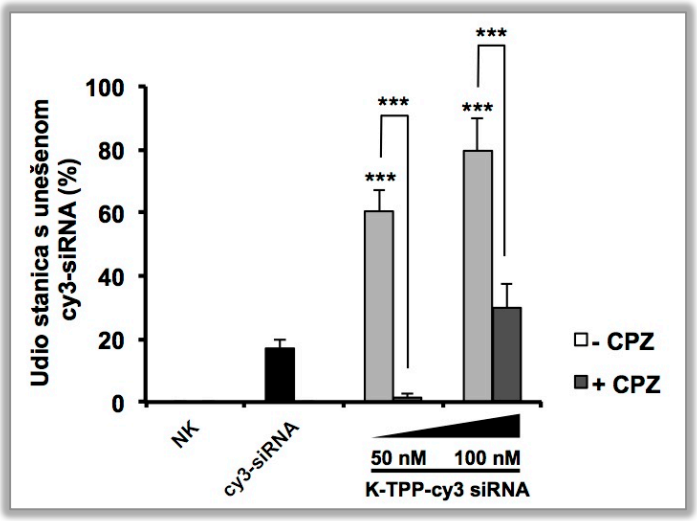
3.3.4. Učinkovitost unosa siRNA u tumorske stanice pomoću kitozanskih nanočestica

Učinkovitost unosa siRNA u tumorske stanice određena je nakon uklapanja siRNA sljedno-specifične za Hsp70 i obilježene s fluorescentnom bojom cy3 u kitozanske nanočestice. Uočen je učinkovit unos siRNA pomoću kitozanskih nanočestica u citoplazmu U251N stanica nakon 24 sata, dok je u prvih 6 sati transfekcije ulazak siRNA u stanice bio slabije učinkovitosti (*slika 3.15. A i B*). Transfekcija pomoću kitozanskih nanočestica u svrhu utišavanja ekspresije proteina u narednim pokusima je stoga provedena tijekom razdoblja od 24 sata.



Slika 3.15. A) *Jezgre U251N stanica obilježene bojom Hoechst 33342 (plavo obojenje) 24 sata nakon transfekcije s K-TPP-siRNA. siRNA (crveno obojenje i bijele strelice) se nalazi u citoplazmi (okviri različitih boja oko jezgri);* ***B)*** *Kvantifikacija signala koji označava intenzitet cy3 po stanici. */** označava p<0,05/0,01 u odnosu na negativnu kontrolu, NK.*

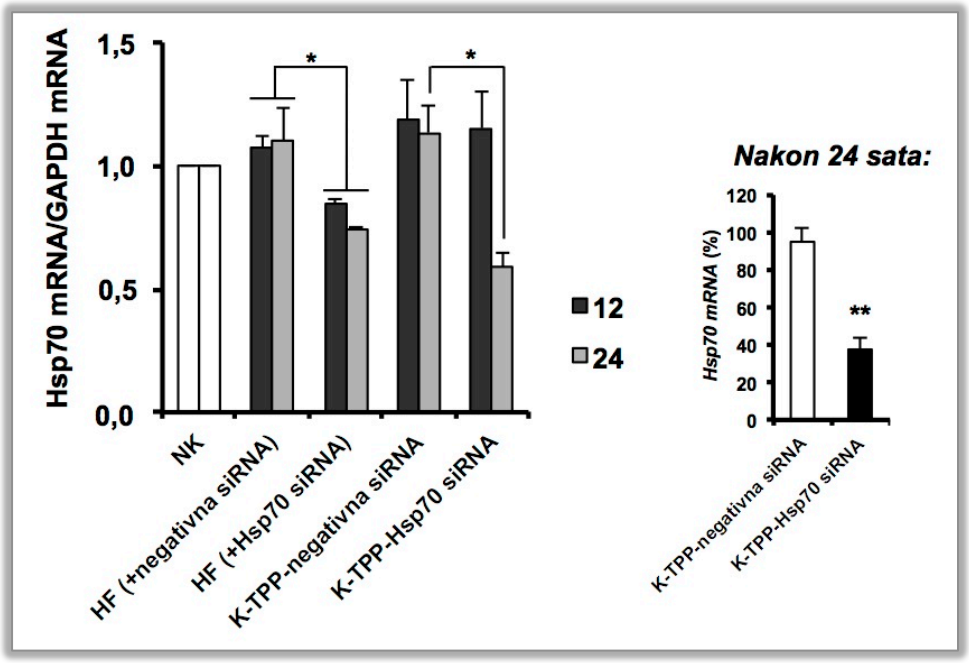
Unos siRNA pomoću kitozanskih nanočestica u tumorske stanice bio je znatno otežan ukoliko je transfekciji kitozanskim nanočesticama prethodio tretman specifičnim inhibitorom endocitoze, kloropromazinom (CPZ, od *engl*. chlorpromazine, 50 μM, tijekom 30 minuta). CPZ je spoj kationskog karaktera koji sprječava oblaganje udubljenja stanične membrane klatrinima i na taj način inhibira endocitozu posredovanu klatrinima. Udio stanica u kojima je zabilježena prisutnost cy3-om obilježene siRNA (100 nM) kada je tretman kitozanskim nanočesticama proveden tijekom 24 sata iznosio je 79,6% (±10,4). Ovaj udio bio je značajno snižen i iznosio je 30,9% (±17,2) kada je tretmanu kitozanskim nanočesticama prethodio tretman CPZ-om (*slika 3.16.)*. Ulazak kitozanskih nanočestica u tumorske stanice se prema tome dijelom odvija endocitozom posredovanom klatrinima.



Slika 3.16. *Udio U251N stanica s cy3-siRNA u citoplazmi nakon transfekcije K-TPP-siRNA nanočesticama (-CPZ) te nakon transfekcije K-TPP-siRNA nanočesticama kojoj je prethodio tretman s kloropromazinom (+CPZ). Udio stanica s cy3-siRNA određen je pomoću aparata za snimanje ploča za uzgoj, Operetta, PerkinElmer. *** označava p<0,001 u odnosu na negativnu kontrolu, NK, ili prikazani tretman.*

3.3.5. Utišavanje Hsp70

Učinkovitost K-TPP-siRNA nanočestica u utišavanju Hsp70 na posttranskripcijskoj razini određena je RT-PCR-om (*slika 3.17.*). Transfekcija Hsp70 siRNA provedena uz upotrebu komercijalno dostupnog sredstva za transfekciju napravljenog od lipida (HiPerFect) uzrokovala je značajno smanjenje ekspresije Hsp70 u Jurkat stanicama (~40%; $p<0,05$). Transfekcija Hsp70 siRNA pomoću kitozanskih nanočestica uzrokovala je usporedivo i značajno smanjenje ekspresije Hsp70 u Jurkat stanicama (~48%; $p<0,05$). U transfekciji s oba sustava korištena je jednaka koncentracija siRNA (50 nM).



Slika 3.17. *Utišavanje hsp70 u Jurkat stanicama transfekcijom HiPerFect reagensom (HF) ili K-TPP-siRNA nanočesticama s uklopljenom Hsp70 siRNA mjereno RT-PCR-om 12 i 24 sata nakon tretmana. Prikazane su srednje vrijednosti Hsp70 mRNA ± SD dobivene u 3 neovisna pokusa. */** označava $p<0,05$/$p<0,01$; NK – negativna kontrola.*

3.4. BIOLOŠKA AKTIVNOST KITOZANSKIH NANOČESTICA S UKLOPLJENOM Hsp70 siRNA

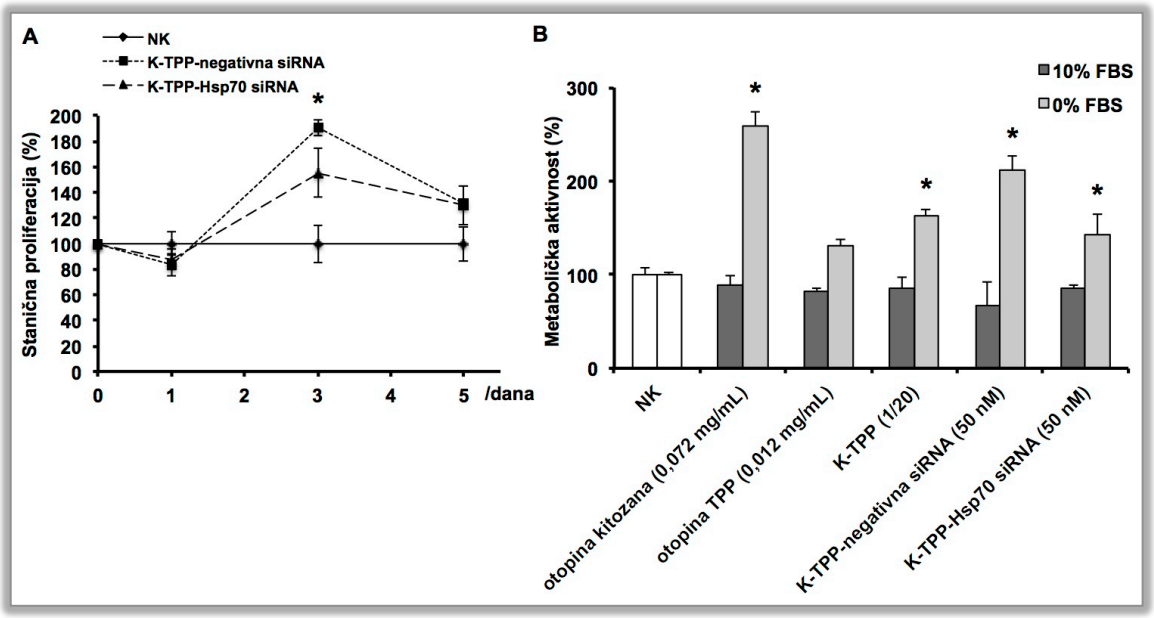
3.4.1. Utjecaj kitozanskih nanočestica s uklopljenom Hsp70 siRNA na vijabilnost tumorskih stanica

U prethodnom odjeljku pokazano je da se kitozanske nanočestice mogu učinkovito koristiti za dostavu siRNA u stanice te da se na ovaj način može postići i do 50% sniženja u ekspresiji *hsp70*. Utišavanje inducibilnog Hsp70 u tumorskim stanicama može dovesti do otežane proliferacije stanica i sprječavanja daljnjeg staničnog rasta što se očituje u smanjenju vijabilnosti. Međutim, faktori prisutni u hranidbenom mediju, poput FBS-a, mogu utjecati na transfektivnu sposobnost kitozanskih nanočestica. Nadalje, inkubacija stanica u hranidbenom mediju iz kojeg je uklonjen FBS može učiniti stanice osjetljivijima na tretman nanočesticama. Stoga je ispitana promjena vijabilnosti tumorskih stanica nakon tretmana s Hsp70 siRNA dostavljenom u kitozanskim nanočesticama u hranidbenim medijima različitog sastava.

Stanice Jurkat stanične linije rasle su tijekom 24 sata u hranidbenom mediju sa svim dostupnim faktorima rasta (10% FBS) ili u mediju iz kojeg su ti faktori rasta bili uklonjeni (0% FBS). Stanice su zatim tretirane K-TPP nanočesticama s uklopljenom negativnom ili Hsp70 siRNA u hranidbenom mediju jednakog sastava. Nakon 3 dana medij prethodnog tretmana je uklonjen, a stanice su ponovno tretirane svježe pripremljenim kitozanskim nanočesticama. Tijekom vremenskog razdoblja od 3 dana Jurkat stanice su predvidivo prošle kroz jednu staničnu diobu te je ponovljenim tretmanom osigurana jednaka koncentracija spojeva/nanočestica u svim stanicama.

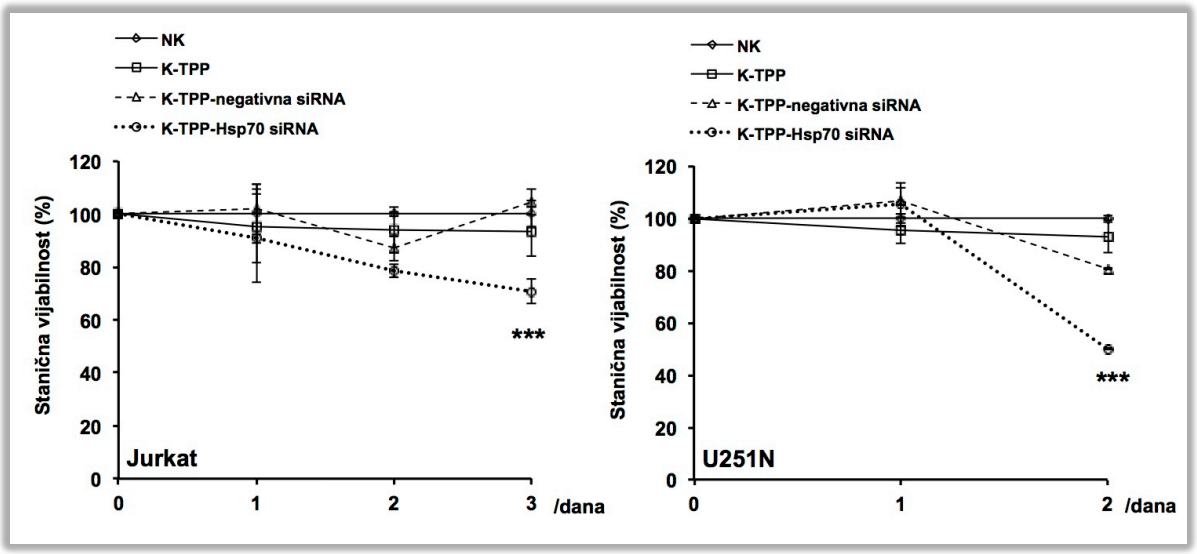
Uočeno je da je u mediju bez FBS-a proliferacija Jurkat stanica nakon 3 dana značajno ($p<0,05$) potaknuta tretmanom K-TPP nanočesticama bilo s uklopljenom negativnom ili Hsp70 siRNA (*slika 3.18. A*). U uvjetima nedostatne količine faktora rasta Jurkat stanice su, čini se, koristile komponente kitozanskih nanočestica u svrhu osiguravanja svoje daljnje proliferacije. Naime, uočeno je i značajno ($p<0,05$) povećanje metaboličke aktivnosti Jurkat stanica 5 dana od početka tretmana K-TPP nanočesticama bilo s uklopljenom negativnom ili Hsp70 siRNA u hranidbenom mediju bez faktora rasta (0% FBS; *slika 3.18. B*). Ovaj rezultat mogao bi se protumačiti kao mogućnost da Jurkat stanice koriste kitozan kao sredstvo preživljenja u uvjetima nedovoljne količine faktora rasta budući je najveći porast metaboličke aktivnosti uočen kod tretmana otopinom kitozana, dok otopina TPP-a nije pridonijela povećanju vijabilnosti.

Uslijed transfekcije Jurkat stanica kitozanskim nanočesticama u uvjetima dostatnih količina faktora rasta (10% FBS) nije uočeno povećanje proliferacije i vijabilnosti nakon tretmana bilo s otopinom kitozana bilo s kitozanskim nanočesticama. Međutim, očekivano smanjenje vijabilnosti nakon tretmana kitozanskim nanočesticama s uklopljenom Hsp70 siRNA također nije uočeno. Pretpostavljeno je: i) da u uvjetima dostatnih količina faktora rasta kitozan, bilo slobodni bilo u nanočesticama, ne pridonosi proliferaciji i vijabilnosti tumorskih stanica i ii) da uslijed dvije diobe Jurkat stanica tijekom 3 ili 5 dana nisu osigurane dovoljne količine Hsp70 siRNA koje bi dovelo do utišavanja gena *hsp70*. Kitozanske nanočestice se stoga mogu koristiti za transfekciju siRNA u uvjetima dostatnih količina faktora rasta (10% FBS).



Slika 3.18. A) *Proliferacija Jurkat stanica tijekom tretmana K-TPP nanočesticama s uklopljenom negativnom ili Hsp70 siRNA u hranidbenom mediju bez FBS-a;* ***B)*** *Vijabilnost Jurkat stanica 5 dana nakon tretmana otopinama kitozana i TPP-a i K-TPP nanočesticama, mjerena MTT testom te prikazana kao metabolička aktivnost. Prikazane su srednje vrijednosti proliferacije i metaboličke aktivnosti u odnosu na negativnu kontrolu ± SD dobivene u 3 neovisna pokusa. * predstavlja $p<0,05$ u odnosu na negativnu kontrolu, NK.*

Kako bi se osigurala dovoljna količina Hsp70 siRNA nakon dioba Jurkat stanica i U251N stanica proveden je tretman K-TPP-Hsp70 siRNA nanočesticama (50 nM siRNA) tijekom 2 ili 3 dana uz ponavljanje tretmana svaka 24 sata. Preciznije, nakon svaka 24 sata medij prethodnog tretmana je uklonjen te su stanice inkubirane u svježem hranidbenom mediju s dodatkom nove količine kitozanskih nanočestica. Na ovaj način stanice su nakon svake diobe bile izložene jednakim uvjetima tretmana. Uočeno je da ponovljeni tretman K-TPP-Hsp70 siRNA nanočesticama dovodi do značajnog ($p<0,001$) smanjenja vijabilnosti tumorskih stanica u odnosu na tretman K-TPP-negativna siRNA nanočesticama i/ili u odnosu na netretirane stanice (*slika 3.19.*). Ponovljeni tretman K-TPP-Hsp70 siRNA nanočesticama osigurava u Jurkat i U251N stanicama dostatnu količinu siRNA kako bi se provelo utišavanje gena *hsp70*. Utišavanje gena *hsp70* postignuto na ovaj način dovelo je do smanjenja stanične vijabilnosti Jurkat i U251N stanica.



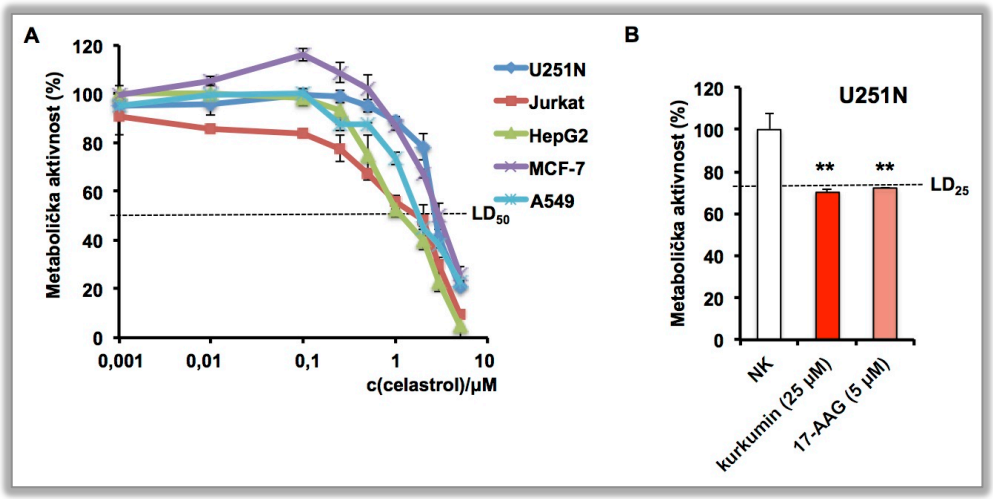
Slika 3.19. *Vijabilnost Jurkat i U251N stanica tijekom 2 ili 3 dana ponavljanog tretmana (svaka 24 sata) K-TPP nanočesticama ili K-TPP nanočesticama s uklopljenom negativnom ili Hsp70 siRNA, određena brojanjem stanica nakon bojanja s tripanskim plavilom. Prikazane su srednje vrijednosti vijabilnosti ± SD dobivene u 3 neovisna pokusa. *** predstavlja $p<0,001$ u odnosu na negativnu kontrolu, NK.*

3.5. ANTITUMORSKA AKTIVNOST Hsp70 I Hsp90 INHIBITORA

3.5.1. Promjena vijabilnosti tumorskih stanica uslijed inhibicije Hsp90

Spojevi potput celastrola, kurkumina i 17-AAG navedeni su u literaturi kao inhibitori aktivnosti Hsp90. Ovi spojevi djeluju na način da sprječavaju interakciju Hsp90 s partnerskim proteinima koji zajedno s njim promoviraju stanično preživljavanje. Inhibicija aktivnosti Hsp90, dakle, posljedično dovodi do sprječavanja daljnje proliferacije tumorskih stanica. U prethodnom odjeljku pokazano je da utišavanje ekspresije Hsp70 dovodi do smanjenja stanične vijabilnosti. Istovremeni tretman s inhibitorima Hsp90 (celastrol, kurkumin i 17-AAG) i inhibitorima Hsp70 aktivnosti u tumorskim stanicama uzrokovao bi prema tome sprječavanje proliferacije zbog gubitka aktivnosti Hsp90 i poticanje spontane stanične smrti zbog gubitka aktivnosti Hsp70. Istovremenim djelovanjem na dva stanična puta mogla bi se postići učinkovitija antitumorska terapija.

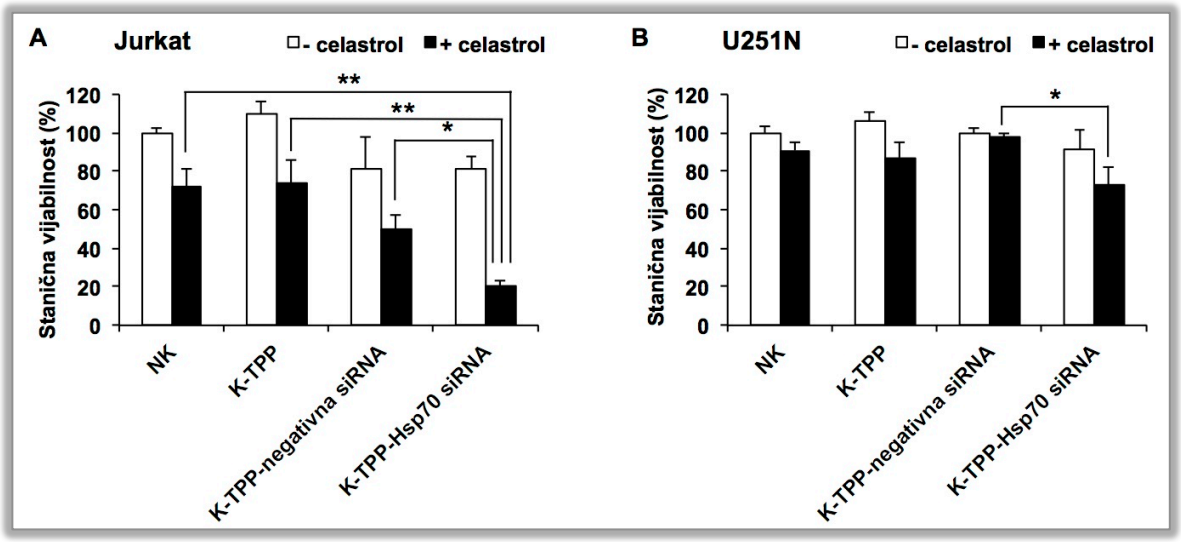
Nekoliko tumorskih staničnih linija (U251N, Jurkat, HepG2, MCF-7, A549) izloženo je djelovanju celastrola u koncentracijama od 0,001 do 5 µM tijekom 24 sata. Vijabilnost tumorskih stanica procijenjena je temeljem mjerenja metaboličke aktivnosti stanica (MTT test) kako je prikazano na *slici 3.20. A*. Utvrđeno je da koncentracije celastrola od 1 do 5 µM za ≥50% smanjuju vijabilnost svih navedenih tumorskih stanica. Tretmani s kurkuminom (25 µM) i 17-AAG (5 µM) nakon 24 sata izazvali su 25% smanjenje vijabilnosti U251N stanica (*slika 3.20. B*).



Slika 3.20. *Metabolička aktivnost različitih tumorskih staničnih linija u prisutnosti celastrola (**A**), i U251N stanica u prisutnosti kurkumina i 17-AAG-a (**B**). $LD_{50/25}$ označava letalnu dozu spoja pri kojoj je vijabilnost stanica smanjena za 50% odnosno za 25% u odnosu na negativnu kontrolu. *** predstavlja p<0,001 u odnosu na negativnu kontrolu, NK.*

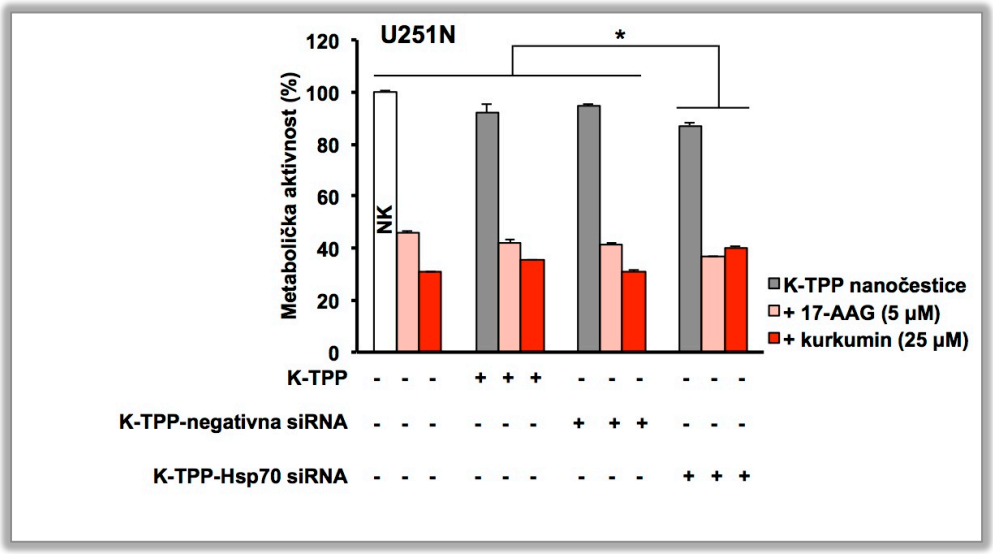
3.5.2. Udružena inhibicija Hsp70 i Hsp90

Celastrol je pri koncentraciji od 1 μM uzrokovao smanjenje vijabilnosti tumorskih stanica već nakon 24 sata (71,61% ± 9,94 za Jurkat te 90,92% ± 3,54 za U251N, u odnosu na negativnu kontrolu). Kada su tumorske stanice bile istovremeno izložene kitozanskim nanočesticama s Hsp70 siRNA (50 nM) i celastrolu njihova se vijabilnost nakon 24 sata značajno smanjila ($p<0,05$) u odnosu na stanice izložene samo kitozanskim nanočesticama ili samo celastrolu (*slika 3.21. A i B*).



Slika 3.21. *Vijabilnost Jurkat (**A**) i U251N (**B**) stanica određena brojanjem živih stanica nakon bojanja s tripanskim plavilom nakon istovremenog izlaganja stanica K-TPP-Hsp70 siRNA nanočesticama i celastrolu (1 μM). Prikazane su srednje vrijednosti vijabilnosti ± SD dobivene u 3 neovisna pokusa. */**označava $p<0,05$/$p<0,01$ u odnosu na negativnu kontrolu, NK.*

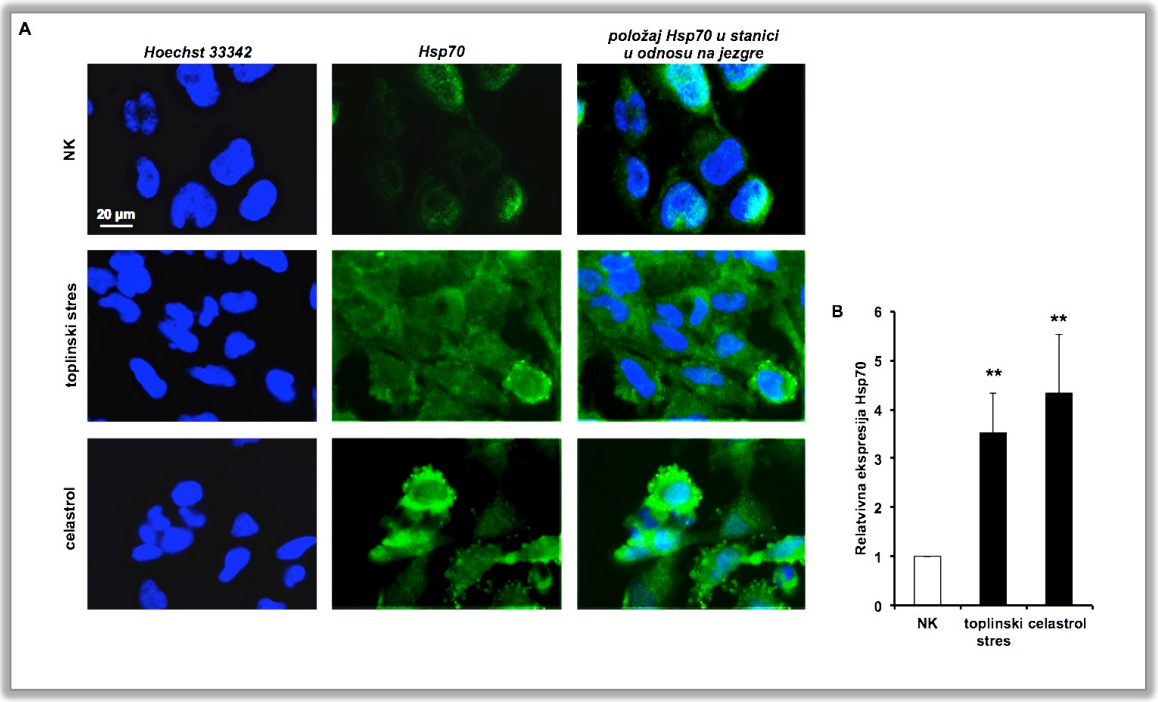
Poboljšani učinak u smanjenju stanične vijabilnost uočen je i kod istovremenog izlaganja stanica K-TPP-Hsp70 siRNA nanočesticama i 17-AAG-u, ali tek nakon tretmana u trajanju od 48 sati (*slika 3.22.*). Međutim istovremeno izlaganje stanica kitozanskim nanočesticama s uklopljenom Hsp70 siRNA i kurkuminu uzrokovalo je povećanje stanične vijabilnosti, što je opovrgnulo hipotezu da bilo koji spoj koji je aktivan u inhibiciji Hsp90 može dovesti do smanjenja vijabilnosti tumorskih stanica pri istovremenoj inhibiciji Hsp70 i Hsp90.



Slika 3.22. *Metabolička aktivnost kao mjera vijabilnosti U251N stanica mjerena MTT testom nakon istovremenog izlaganja stanica kitozanskim nanočesticama s uklopljenom Hsp70 siRNA i 17-AAG-u (5 mM) odnosno kurkuminu (25 μM). Prikazane su srednje vrijednosti metaboličke aktivnosti ± SD dobivene u 3 neovisna pokusa. * označava p<0,05; NK - negativna kontrola.*

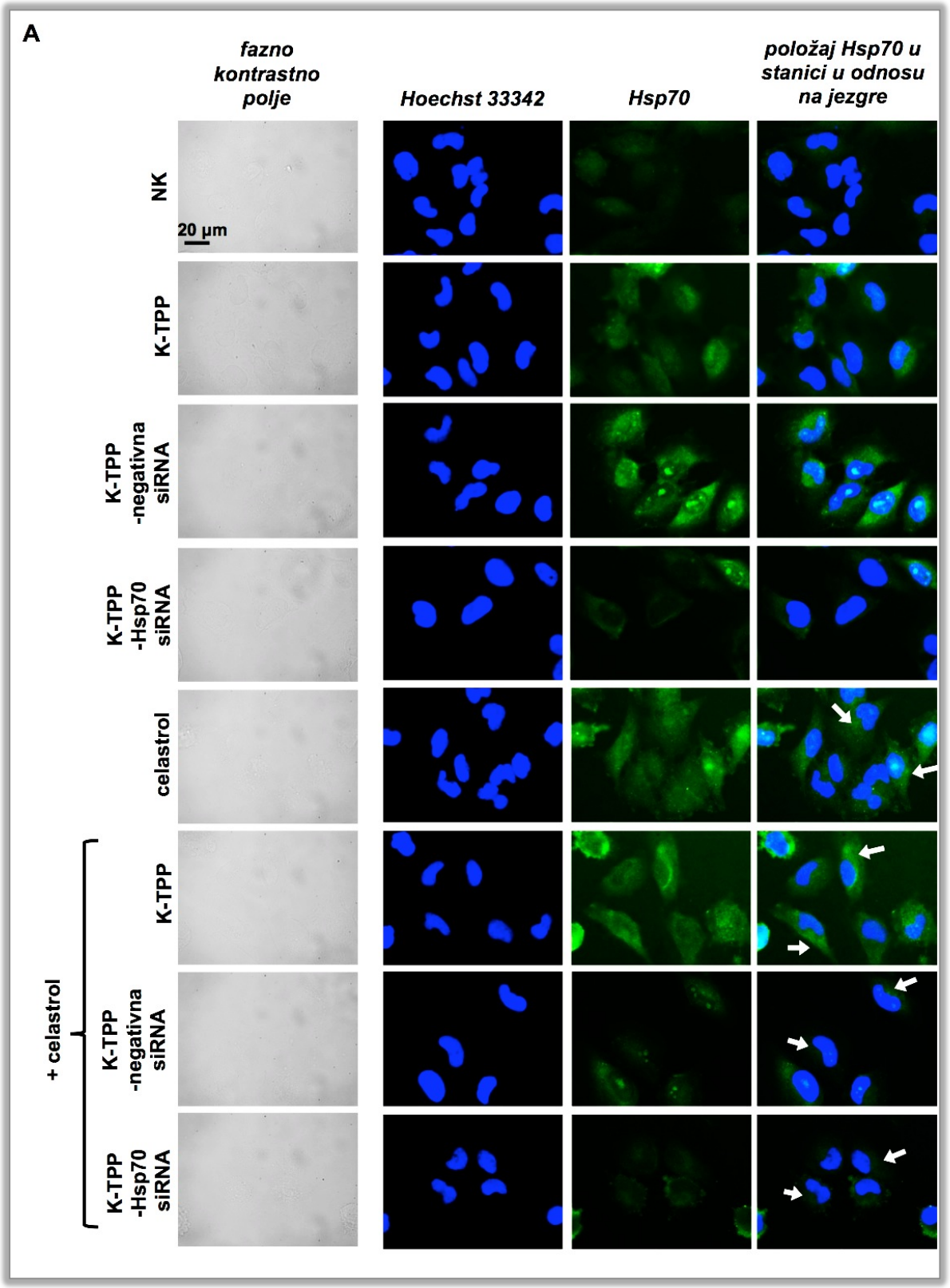
3.5.3. Ekspresija Hsp70 u stanicama nakon izlaganja kitozanskim nanočesticama s uklopljenom Hsp70 siRNA i celastrolu

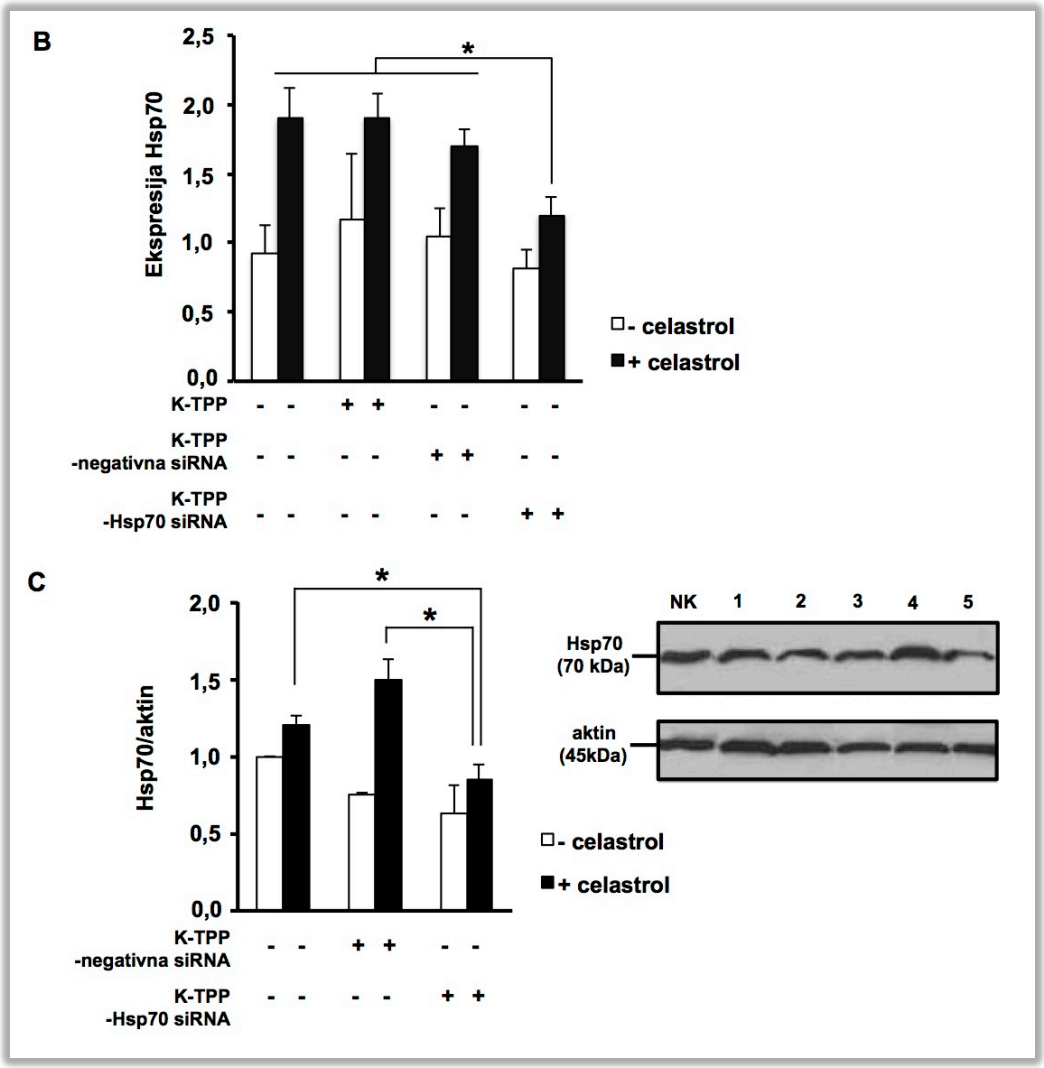
Proveden je tretman toplinskim stresom na način da su U251N stanice izložene temperaturi od 43°C tijekom 30 minuta, u kompletnom hranidbenom mediju, nakon čega su bez promjene medija prenesene u uvjete temperature 37°C tijekom narednih 24 sata. Tretman celastrolom proveden je tijekom 24 sata u kompletnom hranidbenom mediju. *Slika 3.23. A* prikazuje reprezentativne mikroskopske slike tretmana kao rezultat imunocitokemijske analize. Može se uočiti da je inducibilni Hsp70 u U251N stanicama prisutan i u fiziološkim uvjetima i da je protein lokaliziran primarno u citoplazmi. Tretman bilo toplinskim stresom bilo celastrolom dovodi do značajnog ($p<0,01$) povećanja ekspresije inducibilnog Hsp70 (*slika 3.23. B*). Celastrol (1 μM) izaziva usporediv porast u ekspresiji Hsp70 s onim vidljivim nakon toplinskog stresa.



Slika 3.23. A) *U251N stanice 24 sata nakon toplinskog stresa ili izlaganja celastrolu (1 µM). Prvi stupac (s lijeva na desno) prikazuje jezgre stanica (plavo obojenje uslijed vezanja boje Hoechst 33342), drugi stupac prikazuje ekspresiju inducibilnog Hsp70 (zeleno obojenje uslijed vezanja protutijela obilježenog fluorescentnom bojom AlexaFluor488). Treći stupac prikazuje položaj Hsp70 u stanicama u odnosu na jezgre;* ***B)*** *Kvantifikacija signala koji označava ekspresiju Hsp70 (** označava p<0,01 u odnosu na negativnu kontrolu, NK).*

Kada je analiza ekspresije Hsp70 provedena nakon tretmana celastrolom kombiniranog s utišavanjem gena *hsp70* pomoću K-TPP-Hsp70 siRNA nanočestica na način da su U251N stanice tretirane istovremeno celastrolom (1μM) i K-TPP-Hsp70 siRNA (100 nM) nanočesticama tijekom 24 sata, rezultati su pokazali značajno smanjenje ekspresije Hsp70 u ovom tretmanu u odnosu na odgovarajuće kontrole, prvenstveno u odnosu na tretman celastrolom. *Slika 3.24. A* prikazuje reprezentativne mikroskopske slike U251N stanica podvrgnutih tretmanima celastrolom i/ili K-TPP nanočesticama s ili bez uklopljene siRNA (negativna ili Hsp70). *Slika 3.24. B* prikazuje brojčane vrijednosti fluorescentnog signala izmjerene pomoću programa Image J izražene kao omjer prema izmjerenim vrijednostima u uzorku netretiranih stanica. Između kombiniranog tretmana celastrolom i K-TPP-Hsp70 siRNA nanočesticama uočena je statistički značajna razlika ($p<0,05$) u odnosu na kombinirani tretman celastrolom i K-TPP-negativna siRNA nanočesticama, te u odnosu na tretman celastrolom. *Slika 3.24. C* prikazuje rezultate western analize provedene nakon identičnih tretmana u U251N stanicama kao potvrdu rezultata dobivenih imunocitokemijskom analizom.


A
fazno kontrastno polje
Hoechst 33342
Hsp70
položaj Hsp70 u stanici u odnosu na jezgre
20 µm
NK
K-TPP
K-TPP -negativna siRNA
K-TPP -Hsp70 siRNA
celastrol
+ celastrol
K-TPP
K-TPP -negativna siRNA
K-TPP -Hsp70 siRNA



Slika 3.24. *A (← prethodna stranica) U251N stanice 24 sata nakon istovremenog izlaganja stanica celastrolu (1 μM) i nanočesticama s uklopljenom Hsp70 siRNA. Prvi stupac (s lijeva na desno) prikazuje izgled stanica vidljiv fazno kontrastnim objektivom, drugi stupac prikazuje jezgre stanica, treći stupac prikazuje ekspresiju Hsp70, a četvrti stupac prikazuje položaj Hsp70 u stanicama u odnosu na jezgre;* ***B)*** *Kvantitativne vrijednosti signala koji označava ekspresiju Hsp70 izražene kao omjer prema vrijednostima u negativnoj kontroli (prvi stupac s lijeva na desno). Prikazane su srednje vrijednosti kvantificiranog signala ± SD dobivene u 3 neovisna pokusa;* ***C)*** *Rezultati imunoblot analize ekspresije Hsp70 (NK-negativna kontrola, 1-K-TPP-negativna siRNA, 2-K-TPP-Hsp70 siRNA, 3-celastrol, 4-K-TPP-negativna siRNA+celastrol, 5-K-TPP-Hsp70 siRNA+celastrol; ** označava p<0,01).*

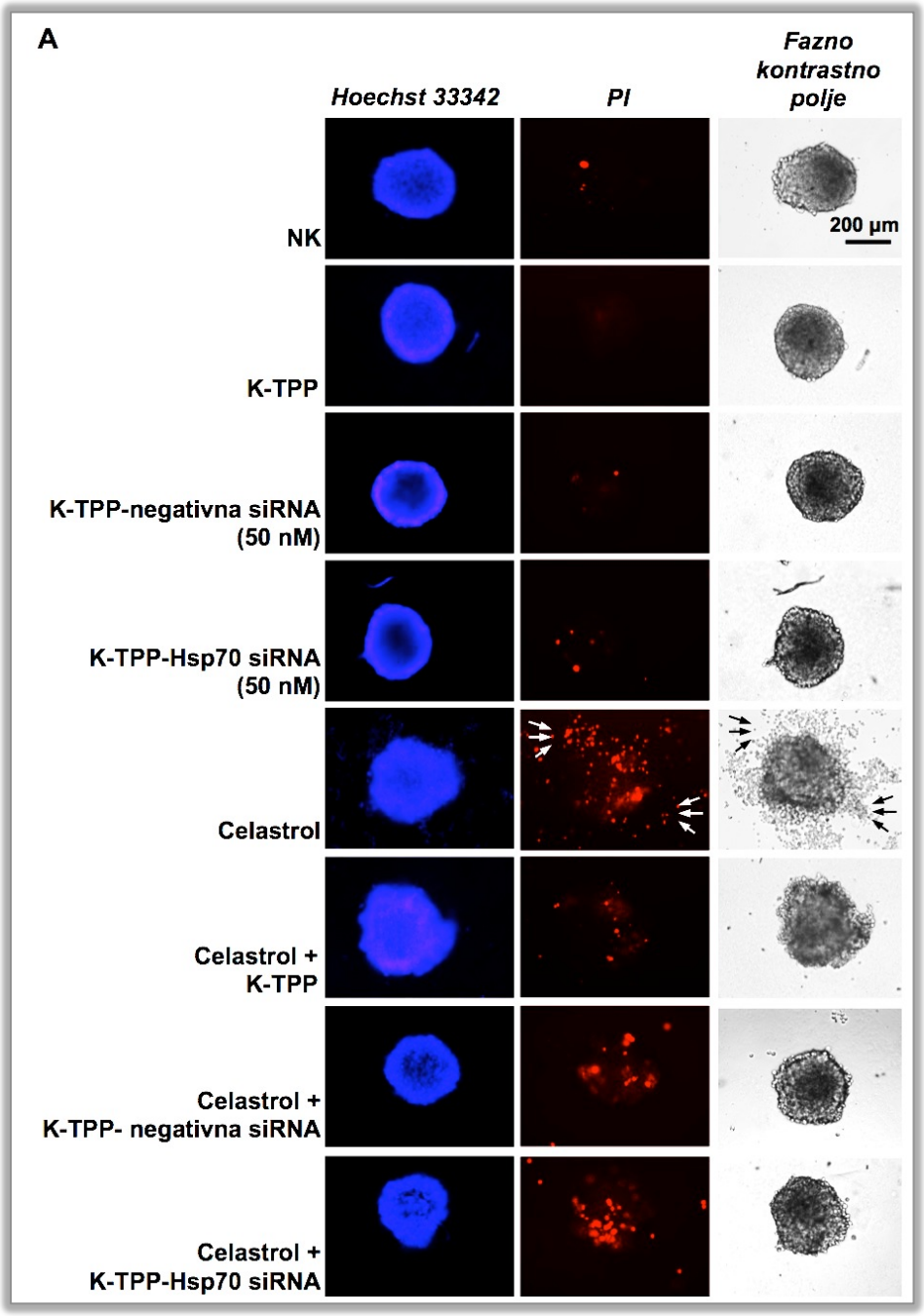
3.5.4. Učinak inhibicije Hsp70 i Hsp90 u tumorskim sferoidima

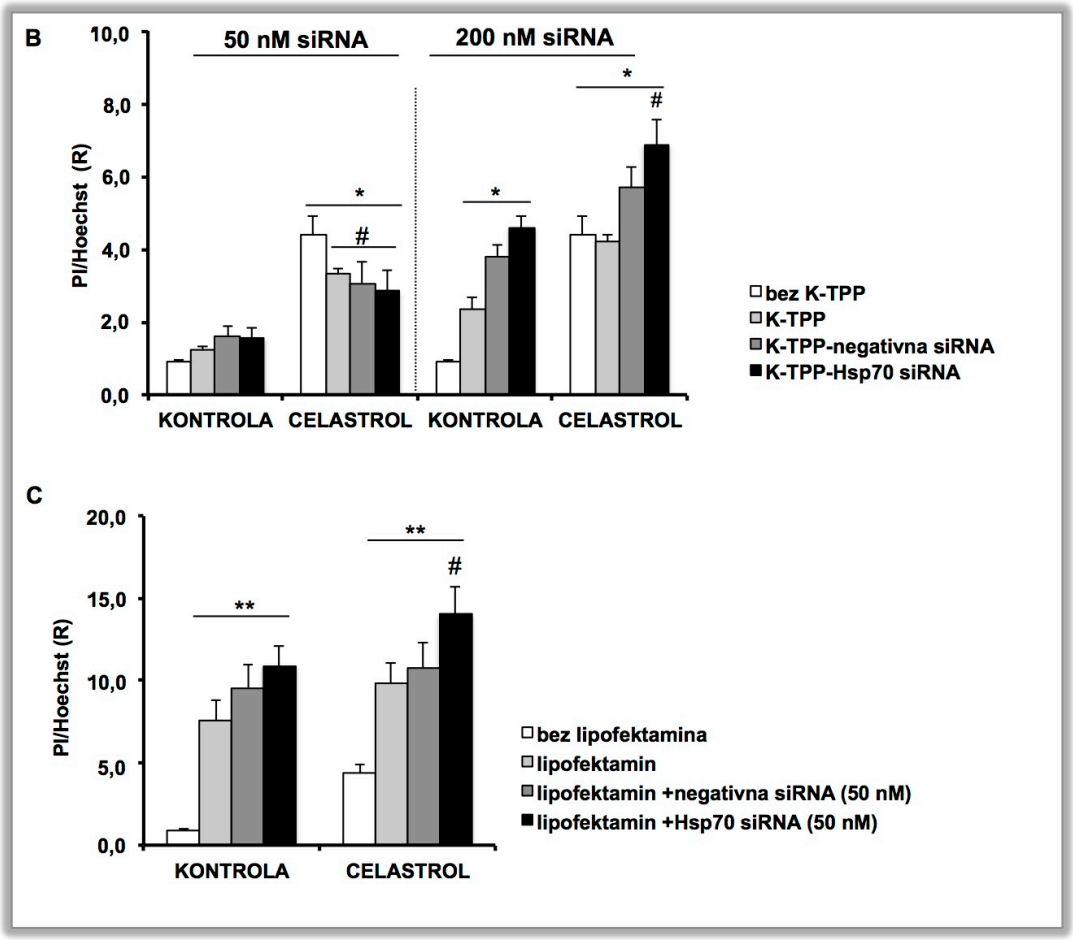
Dostupnost citotoksičnih spojeva usmjerenih na tumore može biti ograničena uslijed hipoksije i slabe vaskularizacije tumorskih tkiva. Kako proteinska ekspresija i uzorci rasta u tumorskim sferoidima podsjećaju na one u tumorima *in vivo* nadalje je u ovom istraživanju ispitana učinkovitost kombinirane antitumorske terapije na tumorskim sferoidima pripremljenim od U251N stanica. *Slika 3.25. A* prikazuje rezultate tretmana provedenih na U251N sferoidima. U251N sferoidi imali su veličinu od 400 μm u promjeru nakon 4 dana rasta u uvjetima staničnih kultura (37ºC, 95% vlažnosti, 5% CO_2; hranidbeni medij obogaćen 10%-tnim FBS-om i 1%-tnim PS-om). Nakon tretmana celastrolom (≥2,5 μM) tijekom 48 sati, došlo je do smanjenja promjera sferoida. Mrtve stanice koje su se pri tome pojavile mogle su se primijetiti kao stanice koje su se odvojile od strukture sferoida. U251N sferoidi ostajali su nepromijenjeni nakon istovremenog izlaganja nanočesticama s uklopljenom Hsp70 siRNA i celastrolu. Kako bi se odredio udio stanične smrti u U251N sferoidima sferoidi su nakon tretmana izloženi otopini propidij jodida (PI) i Hoechst-a 33342. Nakon analize pomoću fluorescentnog mikroskopa te programa Image J određeni su intenziteti fluorescencija ovih dviju boja te je njihov brojčani omjer (R) postavljen kao vrijednost 1 u negativnoj kontroli (U251N sferoidi koji su tijekom tretmana rasli u DMEM mediju obogaćenom 10% FBS-om i 1% PS-om). Ukratko, povišenje PI/Hoechst omjera u odnosu na relevantnu kontrolu označavalo je porast udjela mrtvih stanica zbog porasti vrijednosti intenziteta PI boje koja prodire u stanice s oštećenim membranama. PI/Hoechst omjer značajno je bio povišen kod tretmana U251N sferoida celastrolom (2,5 μM; $R=4,4\pm0,5$, $p<0,05$) u odnosu na negativnu kontrolu (*slika 3.25. B*), dok utišavanje Hsp70 pomoću Hsp70 sljedno-specifične siRNA (50 nM) uklopljene u kitozanske nanočestice nije dovelo do povišenja PI/Hoechst omjera odnosno smanjenja stanične vijabilnosti tumorskih sferoida nakon 48 sati. Kod istovremenog izlaganja tumorskih sferoida nanočesticama s uklopljenom Hsp70 siRNA (50 nM) i celastrolu (2,5 μM) također nije došlo do porasta PI/Hoechst omjera. Naprotiv, PI/Hoechst omjer bio je značajno smanjen ($R=2,8\pm0,5$, $p<0,05$) u odnosu na zasebne tretmane.

Na U251N sferoidima nisu mogli biti ponovljeni jednaki učinci kombiniranog tretmana s kitozanskim nanočesticama s Hsp70 siRNA u koncentraciji od 50 nM koji su uočeni u U251N stanicama uzgojenim u jednom sloju. Zbog kompleksnih interakcija u trodimenzionalnoj strukturi otežan je ulazak kako celastrola tako i K-TPP nanočestica dublje u strukturu tumorskih sferoida i stoga je potrebno koristiti veće doze istih tretmana kako bi se u sferoidima reproduciralo smanjenje vijabilnosti uzrokovano istovremenom inhibicijom Hsp90 i Hsp70.

Vijabilnost U251N sferoida bila je značajno smanjena ($R=6,9\pm0,6$, $p<0,05$) kad je tretman celastrolom kombiniran s tretmanom K-TPP-Hsp70 siRNA nanočesticama s 4x većom koncentracijom siRNA (200 nM; *slika 3.25. B*). No, kod ovih koncentracija siRNA i K-TPP nanočestice bile su značajno toksične ($R=3,6\pm1,1$). Za usporedbu proveden je tretman s lipidnim sustavom za dostavu siRNA, lipofektaminom 2000, te je uočeno da Hsp70 siRNA unesena u tumorske sferoide na ovaj način također pridonosi povišenju udjela stanične smrti uzrokovane celastrolom (*slika 3.25. C*). Tretman lipofektamin 2000 zasebno bio je značajno toksičniji od tretmana K-TPP nanočesticama ($R=3,6\pm1,1$ kod tretmana K-TPP nanočesticama, $R=9,4\pm1,7$ kod tretmana sa lipofektaminom 2000, $p<0,01$).

Navedeni rezultati pokazuju kako istovremena inhibicija aktivnosti Hsp90 i sniženje ekspresije Hsp70 pomoću sljedno-specifične siRNA dostavljene uz upotrebu kitozanskih nanočestica, uz odgovarajuće koncentracije celastrola i siRNA, značajno pridonosi smanjenju vijabilnosti trodimenzionalnih modela tumora *in vitro*.


A
Hoechst 33342
PI
Fazno kontrastno polje
200 µm
NK
K-TPP
K-TPP-negativna siRNA (50 nM)
K-TPP-Hsp70 siRNA (50 nM)
Celastrol
Celastrol + K-TPP
Celastrol + K-TPP- negativna siRNA
Celastrol + K-TPP-Hsp70 siRNA



Slika 3.25. *U251N sferoidi nakon istovremenog izlaganja kitozanskim nanočesticama s uklopljenom Hsp70 siRNA i celastrolu (2,5 μM) u trajanju od 48 sati.* ***A*** *(na prethodnoj stranici) prikazuje reprezentativne mikroskopske slike U251N sferoida tretiranih kako je to prikazano u opisu s lijeve strane slike. Strelice upućuju na odvajanje mrtvih stanica od strukture sferoida. Ordinate u* ***B*** *i* ***C*** *pokazuju PI/Hoechst 33342 omjer (R). Srednje vrijednosti R±SEM izražene su u odnosu na R u negativnoj kontroli (n=12; */** označava p<0,05/p<0,01 u odnosu na negativnu kontrolu, NK; #/## označava p<0,05/p<0,01 u odnosu na tretman celastrolom).*

4. RASPRAVA

HSP-ovi pripadaju skupini unutarstaničnih proteina koji su eksprimirani konstitutivno te kao odgovor na fizikalni odnosno biološki stres. U staničnom odgovoru na stres HSP imaju prvenstveno citoprotektivnu ulogu koja se temelji na njihovoj šaperonskoj sposobnosti tj. stabiliziranju proteina i peptida, čime promoviraju preživljenje stanice. Promocija staničnoga preživljenja usko je povezana s inhibitornim djelovanjem HSP-a na programiranu staničnu smrt, apoptozu, ali i s osiguravanjem pravilno strukturiranih proteina odgovornih za proliferaciju stanica. Smatra se da je upravo sposobnost stresnih proteina da zaustave proces programirane stanične smrti njihova poveznica s malignom transformacijom stanica (Calderwood i sur., 2006).

Brojna istraživanja pokazala su da je povećana ekspresija različitih članova porodice HSP-a u stanicama i serumu bolesnika s malignim tumorima odgovorna za slabu učinkovitost terapije te lošu prognozu (Calderwood i sur., 2006; Ciocca i Calderwood, 2005). Tako primjerice, u bolesnika s najčešćom vrstom malignog tumora na mozgu, multiformnim glioblastomom, jedna od najvećih prepreka učinkovitosti postoperativnog liječenja bilo radioterapijom bilo kemoterapijom jest povišena koncentracija stresnih proteina. U uzgojenim tumorskim stanicama izvedenim iz ljudskih glioma i glioblastoma *in vitro* nađene su povišene koncentracije HSP-a u odnosu na netransformirane stanice mozga (Graner i sur., 2007). To i ne čudi s obzirom na činjenicu da je ovaj vrlo agresivni oblik tumora okružen okolinom u kojoj vlada hipoksija, ubrzana proliferacija, ubrzani metabolizam, genetičke nestabilnost stanica zbog neprestanih dioba, a to su sve redom uvjeti koji potiču ekspresiju HSP-a. U mnogim drugim vrstama tumora također je nađena povećana ekspresija raznih članova porodice HSP-a. Određeni HSP-ovi upleteni su u prognozu određene vrste tumora, poput Hsp27 čija je povećana ekspresija povezana s lošom prognozom liječenja karcinoma želuca, karcinoma prostate te osteokarcinoma. Povećana ekspresija Hsp70 korelirana je i s lošom prognozom liječenja karcinoma dojke, karcinoma endometrija, karcinoma maternice i grlića maternice te karcinoma mjehura (Ciocca i Calderwood, 2005).

Ekspresija stresnih proteina može se dovesti u izravnu vezu sa svim glavnim obilježjima tumora koje su predložili Hanahan i suradnici (2000; 2011). Stalna proliferacija tumorskih stanica je glavno obilježje tumorskog tkiva po kojem se ono razlikuje od zdravog tkiva u kojem postoji stroga kontrola staničnih dioba. Stalna proliferacija u tumorskim stanicama osigurana je prisutnim faktorima rasta koji omogućavaju sintezu novih proteina u stanici. Glavni protein iz porodice HSP-a odgovoran za postojanu i funkcionalnu konformaciju signalnih proteina čija je aktivnost potaknuta vezanjem faktora rasta jest Hsp90. Hsp90 se stoga može smatrati odgovornim za brzu i učinkovitu proliferaciju tumorskih stanica. Za

razliku od Hsp90, Hsp27 i Hsp70 su odgovorni za sposobnost stanica da odolijevaju programiranoj staničnoj smrti (Kroemer i sur., 2009; Calderwood i sur., 2006). Osim toga, HSP-ovi igraju važnu ulogu u angiogenezi čime pridonose razvoju tumorskog tkiva. HSP-ovi naime omogućuju proteinsku stabilnost primarnog senzora za hipoksiju u tumorskom tkivu, transkripcijskog faktora HIF1α (od *engl.* hypoxia-inducible factor 1α; Zhou i sur., 2004), čija aktivnost osigurava stvaranje novih krvnih žila. Invazija i sposobnost tumorskog metastaziranja u druga tkiva također je povezana s povećanom ekspresijom HSP-ova i HSF1.

Svrha ovog istraživanja bila je procijeniti ulogu inducibilnog Hsp70 u zaštiti od programirane stanične smrti u tumorskim stanicama *in vitro*. Za utišavanje Hsp70 korištena je nova tehnologija koja počiva na endogenom mehanizmu RNA interferencije. Za unošenje siRNA u tumorske stanice *in vitro* korišten je nanoterapijski sustav pripremljen od polimera kitozana. Kako bi se istražila mogućnost poticanja smrti malignih stanica djelovanjem na više biokemijskih puteva korišten je pristup simultane inhibicije Hsp70 pomoću siRNA dostavljene u kitozanskim nanočesticama i inhibicije Hsp90 pomoću celastrola, spoja s poznatim djelovanjem u razaranju interakcija između Hsp90 i njegovih ko-šaperona. Simultana inhibicija Hsp70 i Hsp90 ispitana je i na trodimenzionalnim tumorskim modelima *in vitro*, odnosno na tumorskim sferoidima, kako bi se razmotrila mogućnost ispitivanja ove antitumorske terapije *in vivo* na kompleksnijim modelima tumora, odnosno na životinjskim modelima.

4.1. ULOGA POVIŠENE EKSPRESIJE INDUCIBILNOG Hsp70 U ZAŠTITI OD PROGRAMIRANE STANIČNE SMRTI

4.1.1. Ekspresija inducibilnog Hsp70 u tumorskim stanicama u fiziološkim i stresnim uvjetima

Veliki broj eksperimentalnih dokaza pokazao je da je upravo inducibilni oblik Hsp70 iznimno važan za preživljenje tumorskih stanica i tkiva. U mnogim malignim tumorima pokazana je prekomjerna ekspresija ovog proteina (Kerr i sur., 1972; Mosser i Morimoto, 2004; Jäättelä, 1999b) koja je povezana s povećanom staničnom proliferacijom, slabom diferencijacijom stanica, metastazama u limfne čvorove i lošom terapijskom prognozom. U modelu malignih stanica korištenih u ovom istraživanju, staničnoj liniji izvedenoj iz humane akutne T stanične leukemije, Jurkat, pokazana je prisutnost inducibilnog oblika Hsp70, kao i ekspresija mRNA za inducibilni Hsp70. Ustanovljeno je da se u Jurkat stanicama u ukupnoj količini staničnih proteina od 1 μg nalazi 0,015 ng inducibilnog Hsp70, na osnovu čega je pretpostavljena važna uloga ovog proteina u održavanju staničnih funkcija ovog tumorskog staničnog modela.

Dodatno, poticanje ekspresije inducibilnog Hsp70 izazvano je izlaganjem Jurkat stanica toplinskom stresu. Poznato je da visoke temperature predstavljaju stres za stanicu i da većina stanica na njih reagira povećanjem ekspresije šaperona kroz aktivnost HSE-a (Sorger, 1991). Jurkat stanice korištene u ovom istraživanju također su pokazale tipičan odgovor na toplinski stres u obliku trenutne i izuzetno visoke ekspresije inducibilnog Hsp70. Naime, ekspresija Hsp70 bila je i do 13 puta povećana nakon toplinskog stresa u odnosu na ekspresiju u fiziološkim uvjetima. Odgovor na toplinski stres u obliku povećane ekspresije Hsp70 za Jurkat stanice vjerojatno predstavlja mehanizam prilagodbe na novonastale uvjete u okolini. Moguće je da se isti mehanizam prilagodbe odvija i u tumorskim tkivima gdje su stanice izložene neprestanom stresu zbog unutar-tumorske hipoksije i nedostatka nutrijenata.

4.1.2. Uloga Hsp70 u zaštiti od stanične smrti izazvane staurosporinom

Staurosporin, alkaloid izoliran iz *Streptomyces sp*., sprječava vezanje ATP-a za stanične proteinske kinaze čime dovodi do njihove inhibicije (Ouyang i sur., 2012; Tamaoki i Nakano, 1990; Kroemer i sur., 2009). Kako bi se ispitala uloga inducibilnog Hsp70 u zaštiti od programirane stanične smrti izazvane staurosporinom, Jurkat stanice su najprije izložene toplinskom stresu, a potom djelovanju staurosporina. Povećanje ekspresije inducibilnog

Hsp70 nakon toplinskog stresa dogodilo se kao posljedica aktivnosti HSF1 (Sorger, 1991). Izlaganje stanica staurosporinu nekoliko sati nakon toplinskog stresa nije utjecalo na promjenu ekspresije inducibilnog Hsp70. Ekspresija inducibilnog Hsp70 potaknuta toplinskim stresom mogla je stoga poslužiti kao model prekomjerne ekspresije Hsp70 jer staurosporin nije uzrokovao razgradnju inudcibilnog Hsp70 kada je protein već bio sintetiziran. Naprotiv, kod izlaganja Jurkat stanica staurosporinu odmah nakon toplinskog stresa ekspresija Hsp70 bila je spriječena. To je bilo i očekivano s obzirom na to da staurosporin sprječava aktivnost proteinskih kinaza. Naime, poznato je da se aktivnost transkripcijskog faktora HSF1 osigurava kroz fosforilaciju ovog proteina te da je vezanje fosfatnih skupina osigurano aktivnošću proteinskih kinaza. Staurosporin inhibira aktivnost proteinskih kinaza pa prema tome i aktivnost HSF1. Logično je stoga da tretman staurosporinom odmah nakon toplinskog stresa sprječava aktivaciju HSF1, a time i induciranje ekspresije Hsp70.

Povišena ekspresija inducibilnog Hsp70 uočena je u Jurkat stanicama nekoliko sati nakon toplinskog stresa. U vremenskim točkama kod kojih je izmjerena povišena ekspresija Hsp70 stanice su izložene tretmanu sturosporinom. Ispitivana je uloga inducibilnog Hsp70 na staničnu smrt potaknutu staurosporinom. Iz ranijih istraživanja na stanicama melanoma poznato je da staurosporin potiče aktivnost proteina Bax, a time i apoptozu posredovanu promjenama u mitohondrijskoj membrani, popraćenu otpuštanjem citokroma c u citosol te aktivacijom izvršnih kaspaza. Također je uočeno da staurosporin inducira i apoptozu neovisnu o aktivnosti kaspaza koja se ne može spriječiti istovremenim tretmanom s inhibitorima kaspaza (Zhang i sur., 2004). Nadalje, u ljudskim stanicama leukemije, U-937, pokazano je da staurosporin pri koncentraciji 1 μM potiče apoptozu te da istovremeno dolazi do snižavanja ekspresije fosforiliranog oblika Erk i Akt proteina. Ova činjenica govori u prilog tome da osim promoviranja apoptoze staurosporin ima i inhibitornu aktivnost na proliferativne stanične putove u koje su ovi proteini uključeni (Plati i sur., 2011; Antonsson i Persson, 2009).

U istraživanju opisanom u ovoj disertaciji izlaganje Jurkat stanica staurosporinu izazvalo je aktivaciju apoptoze posredovane mitohondrijima te ovisne o kaspazma. Zabilježeno je i oslobađanje citokroma c iz mitohondrija u citosol te izravna aktivacija krajnje izvršne kaspaze, kaspaze 3.

Literaturni podaci ukazuju da inducibilni Hsp70 sprječava programiranu staničnu smrt, kako onu ovisnu o kaspazama tako i staničnu smrt neovisnu o kaspazama (Creagh i sur., 2000). U ovom istraživanju pokazano je da povećana koncentracija inducibilnog Hsp70,

izazvana toplinskim stresom, nije spriječila programiranu staničnu smrt izazvanu staurosporinom koja je bila posredovana promjenama u membrani mitohondrija i aktivacijom izvršne kaspaze 3. Međutim, utvrđeno je da toplinskim stresom izazvana ekspresija inducibilnog Hsp70 ipak osigurava određenu zaštitu od stanične smrti potaknute staurosporinom. Udio vijabilnih stanica bio je značajno povećan u slučajevima kad je izlaganju stanica staurosporinu prethodio toplinski stres s određenim vremenom oporavka (4, 8 ili 12 sati). U tim je eksperimentalnim uvjetima utvrđeno također da nije došlo do značajnijih promjena u broju apoptotičnih stanica. To bi sugeriralo da se zaštitna uloga Hsp70 u sprječavanju stanične smrti ne odnosi nužno na apoptozu ovisnu o aktivnosti kaspaza i/ili o promjenama u mitohonodrijskim membranama, nego da Hsp70 ima ulogu i u zaštiti od drugih oblika stanične smrti.

Creagh i suradnici (2000) pokazali su da inducibilni oblik Hsp70 ima ulogu u zaštiti od apoptoze posredovane kaspazama i apoptoze neovisne o kaspazama ukoliko je apoptoza potaknuta tretmanom s vodikovim peroksidom. U istraživanju opisanom u ovoj disertaciji za poticanje apoptoze korišten je staurosporin. Vodikov peroksid uzrokuje oksidativni stres u stanici, dok staurosporin sprječava aktivnost proteinskih kinaza. Moguće je dakle da je staurosporin uzrokovao oblik stanične smrti neovisan o apoptozi. S obzirom na određenu aktivnost inducibilnog Hsp70 u zaštiti od stanične smrti potaknute staurosporinom u Jurkat stanicama može se pretpostaviti uključenost Hsp70 u zaštitu i od drugih oblika stanične smrti osim apoptoze u ovom *in vitro* modelu tumora. Novija istraživanja pokazala su uključenost inducibilnog Hsp70 u još jedan oblik staničnog kataboličkog događaja koji može završiti smrću stanice nazvan autofagija. Ustanovljena je zaštitna uloga inducibilnog Hsp70 u stabilizaciji membrane lizosoma, staničnih organela potrebnih u nastanku autofagosoma posrednika autofagije pa prema tome i zaštitna uloga Hsp70 u staničnoj smrti koja može biti potaknuta uslijed nestabilnosti lizosoma (Cory i Adams, 2002; Kirkegaard i sur., 2010; Ryhänen i sur., 2009). Literaturni podaci ukazuju da staurosporin uzrokuje smrt stanice posredovanu autofagijom ukoliko je blokirana apoptoza u fibroblastima iz mišjeg embrija (Tsujimoto i Shimizu, 2005). Hsp70 dakle igra zaštitnu ulogu u sprječavanju raznih oblika stanične smrti.

4.2. RNA INTERFERENCIJA I ANTITUMORSKI TERAPEUTICI

4.2.1. Terapeutici temeljeni na RNA interferenciji

Mehanizam RNA interferencije predstavlja snažan biološki alat za upravljanje genskom ekspresijom. Sposobnost molekula siRNA da se vežu na ciljnu mRNA i inhibiraju njeno prevođenje u protein predstavlja veliki potencijal ovih molekula u dizajniranju novih terapeutika usmjerenih prema liječenju različitih bolesti kojima je podloga promijenjena genska ekspresija. Do 2011. godine više od 20 terapeutika temeljenih na RNAi ušlo je u pred-kliničku ili kliničku fazu ispitivanja učinkovitosti za liječenje raznih bolesti poput degenerativnih promjena retine oka, dominantno nasljednih bolesti mozga i kože, virusnih infekcija, bolesti dišnog sustava, raznih vrsta karcinoma i metaboličkih poremećaja. Ukupno 8 terapeutika trenutno je u aktivnim fazama kliničkog ispitivanja na bolesnicima za liječenje različitih oblika karcinoma (*tablica 4.1.;* Davidson i McCray, 2011*)*.

Tablica 4.1. *RNAi terapeutici u kliničkom ispitivanju učinkovitosti u liječenju različitih vrsta karcinoma. Preuzeto i prilagođeno iz Davidson i McCray, 2011.*

Terapeutik	***Oblik karcinoma***	***Ciljni gen***	***Klinički status***
CEQ508	familijarna adenomatozna polipoza, karcinom debelog crijeva	β-katenin	aktivna faza I
ALN-PLK1	karcinom jetre	PLK1	aktivna faza I
FANG	solidni tumori	furin	aktivna faza II
CALAA-01	solidni tumori	RRM2	aktivna faza I
SPC2996	kronična mijeloidna leukemija	Bcl-2	u tijeku faze I i II
ALN-VSP02	karcinom jetre, solidni tumori	KSP i VEGF	aktivna faza I
NCT00672542	melanom	LMP2, LMP7 i MECL1	aktivna faza I
Atu027	razne malignosti	PKN3	aktivna faza I

Poput brojnih drugih terapeutika, terapeutici temeljeni na RNAi za postizanje biološkog učinka utišavanja gena trebaju odgovarajući sustav za dostavu u stanice. Stoga je i klinički napredak terapeutika temeljenih na RNAi ovisan o razvoju sustava za dostavu siRNA u stanice. Istraživanja u području RNAi prvenstveno su usmjerena k povećavanju specifičnosti sustava za dostavu siRNA, umanjivanju toksičnosti i nespecifičnosti (*engl*. "off-target") ovih sustava te sprječavanju preuranjene razgradnje uslijed sistemske primjene.

Prvi pokušaji kliničke primjene RNAi bili su temeljeni na upotrebi "golih" siRNA. Kada je siRNA u ovom obliku bila injektirana u sistemsku cirkulaciju, bila bi, u velikom udjelu, razgrađena djelovanjem proteina seruma, a onaj udio siRNA molekula koji je i ostajao cjelovit i funkcionalan u kratkom vremenu bi bio lokaliziran u bubrezima. Lokalizacija "gole" siRNA u bubrezima smatra se povoljnom u slučaju liječenja bubrežnih bolesti, ali ne i u slučaju liječenja bolesti koje se razvijaju u drugim organima. Ubrzo potom, dizajnirani su polimerni sustavi za ciljanu dostavu siRNA u organizmu. Jedan od takvih sustava, iznimnog potencijala u liječenju brojnih oblika tumora je i CALAA-01 kojeg je razvila Calando Pharmaceuticals (Pasadena, California, SAD). CALAA-01 je klinički naziv sustava kojeg čine nanočestice građene od polimera ciklodekstrina, obavijene polimerom PEG (od *engl*. polyehtylene glycol) i protutijelom za ljudski transferin te uklopljene siRNA usmjerene prema genu za M2 podjedinicu ribonukleotid reduktaze, RRM2 (Davis, 2009). PEG omogućava stabilizaciju površine ciklodekstrinskih nanočestica, protutijela za transferin omogućavaju ciljnu dostavu nanosustva u tumorska tkiva vezanjem za receptor za transferin koji je u povećanoj količini izražen na stanicama različitih vrsta tumora, a RRM2 siRNA utišavanje proteina odogovornog za M2 podjedinicu ribonukleotid reduktaze. Ribounukleotid reduktaza je enzim koji katalizira pretvorbu ribonukleozid 5'-difosfata u odgovarajuće 2'-deoksiribonukleotide te je njena aktivnost time ograničavajući faktor u proizvodnji 2'-deoksiribonukleozid 5'-trifosfata potrebnih kod replikacije DNA i tumorskih i ne-malignih stanica. Biokompatibilnost i imunotolerancija za CALAA-01 je najprije uspješno pokazana na majmunima (Heidel i sur., 2007), a zatim je uspješnost u utišavanju RRM2 i sprječavanju rasta tumora pokazana u biopsijama ljudskih melanoma (Davis i sur., 2010). Uspješnost ispitivanja na majmunima i ljudskim tumorskim tkivima *in vitro* dovela je i do početka faze I kliničkih ispitivanja ovog terapeutika, koja se trenutno odvija.

Klinička uspješnost CALAA-01 potaknula je razvoj i brojnih drugih sustava temeljenih na upotrebi sintetskih polimera. Uspješnost micelarnih formulacija građenih od ko-polimera PEG-b-PLL (od *engl*. polyethylene glycol-block-poly-L-lysine) u dostavi VEGF siRNA i sprječavanju daljnjeg rasta tumorskog tkiva pokazana je u *in vivo* mišjim modelima HeLa

tumora (Christie i sur., 2012). Potraga za idealnim sustavom za dostavu siRNA na ciljano mjesto u organizmu dovela je i do ideje o upotrebi sintetskih dendrimera poput PAMAM (od *engl*. poly-amdio amine) za dostavu siRNA. Felber i suradnici (Felber i sur., 2011) dizajnirali su sustav za dostavu siRNA od PAMAM-a i PEG-b-P(PrMA-co-MAA) (od *engl*. poly(ethylene glycol)-b-poly(propyl methacrylate-co-methacrylic acid) kompleksiranih s protutijelom za transferin. Ovaj sustav pokazao se uspješnim u *in vitro* modelima tumora u smislu dostave siRNA i učinkovitosti utišavanja gena, no ispitivanja učinkovitosti i tolerancije ovih sustava *in vivo* na životinjskim modelima tek trebaju uslijediti.

U novije vrijeme tehnologija dizajniranja sustava za unos male siRNA u stanice ipak se sve više usmjerava prema ne-štetnim, ne-imunomodulatornim i u prirodi dostupnim materijalima. Polimeri poput kitozana i atelokolagena primjeri su takvih polimera koji su izazvali veliki interes kao mogući sustavi za netoksičnu dostavu siRNA koja ne izaziva imunosni odgovor *in vitro* i *in vivo*. U istraživanju opisanom u ovom radu korišten je upravo jedan od takvih polimera, kitozan.

4.2.2. Fizikalna svojstva kitozanskih nanočestica

Kitozan, polimer adhezivnih svojstava, pokazao se iznimno pogodnim za neparenteralnu odnosno oralnu, pulmonarnu i nazalnu primjenu (de Jesús Valle i sur., 2008). Učinjene su i mnogobrojne modifikacije ovog polimera kako bi se povećala njegova učinkovitost u dostavi siRNA i smanjila toksičnost. Vezanje folata na kitozan (Fernandes i sur., 2012) te kompleksiranje kitozana s nanočesticama od zlata (Han i sur., 2012) samo su neki od primjera modifikacija i različitih pristupa upotrebe kitozana u biološkim sustavima. Nanočestice pripremljene od kitozana i TPP-a, kao jedan od mnogobrojnih pristupa u modifikaciji kitozana, pokazali su iznimnu učinkovitost transfekcije nakon primjene *in vitro* (Placzek i sur., 2010; Csaba i sur., 2009; Katas i Alpar, 2006; Malmo i sur., 2012).

Kitozanske nanočestice korištene za dostavu siRNA u tumorske stanice u ovom istraživanju pripremljene su prema modificiranoj metodi ionotropnog geliranja kitozana TPP-om (Katas i Alpar, 2006). Katas i suradnici (2006) pokazali su da metoda pripreme kitozanskih sustava bitno utječe na veličinu dobivenih čestica kao i učinkovitost utišavanja gena. U dvije stanične linije, CHO K1 (od *engl*. chinese hamster ovary) i HEK 293 (od *engl*. human embrionic kidney), učinkovitije utišavanje (do 80%) gena za luciferazu pGL3 postignuto je uz upotrebu glutamat-kitozana u metodi ionotropnog geliranja TPP-om u odnosu na metodu u kojoj je provedena adsorpcija siRNA na kitozanske nanočestice i/ili u odnosu na upotrebu hidroklorid-kitozana. U istraživanju opisanom u ovom radu, metoda

ionotropnog geliranja glutamat-kitozana TPP-om korištena je za pripremu sustava za dostavu Hsp70 sljedno-specifične siRNA. Veličina pripremljenih kitozanskih nanočestica s uklopljenom siRNA bila je usporediva s veličinama nanočestica prikazanim u rezultatima istraživanja koje su proveli Katas i suradnici (2006) i iznosila je oko 200 nm. Zeta potencijal kitozanskih nanočestica bio je pozitivan i iznosio je oko +30 mV u pH 4,5 te oko +20 mV u pH 7,2. Veličina, oblik i površinski naboj nanočestica igraju važnu ulogu u prijenosu siRNA do stanica te posebno u distribuciji nanočestica u organizmu. Pokazano je da čestice nanoveličina mogu učinkovito ulaziti u stanice procesom endocitoze (Jones i sur., 2003) te da nanoveličina omogućuje pasivno usmjeravanje nanočestica prema tumorskim tkivima na osnovu povećane propusnosti krvnih žila tumorskih tkiva (EPR, od *engl*. enhanced peremability effect). Endocitoza je proces u kojem se makromolekule ili nanočestice prenose u unutrašnjost stanice stvaranjem mjehurića obavijenih plazmatskom membranom i njihovom internalizacijom. U unutrašnjosti stanice, endosomi se stapaju s enzimima bogatim lizosomima te se u njima događa konačno oslobađanje siRNA iz nanočestica. RNAi mehanizam započinje vezanjem oslobođene siRNA za ciljnu mRNA u citoplazmi stanice. Jasno je stoga da osim veličine nanočestice upotrijebljene za dostavu siRNA u stanice moraju imati takva svojstva koja ima omogućuju stabilnost u endosomalnom pH-u te nestabilnost u lizosomalnom pH-u kako bi siRNA mogla biti oslobođena iz lizosoma uslijed razgradnje nanočestica (Kwon, 2012). Pozitivan površinski naboj kitozanskih nanočestica pripremljenih u okviru ovog doktorskog rada omogućio je prilikom transfekcije ulazak nanočestica u stanicu endocitozom. Pokazano je u literaturi da pozitivno nabijene kitozanske nanočestice brže i u većoj količini ulaze u stanice staničnih linija A549, HUVEC, CRL-2472, HKC, MRC-5, UT-7, K562, u odnosu na negativno nabijene karboksimetil-kitozanske nanočestice. Obje vrste nanočestica u stanice nabrojenih staničnih linija ulazile su endocitozom, no pozitivno nabijene kitozanske nanočestice su se nakon ulaska u stanicu oslobodile iz lizosoma, dok su se negativno nabijene karboksimetil-kitozanske nanočestice zadržavale u lizosomima kroz dulje vremensko razdoblje (Yue i sur., 2011). U ovoj disertaciji pokazan je učinkovit ulazak kitozanskih nanočestica u U251N stanice. Korištene su nanočestice s uklopljenom siRNA obilježenom s fluorescentnom bojom cy3. Kitozan prisutan u suvišku u nanočesticama u odnosu na siRNA, što se očituje u pozitivnom zeta potencijalu kitozanskih nanočestica, vjerojatno je pridonijeo povećanju osmolarnosti lizosomalnih mjehurića. Povećana osmolarnost uzrokuje pucanje lizosomalnih membrana i oslobađanje siRNA iz kitozanskih nanočestica u citosol. siRNA obilježena cy3-om uočena je u citosolu U251N stanica nakon tretmana s kitozanskim nanočesticama u trajanju od 24 sata. Međutim,

mehanizam kojim se komponente K-TPP-siRNA nanočestica oslobađaju iz lizosomalnih mjehurića nije u potpunosti objašnjen.

Nadalje, budući se formiranje K-TPP-siRNA nanočestica temelji na elektrostatskim interakcijama između pozitivno nabijenih aminoskupina kitozana i negativno nabijenih skupina siRNA, bilo je potrebno ispitati mijenja li se veličina i stabilnost kitozanskih nanočestica uslijed promjene pH. Naime, kako pKa amino skupina kitozana iznosi 6,5 za očekivati je da se uslijed povišenja pH na vrijednost 7,0 gubi dio pozitivnog naboja kitozanskog polimera. Zaista, povišenje pH oslabilo je elektrostatske interakcije između kitozana i siRNA što se očitovalo kao povećanje veličine čestica. Hidrodinamički promjeri izmjereni pomoću aparata za foton korelacijsku spektroskopiju pokazali su raspon veličina K-TPP-siRNA nanočestica od prosječno 150 nm do prosječno 600 nm pri pH 7,0. Promjena veličine K-TPP-siRNA nanočestica uslijed povišenja pH na 7,4 promatrana je i pomoću AF4 (od *engl*. asymmetric flow field-flow fractionation) metode. Uočena su dva pika u AF4 fraktogramu u prethodno spomenutom rasponu veličina K-TPP-siRNA nanočestica. Jedan pik AF4 fraktograma označavao je populaciju nanočestica prosječnog polumjera 100 nm, što je bilo u skladu s promjerom nanočestica (~200 nm) prethodno izmjerenim pomoću aparata za foton korelacijsku spektroskopiju. Uočena je još jedna populaciju prosječnog polumjera 500 nm. Ova populacija predstavljala je aglomerate nastale združivanjem manjih nanočestica. Na osnovu ovih rezultata za pretpostaviti je da jedan dio kitozanskih nanočestica zadržava učinkovitost u unosu siRNA u stanice i posljedičnom utišavanju gena. Određeni dio kitozanskih nanočestica ipak gubi ovu sposobnost jer je aglomeratima polumjera većih od 500 nm otežan ulazak u stanice, zbog čega ne mogu učinkovito isporučiti siRNA u citosol.

4.2.3. Učinkovitost uklapanja siRNA, toksičnost K-TPP-siRNA i utišavanje *hsp70*

Katas i Alpar (2006) pokazali su 100%-tnu učinkovitost uklapanja siRNA u kitozanske nanočestice (Katas i Alpar, 2006). U istraživanju prikazanom u ovom radu mjerenjem apsorbancije (na 260 nm) nadsloja zaostalog nakon centrifugiranja nanočestica izmjerena je učinkovitost uklapanja siRNA od približno 70%. Naprotiv, elektroforezom K-TPP-siRNA nanočestica na agarozonom gelu nije mogla biti uočena neuklopljena siRNA što bi upućivalo na 100%-tnu učinkovitost uklapanja siRNA u kitozanske nanočestice. Nadalje, siRNA uklopljena u kitozanske nanočestice pokazivala je ograničenu pokretljivost na elektroforezi na agaroznom gelu, što je upućivalo na izuzetnu jačinu elektrostatskih interakcija između fosfatnih skupina siRNA i amino skupina kitozana. Jačina elektrostatskih interakcija između polimera kitozana i siRNA pokazana je i elektroforezom na agaroznom gelu nakon inkubacije

kitozanskih nanočestica u mediju s dodatkom FBS-a. Stabilnost K-TPP-siRNA nanočestica bila je očuvana u mediju s 10% FBS-a, ali ne i u mediju s 50% FBS-a. Međutim, neuklopljena siRNA bila je razgrađena u mediju s 10% FBS-a već nakon 30 minuta inkubacije. Vezanje siRNA u kitozanske nanočestice pridonosi dakle zaštiti siRNA od faktora prisutnih u serumu što je od iznimne važnosti kod moguće sistemske primjene ovih nanočestica.

Toksičnosti kitozana i nanosustava pripremljenih modifikacijama kitozana ispitane su u brojnim istraživanjima. Ustanovljeno je da toksičnost kitozana kod životinjskih ekperimentalnih modela uvelike ovisi o mjestu i načinu ulaska u organizam (Baldrick, 2010). Kitozan nije pokazao toksičnost nakon oralnog unosa sve do 15 g/kg/danu, dok je tolerancija organizma na kitozan unešen injekcijom u potkožna tkiva bila trostruko manja te se toksičnost mogla uočiti već nakon doze od 50 mg/kg/danu (Garcia-Fuentes i Alonso, 2012). Stoga je neophodno prije svake moguće primjene kitozana *in vitro* i *in vivo,* ispitati toksičnost ovog polimera. Određivanjem metaboličke aktivnosti stanica nakon tretmana nekoliko tumorskih staničnih linija K-TPP-siRNA nanočesticama, ali i otopinama pojedinih komponenata korištenih u pripremi nanočestica, nije uočena značajna promjena metaboličke aktivnosti sve do koncentracije kitozana u iznosu od 0,143 mg/mL. U eksperimentalnom modelu korištenom u ovom istraživanju, Jurkat i U251N stanicama, kitozan nije prouzročio smanjenje vijabilnosti, kao ni u eksperimentalnim modelima tumorskih stanica pluća, H1299, za koje je ustanovljen viši prag tolerancije prema kitozanskom polimeru zbog neparenteralnog unosa (Howard i sur., 2006; Malmo i sur., 2012).

Učinkovitost kitozanskih nanočestica u utišavanju Hsp70 na genskoj razini određena je u Jurkat stanicama. Pokazano je da unatoč djelomičnoj nestabilnosti kitozanskih nanočestica u pH medija od 7,0, određeni udio kitozanskih nanočestica zadržava svojstva koja omogućuju endocitozni ulazak nanočestica u tumorske stanice. Postignuto je 50%-tno utišavanje gena *hsp70* nakon 24-satnog tretmana s K-TPP-siRNA nanočesticama. Učinak utišavanja bio je usporediv s utišavanjem postignutim uz upotrebu komercijalno dostupnog lipidnog sustava, HiPerFect-a.

4.2.4. Biološka aktivnost kitozanskih nanočestica s uklopljenom Hsp70 sljedno-specifičnom siRNA

Istraživanje temeljeno na upotrebi nekoliko siRNA sljedno-specifičnih za članove HSP70 porodice proteina pokazalo je da dok utišavanje konstitutivnog proteina Hsc70 pridonosi smrti i netransformiranih i transformiranih stanica, inducibilni oblici Hsp70-1 i Hsp70-2 imaju funkcije različite od funkcije Hsc70, koje su specifične isključivo za maligne

stanice i za njihov rast i razvoj. Tumorske stanice kojima je RNA interferencijom uklonjena funkcija proteina Hsp70-1 i Hsp70-2 pokazivale su drukčije morfološke karakteristike, promjene u staničnom ciklusu te različitu ekspresiju gena, posebno gena MIC-1 (od *engl.* macrophage inhibitory cytokine), u odnosu na netransformirane stanice (Rohde i sur., 2005). Nadalje, u jednom istraživanju pokazano je da specifična inhibicija inducibilnog Hsp70 sljedno-specifičnom siRNA može učinkovito inhibirati rast stanica karcinoma želuca, BCG823, *in vitro*, kao i rast karcinoma želuca u mišjim eksperimentalnim modelima *in vivo* (Xiang i sur., 2008). U stanicama karcinoma jajnika *in vitro* inhibicija aktivnosti inducibilnog Hsp70 pomoću sljedno-specifične siRNA povećala je osjetljivost ovih stanica na tretman cisplatinom (Yang i sur., 2012). Specifično utišavanje (*engl.* "knock-down") inducibilnog Hsp70 u stanicama adenokarcinoma prostate, PC-3 i DU-145, *in vitro* pomoću retrovirusa imalo je za posljedicu morfološke promjene u ovim stanicama, smanjenje brzine rasta te sprječavanje sposobnosti stvaranja kolonija u agaru. Osjetljivost PC-3 i DU-145 stanica prema toplinskom stresu i inhibitorima proteosomalne aktivnosti također je bila povećana uslijed inhibicije ekspresije inducibilnog Hsp70 (Gabai i sur., 2005).

Navedena, ali i brojna druga istraživanja koja ovdje nisu spomenuta pokazala su da inducibilni oblik Hsp70 ima kritičnu ulogu ne samo u promoviranju rasta tumorskih stanica i tumorskih tkiva nego i u rezistenciji na terapiju. Kao logičan nastavak stečenih znanja o zaštitinoj ulozi Hsp70 u tumorima, potraga za idealnim spojem ili sustavom, odnosno načinom inhibicije aktivnosti ovog proteina se nastavlja (Goloudina i sur., 2012).

U istraživanju opisanom u ovom radu, utišavanje genske ekspresije *hsp70* postignuto je dostavom siRNA sljedno-specifične za inducibilni Hsp70 pomoću K-TPP nanočestica u dvije tumorske stanične linije, Jurkat i U251N. Posljedice utišavanja Hsp70 pomoću kitozanskih nanočestica u tumorskim staničnim linijama Jurkat i U251N, u smislu značajnog pada stanične vijabilnosti, uočene su nakon 2 ili 3 dana ovisno o staničnoj liniji. Potvrđeno je dakle i ovim istraživanjem da inducibilni Hsp70 ima važnu ulogu u osiguravanju aktivnosti proliferativnih signalnih puteva u tumorskim staničnim linijama Jurkat i U251, što je bilo u skladu sa rezultatima prethodno navedenih istraživanja.

Također je uočeno prolazno povećanje stupnja proliferacije tumorskih stanica *in vitro* uslijed inkubacije bilo s otopinom kitozana ili s K-TPP nanočesticama ukoliko je tretman učinjen jednokratno te nije ponavljan svaka 24 sata. Povećanje vijabilnosti tumorskih stanica uslijed tretmana kitozanom primijećeno je jedino nakon inkubacije/tretmana u mediju bez potrebnih faktora rasta (0% FBS). Jedan od mogućih razloga ove prolazne stanične proliferacije je činjenica da kitozan kao polimer adhezivnih svojstava može uzrokovati

međusobno privlačenje stanica. Upravo ovo svojstvo kitozana i njegovih derivata predloženo je kao korisno u procesima zacjeljivanja rana (Jayakumar i sur., 2011). Međustanične interakcije privučenih i kitozanom slijepljenih stanica mogu izazvati aktiviranje unutastaničnih signalnih putova koji dovode do ekspresije gena i nastanka proteina koji omogućuju proliferaciju stanica.

Također, potrebno je imati na umu da utišavanje jednog inducibilnog oblika Hsp70, poput Hsp70-1, može izazvati aktiviranje drugog oblika zaštite u tumorskim stanicama, npr. alternativnog inducibilnog oblika Hsp70-2. Pokazano je da utišavanje Hsp70-1 u *in vitro* modelima karcinoma debelog crijeva, tumorskim staničnim linijama HT-29 i SW-480, kao i u ne-transformiranim ljudskim stanicama debelog crijeva pomoću RNAi tehnologije, dovodi do povećanja ekspresije Hsp70-2 čime je umanjen negativni utjecaj utišavanja inducibilnog oblika Hsp70-1 na vijabilnost tumorskih stanica (Noonan i sur., 2007). Kako je u istraživanju opisanom u ovom radu korištena siRNA sljedno-specifična za Hsp70-1 (HSPA1A), moguće je da utišavanje inducibilnog oblika Hsp70-1, dovodi do posrednog povećanja ekspresije Hsp70-2, čime se umanjuje učinkovitost utišavanja Hsp70-1. Isto tako moguće je da se isti mehanizam aktivira kao svojevrsna privremena zaštita uslijed tretmana kitozanskim nanočesticama, što se očituje kao prolazno povećanje u stupnju stanične proliferacije koje se može nadići ponavljanim tretmanom kitozanskim nanočesticama s uklopljenom Hsp70-1 sljedno-specifičnom siRNA.

4.3. ANTITUMORSKA AKTIVNOST Hsp70 I Hsp90 INHIBITORA

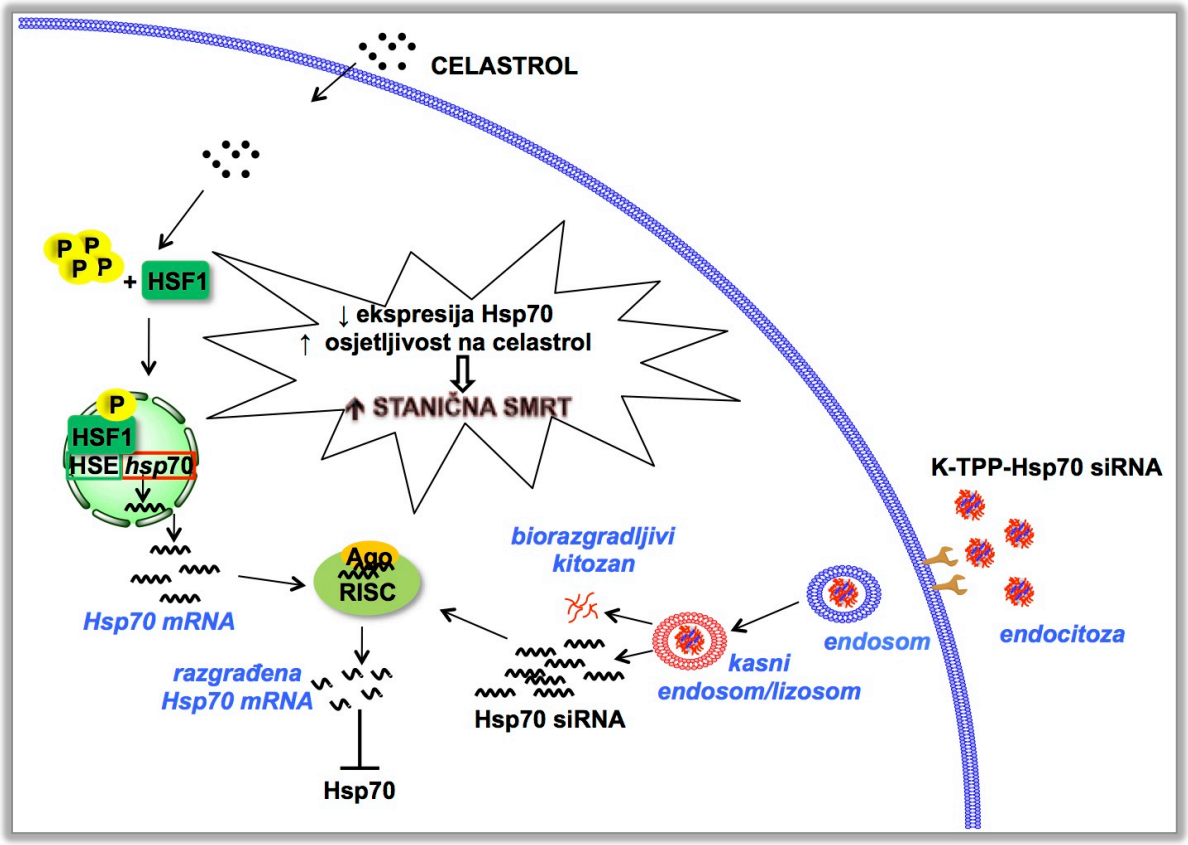
4.3.1. Udruženi tretman inhibitorima aktivnosti Hsp90 s utišavanjem ekspresije Hsp70

Poznato je da je u nekim tumorskim stanicama inhibicija proliferativnih staničnih mehanizama dovoljna kako bi se spriječio daljnji rast i razvoj tumora dok je u drugima potrebno istovremeno primijeniti terapeutike koji ciljano inhibiraju čimbenike različitih signalnih putova uključenih u proliferaciju i onih uključenih u sprječavanje apoptoze u istoj stanici. Mnogo je truda uloženo u dizajniranje terapeutika temeljenih na poticanju apoptoze putem inhibicije aktivnosti Hsp70, no ovakav pristup u liječenju tumora otežan je nakupljanjem drugih mehanizama otpornosti uslijed genetičkih i epigenetičkih promjena kod napredovanja tumora. Nadalje, predloženi su i mnogobrojni načini inhibicije proliferacije, jedan od kojih je i sprječavanje rasta tumorskih stanica putem inhibicije aktivnosti Hsp90 i njegovih ko-šaperona (Travers i sur., 2011; Lu i sur., 2012), no i ovaj pristup iskusio je poteškoće ponajviše zbog aktivacije HSF1 te posljedičnog povećanja ekspresije Hsp70 (Mou i sur., 2011). Pokazano je da mnogi prirodni Hsp90 inhibitori poput celastrola (Peng i sur., 2010), kurkumina (Kunnumakkara i sur., 2008) i geldanamicina te sintetskog analoga geldanamicina, 17-AAG (Modi i sur., 2011) uslijed korištenja u svrhu inhibiranja aktivnosti Hsp90 kroz inhibiciju njegove sposobnosti da stvara interakcije s ko-šaperonima također aktiviraju zaštitni stanični mehanizam u obliku prekomjerne ekspresije Hsp70. U brojnim istraživanjima stoga je ispitana mogućnost i učinkovitost istovremene inhibicije Hsp90 i njegove aktivnosti te utišavanja ekspresije Hsp70 kako bi se uzrokovala smrt tumorskih stanica *in vitro*.

U A549 i HeLa stanicama udruženi tretman 17-AAG-om i cisplatinom pokazao je obećavajuću učinkovitost u smislu smanjenja vijabilnosti ovih tumorskih stanica. Nađeno je da 17-AAG povećava aktivnost HSF1 kroz omogućavanje njegove fosforilacije i translokacije u jezgru, a da cisplatina može spriječiti aktivaciju HSF1 koju je prouzrokovao 17-AAG (McCollum i sur., 2008). Ova dva spoja prouzročila su u udruženom tretmanu značajno sinergističko poticanje apoptoze u odnosu na apoptozu potaknutu ovim spojevima zasebno. Osim cisplatine, otkriveno je da spoj KNK-437, također sprječava aktivaciju i translokaciju HSF1 te time prekomjernu ekspresiju Hsp70 nakon tretmana 17-AAG-om u AML HL-60 stanicama (Guo i sur., 2005). Rezultati navedenih istraživanja potkrepljuju ideju simultane inhibiciju Hsp70 i Hsp90. U relevantnoj literaturi nije pronađeno istraživanje u kojem je istovremeno inhibirana ekspresija Hsp70 RNA interferencijom i aktivnost Hsp90.

Istovremena inhibicija aktivnosti Hsp90 i ekspresije Hsp70 u ovom istraživanju postignuta je primjenom celastrola i Hsp70 sljedno-specifične siRNA dostavljene u stanice K-TPP nanočesticama. Udruženi tretman celastrolom i K-TPP-Hsp70 siRNA nanočesticama doveo je do značajnog pada stanične vijabilnosti u odnosu na relevantne kontrole. Sinergisitčko poticanje stanične smrti uslijed kombinirane inhibicije Hsp70 i Hsp90 nije utvrđeno, no mogućnost povećanja učinkovitosti Hsp70 inhibitora istovremenim tretmanom Hsp90 inhibitorima, ili povećanja učinkovitosti Hsp90 inhibitora istovremenim tretmanom Hsp70 inhibitorima uočeno je u dva različita modela tumorskih stanica, staničnim linijama Jurkat i U251N.

Način na koji se postiže povećana stopa stanične smrti u tumorskim stanicama *in vitro* uz istovremenu inhibiciju Hsp70 i Hsp90 prikazan je na *slici 4.1*. Kako je već spomenuto bitna posljedica aktivnosti brojnih Hsp90 inhibitora pa tako i celastrola je aktivacija HSF1 i prema tome povišenje ekspresije Hsp70 u stanicama (Westerheide i sur., 2004). Aktivacija HSF1 događa se kroz fosforilaciju koja je popraćena njegovom translokacijom u jezgru gdje se veže za HSE, promotor gena stresnih proteina. Posljedično dolazi do povećane transkripcije Hsp70 i nastanka povećanih količina Hsp70 mRNA. Istovremenim unosom Hsp70 siRNA pomoću kitozanskih nanočestica može se uloviti novonastala mRNA i tako spriječiti njeno prevođenje u protein mehanizmom RNAi. Rezultat je smanjena ekspresija Hsp70 i aktivnost Hsp90 te povećana osjetljivost stanica na bilo koji od tretmana zasebno te posljedično i stanična smrt šireg opsega.



Slika 4.1. *Shematski prikaz unutarstaničnih događaja uslijed udruženog utišavanja ekspresije Hsp70 pomoću Hsp70 sljedno-specifične siRNA uklopljene u K-TPP nanočestice i inhibicije Hsp90 celastrolom. Peuzeto i prilagođeno iz Matokanović i sur., 2013.*

4.3.2. Učinkovitosti udruženog tretmana Hsp90 inhibitora i Hsp70 inhibitora u tumorskim sferoidima

U istraživanju prikazanom u ovoj disertaciji učinkovitost udruženog tretmana inhibitorima ekspresije i aktivnosti proteina Hsp70 i Hsp90 ispitana je i u tumorskim sferoidima pripremljenima od U251N stanica. Tumorski sferoidi pripremljeni od različitih tumorskih staničnih linija korišteni su već u brojnim istraživanjima za ispitivanje učinkovitosti antitumorskih lijekova. Tehnike pripreme tumorskih sferoida kao i njihova svojstva već su prethodno opisana (Friedrich i sur., 2009; Hirschhaeuser i sur., 2010; Ivascu i Kubbies, 2006; Khaitan i sur., 2006; Mehta i sur., 2012). Tumorski sferoidi pripremljeni eksperimentalno nastaju kao nakupina stanica sferičnog oblika. U ovakvim trodimenzionalnim nakupinama nakon nekoliko dana rasta u kulturi mogu se uočiti razlike u vijabilnosti stanica koje se nalaze u vanjskom sloju sferoida koji je u doticaju s hranidbenim medijem i faktorima rasta u odnosu na vijabilnost stanica u srži sferoida (rezultati preliminarnih istraživanja koji nisu prikazani u ovoj disertaciji). Hipoksija koja se događa u

srži sferoida kao trodimenzionalnog modela tumorskog tkiva smatra se usporedivom s hipoksijom koje se događa *in vivo* u tumorskim tkivima. Uslijed hipoksije, koja i za tumorska tkiva predstavlja nepovoljne uvjete zbog oslobađanja štetnih radikala iz stanica oštećenih nedovoljnim količinama kisika, može doći do promjene ekspresije gena unutar tumora, a time i do stvaranja otpornosti prema antitumorskim terapeuticima (Onozuka i sur., 2011). Osim stečene otpornosti kroz promjenu ekspresije gena, učinkovitost antitumorskiih lijekova može biti umanjena zbog teškog prodiranja lijeka u dublje slojeve trodimenzionalnog tumora, što je još jedan dodatni razlog zbog kojeg je učinkovitost predloženog antitumorskog terapeutika temeljenog na upotrebi celastrola i K-TPP-Hsp70 siRNA nanočestica bilo potrebno ispitati u ovim trodimenzionalnim modelima tumora.

Ustanovljeno je da svojstva kitozana koja omogućuju njegovu primjenu u pripremi novih tkiva (Kim i sur., 2008), u tumorskim sferodima vjerojatno dovode do očvršćivanja interakcija između tumorskih stanica kada se one nalaze u trodimenzionalnoj nakupini poput sferoida. Kada je primijenjen tretman celastrolom, primijećeno je slabljenje međustaničnih interakcija u površinskom staničnom sloju i odvajanje nevijabilnih stanica od strukture U251N sferoida, ali s povišenim koncentracijama celastrola u odnosu na one koje su uzrokovale promjenu vijabilnosti u dvodimenzionalnim modelima U251N. Za trodimenzionalni model bilo je potrebno dakle koristiti veću dozu celastrola, što navodi na pretpostavku da bi za učinkovitu primjenu *in vivo* koncentracije ovog mogućeg antitumorskog terapeutika morale biti više. Iznenađujuće, međustanične interakcije u U251N sferoidima bile su očuvane kada su istovremeno primijenjeni celastrol i utišavanje Hsp70 pomoću siRNA dostavljene uz upotrebu kitozanskih nanočestica. Izgledno je da je su K-TPP-siRNA nanočestice u sferoidima spriječile antiproliferativni učinak celastrola. Budući je isto očuvanje međustaničnih interakcija uočeno i s praznim K-TPP nanočesticama nakon tretmana celastrolom, ovaj učinak pripisan je djelovanju kitozana, a nije se smatrao posljedicom utišavanja Hsp70. Pretpostavka da kitozan može očvrsnuti međustanične interakcije u skladu je s prethodno objavljenim istraživanjem u kojem je opisana mogućnost uzgoja sferoida matičnih stanica na kitozanskim membrana (Yeh i sur., 2012). Yeh i suradnici iskoristili su adhezivna svojstva kitozana upravo za pripravu sferoida. Kitozan i njegovi derivati također su bili korišteni kao materijal za zacjeljivanje rana (Jayakumar i sur., 2011) zbog sposobnosti da očvrsnu međustanične interakcije. Prema tome, moguće je da kitozan također učinkovito potiče međustaničnu adheziju u površinskom sloju stanica U251N sferoida aktivirajući stanične događaje koji to omogućuju, ali umanjujući antiproliferativni učinak celastrola.

Usporedivo značajno povećanje antiproliferativnog učinka celastrola u udruženom tretmanu s K-TPP-Hsp70 siRNA nanočesticama ipak je postignuto, ali uz korištenje većih koncentracija kako celastrola tako i K-TPP-Hsp70 siRNA. Celastrol u povećanoj koncentraciji učinkovitije prodire i u srž tumorskih sferoida. Pretpostavljeno je također da uslijed unosa većeg broja kitozanskih nanočestica toksični učinak kitozana nadvladava njegova adhezivna svojstva. Povećana količina kitozanskih nanočestica osigurava veću koncentraciju Hsp70 siRNA te i prodor Hsp70 siRNA u dublje stanične slojeve čime se omogućava učinkovito utišavanje Hsp70 i u srži i kori U251N sferoida. Značajno smanjenje vijabilnosti temeljeno na istovremenoj inhibiciji stresnih proteina Hsp70 i Hsp90 može se dakle prouzročiti i u trodimenzionalnim tumorskim modelima.

SMJERNICE ZA BUDUĆA ISTRAŽIVANJA

S obzirom na neprestano povećanje učestalosti obolijevanja od tumorskih bolesti u svijetu novi pristupi u liječenju smatraju se neophodnima. Tumori proizašli iz maligne proliferacije stanica jedne vrste gotovo se redovito razlikuju u genetičkim karakteristikama od tumora proizašlih iz stanica druge vrste tkiva. Ipak, ustanovljeno je da je povećana ekspresija nekih proteina zajednička različitim vrstama tumora i da se kao takva može iskoristiti za osmišljavanje lijekova koji bi mogli pokazati potrebitu učinkovitost u različitim tumorima.

Stresni proteini Hsp70 i Hsp90 redovito se mogu naći u povećanim količinama u različitim vrstama tumorskih stanica *in vitro*, ali i u različitim čvrstim tumorima *in vivo*. U istraživanju opisanom u ovom radu ispitan je antitumorski pristup temeljen na inhibiciji Hsp70, te na udruženoj inhibiciji Hsp70 i Hsp90. Kako su se oba antitumorska pristupa pokazala učinkovitim u dva različita stanična modela, staničnim linijama Jurkat i U251N, potvrđena je hipoteza da se uklanjanjem aktivnosti Hsp70 i/ili Hsp90 može spriječiti rast različitih tipova tumora.

Ipak, kako bi predloženi antitumorski pristup bio ispitan *in vivo*, prije mogućeg prelaska u klinička istraživanja, potrebno je razmotriti i povoljne i nepovoljne učinke ovog pristupa. Kitozanske nanočestice s uklopljenom Hsp70 sljedno-specifičnom siRNA mogu osigurati učinkovito utišavanje *hsp70* gena. Utišavanje gena osigurano dostavom siRNA pomoću kitozanskih nanočestica prolaznog je karaktera. Kako bi se osiguralo dugotrajno utišavanje *hsp70* gena, potrebno je ponavljati unos sljedno-specifične siRNA kroz određeno vremensko razdoblje. Međutim, pokazano je da tretman kitozanskim nanočesticama može imati za posljedicu promoviranje proliferacije određenog tipa tumorskih stanica u dvodimezionalnim i trodimenzionalnim modelima tumora. Adhezivna svojstva kitozana pridonose ovom učinku te se stoga primjeni kitozana u svrhu dostave siRNA u tumorska tkiva mora pristupiti s iznimnim oprezom. Kako bi utišavanje Hsp70 pomoću RNA interferencije predloženo u istraživanju opisanom u ovoj disertaciji ipak moglo biti iskorišteno u liječenju tumora potrebno je ispitati i neke druge sustave za dostavu siRNA, poput onih za koje je pokazana niska toksičnost, nisu zabilježeni dodatni učinci i trenutno se nalaze u kliničkim fazama ispitivanja na bolesnicima. Osim toga, trebalo bi modifikacijama kitozana pokušati umanjiti njegove neželjene učinke. Pri tome treba imati u vidu i poboljšanja u smislu osiguravanja ciljane dostave u tumorska tkiva uz istovremeno izbjegavanje nemalignih tkiva.

U pogledu udruženog tretmana Hsp70 i Hsp90 inhibitora potrebno je ispitati i druge spojeve za koje je pokazano učinkovito inhibiranje aktivnosti Hsp90. Celastrol kao lipofilna molekula može prodrijeti u stanice difuzijom kroz stanične membrane, ali samo ograničeno. Potrebno je, dakle, ili povećati učinkovitost ulaska celastrola u tumorske stanice ili u svrhu Hsp90 inhibicije iskoristiti spojeve koji olakšano ulaze u stanice i tkiva.

Konačno, sve se više spominje mogućnost dostave siRNA i spojeva inhibitora različitih proteina istovremeno u nanosustavima u tumorske stanice i tkiva. Pristup je to koji su predložili Creixell i suradnici (Creixell i Peppas, 2012) i koji predstavlja obećavajuću strategiju u borbi protiv tumorskih bolesti u budućnosti. Smatra se da će se na ovaj način, osim zaštite siRNA od razgradnje tijekom putovanja do ciljnih tumorskih tkiva, osigurati i učinkovit alat protiv mehanizama rezistencije koji se u tumorskim tkivima pojavljuju nakon prvog intervala kemoterapije i koji danas predstavljaju bitnu prepreku učinkovitosti kemoterapeutika kod tumora u kasnim stadijima razvoja.

5. ZAKLJUČCI

Stresni proteini (HSP) pripadaju skupini unutarstaničnih proteina koji su eksprimirani konstitutivno i kao odgovor na fizikalni odnosno biološki stres. Sposobnost stresnih proteina da zaustave proces programirane stanične smrti i potaknu proliferaciiju predstavlja bitan aspekt njihove povezanosti s malignom proliferacijom.

Glavni cilj ovog istraživanja bio je procijeniti ulogu Hsp70 u zaštiti od programirane stanične smrti u tumorskim stanicama. Osim toga, ispitana je mogućnost istovremene inhibicije Hsp70 i Hsp90 u svrhu postizanja učinkovitije antitumorske terapije.

Na temelju provedenih pokusa, dobivenih rezultata i rasprave može se zaključiti sljedeće:

- U tumorskim stanicama toplinskim stresom inducirani Hsp70 ima značajnu ulogu u zaštiti od stanične smrti uzrokovane staurosporinom.

- Zaštitna uloga stresom induciranog Hsp70 očituje se u zaštiti od programirane stanične smrti koja se odvija putem neovisnim o aktivaciji kaspaze 3 i oslobađanja citokroma c.

- Ionotropnim geliranjem kitozana s TPP-om uz dodatak siRNA spontano nastaju čestice nano veličina.

- Kitozanske nanočestice s uklopljenom siRNA pokazuju nisku toksičnost u različitim ljudskim tumorskim staničnim linijama.

- Kitozanske nanočestice pokazuju učinkovitost uklapanja siRNA od približno 70% te uspješno pridonose utišavanju ekspresije *hsp70* u Jurkat stanicama.

- Utišavanje Hsp70 pomoću kitozanskih nanočestica uzrokuje značajno smanjenje stanične vijabilnosti u staničnim linijama Jurkat i U251N.

- Inducibilni oblik Hsp70 pridonosi preživljenju tumorskih stanica.

- Inhibitor aktivnosti Hsp90, celastrol, uzrokuje smanjenje stanične vijabilnosti i sprječavanje proliferacije u tumorskim staničnim linijama Jurkat i U251N.

- Istovremena inhibicija Hsp90 i utišavanje ekspresije Hsp70 pridonosi značajnijem smanjenju stanične vijabilnosti u dvodimenzionalnim modelima tumora.

- Istovremena inhibicija Hsp90 i utišavanje ekspresije Hsp70 pridonosi značajnijem smanjenju stanične vijabilnosti u trodimenzionalnim modelima tumora, uz povećane koncentracije celastrola i siRNA sljedno-specifične za Hsp70.

- Rad predstavlja važan uvid u zaštitnu ulogu Hsp70 u različitim tumorskim staničnim linijama, temelje za daljnja istraživanja optimalnih nanosustava za dostavu siRNA sljedno-specifičnih za HSP te moguća ispitivanja istovremene inhibicije Hsp70 i Hsp90 u tumorskim modelima *in vivo*.

6. LITERATURA

Adams JM and Cory S (2007) The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 26 (9), 1324–1337.

Amelio I, Melino G and Knight RA (2011) Cell death pathology: cross-talk with autophagy and its clinical implications. *Biochem Biophys Res Commun*. 414 (2), 277–281.

Antonsson A and Persson JL (2009) Induction of apoptosis by staurosporine involves the inhibition of expression of the major cell cycle proteins at the G(2)/m checkpoint accompanied by alterations in Erk and Akt kinase activities. *Anticancer research*. 29 (8), 2893–2898.

Baldrick P (2010) The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regul Toxicol Pharmacol*. 56 (3), 290–299.

Beere HM (2005) Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J Clin Invest*. 115 (10), 2633–2639.

Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Tailor P, Morimoto RI, Cohen GM and Green DR (2000) Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol*. 2 (8), 469–475.

Bouchier-Hayes L, Lartigue L and Newmeyer DD (2005) Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest*. 115 (10), 2640–2647.

Burkhart DL and Sage J (2008) Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer*. 8 (9), 671–682.

Buseman CM, Wright WE and Shay JW (2012) Is telomerase a viable target in cancer? *Mutat Res*. 730 (1-2), 90–97.

Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB and Ciocca DR (2006) Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends in biochemical sciences*. 31 (3), 164–172.

Carlsson J and Yuhas JM (1984) Liquid-overlay culture of cellular spheroids. *Recent Results Cancer Res*. 95, 1–23.

Carmeliet P (2005) VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*. 69 Suppl 3, 4–10.

Chauhan D, Li G, Shringarpure R, Podar K, Ohtake Y, Hideshima T and Anderson KC (2003) Blockade of Hsp27 overcomes Bortezomib/proteasome inhibitor PS-341 resistance in lymphoma cells. *Cancer Res*. 63 (19), 6174–6177.

Chen G, Cao P and Goeddel DV (2002) TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Molecular cell*. 9 (2), 401–410.

Chen Q, Crosby M and Almasan A (2003) Redox Regulation of Apoptosis before and after Cytochrome C Release. *Korean journal of biological sciences*. 7 (1), 1–9.

Chen S, Rehman SK, Zhang W, Wen A, Yao L and Zhang J (2010) Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance. *Biochim Biophys Acta*. 1806 (2), 220–229.

Christie RJ, Matsumoto Y, Miyata K, Nomoto T, Fukushima S, Osada K, Halnaut J, Pittella F, Kim HJ, Nishiyama N and Kataoka K (2012) Targeted polymeric micelles for siRNA treatment of experimental cancer by intravenous injection. *ACS Nano*. 6 (6), 5174–5189.

Ciocca DR and Calderwood SK (2005) Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones*. 10 (2), 86–103.

Cory S and Adams JM (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2 (9), 647–656.

Creagh EM, Carmody RJ and Cotter TG (2000) Heat shock protein 70 inhibits caspase-dependent and -independent apoptosis in Jurkat T cells. *Experimental cell research*. 257 (1), 58–66.

Creixell M and Peppas NA (2012) Co-delivery of siRNA and therapeutic agents using nanocarriers to overcome cancer resistance. *Nano Today*.

Csaba N, Köping-Höggård M and Alonso MJ (2009) Ionically crosslinked chitosan/tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery. *Int J Pharm*. 382 (1-2), 205–214.

Curto M, Cole BK, Lallemand D, Liu C-H and McClatchey AI (2007) Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin. *The Journal of cell biology*. 177 (5), 893–903.

David S, Pitard B, Benoît J-P and Passirani C (2010) Non-viral nanosystems for systemic siRNA delivery. *Pharmacol Res*. 62 (2), 100–114.

Davidson BL and McCray PB (2011) Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nat Rev Genet*. 12 (5), 329–340.

Davis ME (2009) The first targeted delivery of siRNA in humans via a self-assembling, cyclodextrin polymer-based nanoparticle: from concept to clinic. *Mol Pharm*. 6 (3), 659–668.

Davis ME, Zuckerman JE, Choi CH, Seligson D, Tolcher A, Alabi CA, Yen Y, Heidel JD and Ribas A (2010) Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature*. 464 (7291), 1067–1070.

de Jesús Valle MJ, Dinis-Oliveira RJ, Carvalho F, Bastos ML and Sánchez Navarro A (2008) Toxicological evaluation of lactose and chitosan delivered by inhalation. *J Biomater Sci Polym Ed*. 19 (3), 387–397.

Didelot C, Lanneau D, Brunet M, Joly A-L, De Thonel A, Chiosis G and Garrido C (2007) Anti-cancer therapeutic approaches based on intracellular and extracellular heat shock proteins. *Current medicinal chemistry*. 14 (27), 2839–2847.

Felber AE, Castagner B, Elsabahy M, Deleavey GF, Damha MJ and Leroux J-C (2011) siRNA nanocarriers based on methacrylic acid copolymers. *J Control Release*. 152 (1), 159–167.

Fernandes JC, Qiu X, Winnik FM, Benderdour M, Zhang X, Dai K and Shi Q (2012) Low molecular weight chitosan conjugated with folate for siRNA delivery in vitro: optimization studies. *Int J Nanomedicine*. 7, 5833–5845.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE and Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature*. 391 (6669), 806–811.

Friedrich J, Seidel C, Ebner R and Kunz-Schughart LA (2009) Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc*. 4 (3), 309–324.

Gabai VL, Budagova KR and Sherman MY (2005) Increased expression of the major heat shock protein Hsp72 in human prostate carcinoma cells is dispensable for their viability but confers resistance to a variety of anticancer agents. *Oncogene*. 24 (20), 3328–3338.

Gabai VL, Mabuchi K, Mosser DD and Sherman MY (2002) Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Molecular and cellular biology*. 22 (10), 3415–3424.

Galluzzi L and Kroemer G (2008) Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*. 135 (7), 1161–1163.

Garcia-Fuentes M and Alonso MJ (2012) Chitosan-based drug nanocarriers: where do we stand? *J Control Release*. 161 (2), 496–504.

Goloudina AR, Demidov ON and Garrido C (2012) Inhibition of HSP70: A challenging anti-cancer strategy. *Cancer Lett*. 325 (2), 117–124.

Graner MW, Cumming RI and Bigner DD (2007) The heat shock response and chaperones/heat shock proteins in brain tumors: surface expression, release, and possible immune consequences. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 27 (42), 11214–11227.

Guertin DA and Sabatini DM (2005) An expanding role for mTOR in cancer. *Trends in molecular medicine*. 11 (8), 353–361.

Guicciardi ME and Gores GJ (2009) Life and death by death receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 23 (6), 1625–1637.

Guo F, Rocha K, Bali P, Pranpat M, Fiskus W, Boyapalle S, Kumaraswamy S, Balasis M, Greedy B, Armitage ES, Lawrence N and Bhalla K (2005) Abrogation of heat shock protein 70 induction as a strategy to increase antileukemia activity of heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-demethoxy geldanamycin. *Cancer Res*. 65 (22), 10536–10544.

Han L, Zhao J, Zhang X, Cao W, Hu X, Zou G, Duan X and Liang XJ (2012) Enhanced siRNA delivery and silencing gold-chitosan nanosystem with surface charge-reversal polymer assembly and good biocompatibility. *ACS Nano*. 6 (8), 7340–7351.

Hanahan D and Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144 (5), 646–674.

Hanahan D and Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*. 100 (1), 57–70.

He C and Klionsky DJ (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual review of genetics*. 43, 67–93.

Heidel JD, Yu Z, Liu JY-C, Rele SM, Liang Y, Zeidan RK, Kornbrust DJ and Davis ME (2007) Administration in non-human primates of escalating intravenous doses of targeted nanoparticles containing ribonucleotide reductase subunit M2 siRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104 (14), 5715–5721.

Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W and Kunz-Schughart LA (2010) Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol*. 148 (1), 3–15.

Hosokawa N, Hirayoshi K, Kudo H, Takechi H, Aoike A, Kawai K and Nagata K (1992) Inhibition of the activation of heat shock factor in vivo and in vitro by flavonoids. *Molecular and cellular biology*. 12 (8), 3490–3498.

Howard KA, Rahbek UL, Liu X, Damgaard CK, Glud SZ, Andersen MØ, Hovgaard MB, Schmitz A, Nyengaard JR, Besenbacher F and Kjems J (2006) RNA interference in vitro and in vivo using a novel chitosan/siRNA nanoparticle system. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 14 (4), 476–484.

Ivascu A and Kubbies M (2006) Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *J Biomol Screen*. 11 (8), 922–932.

Jayakumar R, Prabaharan M, Sudheesh Kumar PT, Nair SV and Tamura H (2011) Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnol Adv*. 29 (3), 322–337.

Jäättelä M (1999a) Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Experimental cell research*. 248 (1), 30–43.

Jäättelä M (1999b) Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Annals of medicine*. 31 (4), 261–271.

Jin Z and El-Deiry WS (2005) Overview of cell death signaling pathways. *Cancer biology & therapy*. 4 (2), 139–163.

Jones AT, Gumbleton M and Duncan R (2003) Understanding endocytic pathways and intracellular trafficking: a prerequisite for effective design of advanced drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*. 55 (11), 1353–1357.

Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, Cheetham ME, Chen B and Hightower LE (2009) Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones*. 14 (1), 105–111.

Katas H and Alpar HO (2006) Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. *J Control Release*. 115 (2), 216–225.

Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*. 26 (4), 239–257.

Khaitan D, Chandna S, Arya MB and Dwarakanath BS (2006) Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line; Implications for tumor therapy. *J Transl Med*. 4, 12.

Khalil AA, Kabapy NF, Deraz SF and Smith C (2011) Heat shock proteins in oncology: Diagnostic biomarkers or therapeutic targets? *Biochim Biophys Acta*. 1816 (2), 89–104.

Kim IY, Seo SJ, Moon HS, Yoo MK, Park IY, Kim BC and Cho CS (2008) Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnol Adv*. 26 (1), 1–21.

Kirkegaard T, Roth AG, Petersen NHT, Mahalka AK, Olsen OD, Moilanen I, Zylicz A, Knudsen J, Sandhoff K, Arenz C, Kinnunen PKJ, Nylandsted J and Jäättelä M (2010) Hsp70 stabilizes lysosomes and reverts Niemann-Pick disease-associated lysosomal pathology. *Nature*. 463 (7280), 549–553.

Komarova EY, Afanasyeva EA, Bulatova MM, Cheetham ME, Margulis BA and Guzhova IV (2004) Downstream caspases are novel targets for the antiapoptotic activity of the molecular chaperone hsp70. *Cell Stress Chaperones*. 9 (3), 265–275.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino GNomenclature Committee on Cell Death 2009 (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*. 16 (1), 3–11.

Kunnumakkara AB, Anand P and Aggarwal BB (2008) Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Lett*. 269 (2), 199–225.

Kwon YJ (2012) Before and after endosomal escape: roles of stimuli-converting siRNA/polymer interactions in determining gene silencing efficiency. *Accounts of chemical research*. 45 (7), 1077–1088.

LaCasse EC, Mahoney DJ, Cheung HH, Plenchette S, Baird S and Korneluk RG (2008) IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene*. 27 (48), 6252–6275.

Leu JI-J, Pimkina J, Frank A, Murphy ME and George DL (2009) A small molecule inhibitor of inducible heat shock protein 70. *Molecular cell*. 36 (1), 15–27.

Lu X, Xiao L, Wang L and Ruden DM (2012) Hsp90 inhibitors and drug resistance in cancer: the potential benefits of combination therapies of Hsp90 inhibitors and other anti-cancer drugs. *Biochemical pharmacology*. 83 (8), 995–1004.

Malmo J, Sørgård H, Vårum KM and Strand SP (2012) siRNA delivery with chitosan nanoparticles: Molecular properties favoring efficient gene silencing. *J Control Release*. 158 (2), 261–268.

Mao S, Sun W and Kissel T (2010) Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Adv Drug Deliv Rev*. 62 (1), 12–27.

Matokanović M, Barišić K, Filipović-Grčić J, Maysinger D (2012) Hsp70 silencing with siRNA in nanocarriers enhances cancer cell death induced by the inhibitor of Hsp90. *Eur J Pharm Sci*. 10.1016/j.ejps.2013.04.001

McCollum AK, Lukasiewicz KB, Teneyck CJ, Lingle WL, Toft DO and Erlichman C (2008) Cisplatin abrogates the geldanamycin-induced heat shock response. *Mol Cancer Ther*. 7 (10), 3256–3264.

Mehta G, Hsiao AY, Ingram M, Luker GD and Takayama S (2012) Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *J Control Release*.

Modi S, Stopeck A, Linden H, Solit D, Chandarlapaty S, Rosen N, D'Andrea G, Dickler M, Moynahan ME, Sugarman S, Ma W, Patil S, Norton L, Hannah AL and Hudis C (2011) HSP90 inhibition is effective in breast cancer: a phase II trial of tanespimycin (17-AAG) plus trastuzumab in patients with HER2-positive metastatic breast cancer progressing on trastuzumab. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 17 (15), 5132–5139.

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65 (1-2), 55–63.

Mosser DD and Morimoto RI (2004) Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene*. 23 (16), 2907–2918.

Mou H, Zheng Y, Zhao P, Bao H, Fang W and Xu N (2011) Celastrol induces apoptosis in non-small-cell lung cancer A549 cells through activation of mitochondria- and Fas/FasL-mediated pathways. *Toxicol In Vitro*. 25 (5), 1027–1032.

Noonan EJ, Place RF, Giardina C and Hightower LE (2007) Hsp70B' regulation and function. *Cell Stress Chaperones*. 12 (4), 393–402.

Nylandsted J, Gyrd-Hansen M, Danielewicz A, Fehrenbacher N, Lademann U, Høyer-Hansen M, Weber E, Multhoff G, Rohde M and Jäättelä M (2004) Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *The Journal of experimental medicine*. 200 (4), 425–435.

Nylandsted J, Rohde M, Brand K, Bastholm L, Elling F and Jäättelä M (2000) Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97 (14), 7871–7876.

Nylandsted J, Wick W, Hirt UA, Brand K, Rohde M, Leist M, Weller M and Jäättelä M (2002) Eradication of glioblastoma, and breast and colon carcinoma xenografts by Hsp70 depletion. *Cancer Res*. 62 (24), 7139–7142.

Onozuka H, Tsuchihara K and Esumi H (2011) Hypoglycemic/hypoxic condition in vitro mimicking the tumor microenvironment markedly reduced the efficacy of anticancer drugs. *Cancer Sci*. 102 (5), 975–982.

Osaki M, Oshimura M and Ito H (2004) PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 9 (6), 667–676.

Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang F-T, Zhou T-T, Liu B and Bao J-K (2012) Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell proliferation*. 45 (6), 487–498.

Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, Kumar S, Srinivasula SM, Kumar V, Weichselbaum R, Nalin C, Alnemri ES, Kufe D and Kharbanda S (2000) Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *The EMBO journal*. 19 (16), 4310–4322.

Peng B, Xu L, Cao F, Wei T, Yang C, Uzan G and Zhang D (2010) HSP90 inhibitor, celastrol, arrests human monocytic leukemia cell U937 at G0/G1 in thiol-containing agents reversible way. *Mol Cancer*. 9, 79.

Placzek WJ, Wei J, Kitada S, Zhai D, Reed JC and Pellecchia M (2010) A survey of the anti-apoptotic Bcl-2 subfamily expression in cancer types provides a platform to predict the efficacy of Bcl-2 antagonists in cancer therapy. *Cell death & disease*. 1, e40.

Plati J, Bucur O and Khosravi-Far R (2011) Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*. 3 (4), 279–296.

Portt L, Norman G, Clapp C, Greenwood M and Greenwood MT (2011) Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochim Biophys Acta*. 1813 (1), 238–259.

Rao SB and Sharma CP (1997) Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. *Journal of biomedical materials research*. 34 (1), 21–28.

Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maisse C, Daugas E, Zamzami N, Mak T, Jäättelä M, Penninger JM, Garrido C and Kroemer G (2001) Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol*. 3 (9), 839–843.

Rohde M, Daugaard M, Jensen MH, Helin K, Nylandsted J and Jäättelä M (2005) Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes Dev*. 19 (5), 570–582.

Ryhänen T, Hyttinen JMT, Kopitz J, Rilla K, Kuusisto E, Mannermaa E, Viiri J, Holmberg CI, Immonen I, Meri S, Parkkinen J, Eskelinen E-L, Uusitalo H, Salminen A and Kaarniranta K (2009) Crosstalk between Hsp70 molecular chaperone, lysosomes and proteasomes in autophagy-mediated proteolysis in human retinal pigment epithelial cells. *Journal of cellular and molecular medicine*. 13 (9B), 3616–3631.

Shaw RJ (2009) Tumor suppression by LKB1: SIK-ness prevents metastasis. *Science signaling*. 2 (86), pe55.

Sorger PK (1991) Heat shock factor and the heat shock response. *Cell*. 65 (3), 363–366.

Sreedhar AS and Csermely P (2004) Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. *Pharmacol Ther*. 101 (3), 227–257.

Sreedhar AS, Kalmár E, Csermely P and Shen Y-F (2004) Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS letters*. 562 (1-3), 11–15.

Stetler RA, Gan Y, Zhang W, Liou AK, Gao Y, Cao G and Chen J (2010) Heat shock proteins: cellular and molecular mechanisms in the central nervous system. *Progress in neurobiology*. 92 (2), 184–211.

Tamaoki T and Nakano H (1990) Potent and specific inhibitors of protein kinase C of microbial origin. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*. 8 (8), 732–735.

Tissières A, Mitchell HK and Tracy UM (1974) Protein synthesis in salivary glands of Drosophila melanogaster: relation to chromosome puffs. *Journal of molecular biology*. 84 (3), 389–398.

Travers J, Sharp S and Workman P (2011) HSP90 inhibition: two-pronged exploitation of cancer dependencies. *Drug Discov Today*.

Tsujimoto Y and Shimizu S (2005) Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ*. 12 Suppl 2, 1528–1534.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H and Reutelingsperger C (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 184 (1), 39–51.

Wang X (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 15 (22), 2922–2933.

Westerheide SD, Bosman JD, Mbadugha BN, Kawahara TL, Matsumoto G, Kim S, Gu W, Devlin JP, Silverman RB and Morimoto RI (2004) Celastrols as inducers of the heat shock response and cytoprotection. *J Biol Chem*. 279 (53), 56053–56060.

Whitesell L and Lindquist SL (2005) HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer*. 5 (10), 761–772.

Wu C (1995) Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annual review of cell and developmental biology*. 11, 441–469.

Xiang TX, Li Y, Jiang Z, Huang AL, Luo C, Zhan B, Wang PL and Tao XH (2008) RNA interference-mediated silencing of the Hsp70 gene inhibits human gastric cancer cell growth and induces apoptosis in vitro and in vivo. *Tumori*. 94 (4), 539–550.

Yang X, Wang J, Zhou Y, Wang Y, Wang S and Zhang W (2012) Hsp70 promotes chemoresistance by blocking Bax mitochondrial translocation in ovarian cancer cells. *Cancer Lett*. 321 (2), 137–143.

Yeh HY, Liu BH and Hsu SH (2012) The calcium-dependent regulation of spheroid formation and cardiomyogenic differentiation for MSCs on chitosan membranes. *Biomaterials*. 33 (35), 8943–8954.

Yue Z-G, Wei W, Lv P-P, Yue H, Wang L-Y, Su Z-G and Ma G-H (2011) Surface charge affects cellular uptake and intracellular trafficking of chitosan-based nanoparticles. *Biomacromolecules*. 12 (7), 2440–2446.

Zhang XD, Gillespie SK and Hersey P (2004) Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. *Mol Cancer Ther*. 3 (2), 187–197.

Zhou J, Schmid T, Frank R and Brüne B (2004) PI3K/Akt is required for heat shock proteins to protect hypoxia-inducible factor 1alpha from pVHL-independent degradation. *J Biol Chem*. 279 (14), 13506–13513.

Zong W-X, Ditsworth D, Bauer DE, Wang Z-Q and Thompson CB (2004) Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev*. 18 (11), 1272–1282.

7. PRILOG

Ovaj prilog sadrži tri znanstvena rada i 2 kongresna priopćenja objavljena u časopisima zastupljenim u bazama Current Contents ili Science Citation Index – Expanded koji obrađuju problematiku iznesenu u ovom doktorskom radu.

Znanstveni radovi:

- **Matokanović M**, Barišić K (2009) RNA interference as a New Tool in Therapeutics. *Food Technol Biotechnol.* 47 (3): 229-235
- **Matokanović M**, Rumora L, Popović-Grle S, Čepelak I, Čulić O, Barišić K (2012) Association of *hsp*70-2 (+ 1267A/G), *hsp*70-hom (+ 2437T/C), *HMOX*-1 (number of GT repeats) and *TNF-alpha* (+ 489G/A) polymorphisms with COPD in Croatian population. *Clin Biochem* 45(10-11): 59-63
- **Matokanović M**, Barišić K, Filipović-Grčić J, Maysinger D (2012) Hsp70 silencing with siRNA in nanocarriers enhances cancer cell death induced by the inhibitor of Hsp90. *Eur J Pharm Sci*. 10.1016/j.ejps.2013.04.001

Kongresna priopćenja:

- **Matokanović M,** Novak R, Barišić K. Effects of inducible Hsp70 on staurosporine induced apoptosis. *The FEBS Journal 276 (Supplement 1), Abstracts of the 34th FEBS Congress, Life's Molecular Interactions* (2009) 212-212
- **Matokanović M,** Barišić K, Hafner A, Filipović-Grčić J. Chitosan-TPP/siRNA mediated Hsp70 knockdown: potential cancer therapeutic. *The FEBS Journal (Abstracts of the 36th FEBS Congress). Volume 278, Supplement S1* (2011) 466-467

8. ŽIVOTOPIS

Mirela Matokanović rođena je 15. srpnja 1982. godine u Bosanskoj Gradišci, Bosna i Hercegovina. Osnovnu i srednju školu pohađala je i završila u Bjelovaru. Studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2001. godine. Diplomirala je u prosincu 2006. godine. Od srpnja 2007. godine zaposlena je kao znanstvena novakinja – asistentica na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Poslijediplomski doktorski studij Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta upisala je 2007. godine. Dio 2011., 2012. i 2013. godine provela je na studijskom boravku pri Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montreal, Kanada, u ukupnom trajanju od 13 mjeseci. Aktivno je sudjelovala i na brojnim domaćim i međunarodnim tečajevima i znanstvenim skupovima. Član je Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju te Hrvatskog društva za istraživanje raka. Koautor je tri znanstvena rada objavljena u časopisima zastupljenima u bazi Current Contents, 16 kongresnih priopćenja i jednog nastavnog teksta.

Objavljeni znanstveni radovi:

- **Matokanović M**, Barišić K (2009) RNA interference as a New Tool in Therapeutics. *Food Technol Biotechnol.* 47 (3): 229-235
- **Matokanović M**, Rumora L, Popović-Grle S, Čepelak I, Čulić O, Barišić K (2012) Association of *hsp*70-2 (+ 1267A/G), *hsp*70-hom (+ 2437T/C), *HMOX*-1 (number of GT repeats) and *TNF-alpha* (+ 489G/A) polymorphisms with COPD in Croatian population. *Clin Biochem* 45(10-11): 59-63
- **Matokanović M**, Barišić K, Filipović-Grčić J, Maysinger D (2012) Hsp70 silencing with siRNA in nanocarriers enhances cancer cell death induced by the inhibitor of Hsp90. *Eur J Pharm Sci*. 10.1016/j.ejps.2013.04.001

Kongresna priopćenja i sažeci u zbornicima skupova:

- Sabolić I, Herak-Kramberger CM, Ljubojević M, Kušan M, **Matokanović M,** Balen D, Kušec V, Brown D. Gender differences exist in the expression of AQP1 along the rat nephron. *The 4th International Conference on Aquaporins - Abstract Book* (2005) 83-83
- **Matokanović M.** RNA interference as a new tool in therapeutics. *Book of abstracts of 11th CEEPUS - Biomedicine Students' Council Summer University, Molecular diagnostics, Multidisciplinary approach* (2008) 47-47

- **Matokanović M,** Milovac R, Vukšić K, Rumora L, Barišić K. Hsp gene polymorphisms and COPD. *Book of abstracts of the HDBMB$_{2008}$, Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology with international participation* (2008) 105-105
- **Matokanović M.** Heat shock proteins polymorphisms and COPD. *Biochemia Medica 19 (2), Abstracts of the 20th Symposium of the Croatian Society of Medical Biochemistry* (2009) A10
- **Matokanović M,** Novak R, Barišić K. Effects of inducible Hsp70 on staurosporine induced apoptosis. *The FEBS Journal 276 (Supplement 1), Abstracts of the 34th FEBS Congress, Life's Molecular Interactions* (2009) 212-212
- **Matokanović M,** Malić A, Turk A, Čepelak I, Popović-Grle S, Barišić K. Hsp70, TNFalpha and hsp32 gene polymorphisms and COPD. *The FEBS Journal 276 (Supplement 1), Abstracts of the 34th FEBS Congress, Life's Molecular Interactions* (2009) 327-327
- **Matokanović M.** The great potential of RNA interference. *Book of Abstracts of the 4th Croatian Congress on Pharmacy with International Participation* (2010) 120-120
- **Matokanović M,** Hafner A, Filipović-Grčić J, Barišić K. RNA interference in drug development: nanotechnology and cell viability. *Book of abstracts of the HDBMB$_{2010}$, Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology with international participation* (2010) 128-128
- **Matokanović M,** Barišić K, Filipović-Grčić J, Hafner A, Maysinger D. Nanoparticles with siRNA targeted to Hsp70 mRNA effectively silence Hsp70 and promote apoptosis. *Book of Abstracts of the joint conference of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, the Canadian Society of Pharmacology and Therapeutics, Controlled Release Society - Canadian Chapter, and Natural Health Products Research Society of Canada: Multidisciplinary approaches to modern therapeutics* (2011) 140-140
- **Matokanović M,** Barišić K, Hafner A, Filipović-Grčić J. Chitosan-TPP/siRNA mediated Hsp70 knockdown: potential cancer therapeutic. *The FEBS Journal (Abstracts of the 36th FEBS Congress). Volume 278, Supplement S1* (2011) 466-467
- Herak-Kramberger C, **Matokanović M,** Ljubojević M, Breljak D, Brzica H, Vrhovac I, Sabolić I. Expression of Aquaporin 1 (AQP1) along the mammalian nephron; sex and species differences. *From molecules to life and back, FEBS 3+Meeting, Book of Abstracts* (2012) 193-193

- **Matokanović M,** Soldo F, Rumora L, Barišić K. Polymorphisms of TLR2 (Arg753Gln) and TLR4 (Asp299Gly) genes and COPD: The Croatian study. *From molecules to life and back, FEBS 3+Meeting, Book of Abstracts* (2012) 229-229
- **Matokanović M,** Grdić Rajković M, Križanović M, Volarić A, Somborac Bačura A, Čepelak I, Žanić Grubišić T, Rumora L. Frequency of Q192R, L55M and -108C>T polymorphisms of *PON1* and S311C polymorphism of *PON2* gene in chronic obstructive pulmonary disease: The Croatian study. *From molecules to life and back, FEBS 3+Meeting, Book of Abstracts* (2012) 230-230
- Somborac Bačura A, Rumora L, Meštrić I, Vukelić M, **Matokanović M,** Pancirov D, Popović-Grle S, Čepelak I, Žanić Grubišić T. MMP-9 concentration and MMP-9 gene polymorphisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *From molecules to life and back, FEBS 3+Meeting, Book of Abstracts* (2012) 237-237
- **Matokanović M,** Hafner A, Filipović-Grčić J, Maysinger D, Barišić K. Chitosan-based nanoparticles for siRNA mediated Hsp70 knockdown promote apoptosis in cancer cells. *Book of abstracts of the 9th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology* (2012)
- Galović R, Flegar-Meštrić Z, **Matokanović M,** Brajša K, Vidjak V, Barišić K. Toll-like receptors tlr-2 and tlr-4 gene polymorphisms in patients with cerebral atherosclerosis. *Biochemia Medica (Abstracts of the 2nd European Joint Congress of EFLM and UEMS and the 7th Congress of the Croatian Society for Medical Biochemistry and Laboratory medicine (CSMBLM): Laboratory Medicine at the Clinical Interface)* (2012) 22(3): A155-A156

Nastavni tekst:

- Žanić-Grubišić T, Barišić K, Rumora L, Grdić-Rajković M, **Matokanović M**, Somborac A. Vježbe iz Biokemije 2 za studente farmacije i medicinske biokemije, Framaceutsko biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2010.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu **Doktorski rad**
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

POSTTRANSKRIPCIJSKO UTIŠAVANJE STRESNIH PROTEINA POMOĆU siRNA NANOTERAPIJE

Mirela Matokanović

SAŽETAK

Stresni proteini (HSP) pripadaju skupini unutarstaničnih proteina koji su eksprimirani konstitutivno i kao odgovor na fizikalni odnosno biološki stres. U staničnom odgovoru na stres HSP imaju ulogu stabiliziranja proteina i peptida čime promoviraju preživljenje stanice. Hsp27 i Hsp70 inhibitori su različitih čimbenika apoptoze, dok je glavna uloga Hsp90 osiguravanje aktivnost čimbenika uključenih u proliferaciju stanica. Sposobnost stresnih proteina da zaustave proces programirane stanične smrti i potaknu proliferaciiju predstavlja bitan aspekt njihove povezanosti s malignom proliferacijom.

Glavni cilj ovog istraživanja bio je procijeniti ulogu Hsp70 u zaštiti od programirane stanične smrti u tumorskim stanicama. U tom smislu ispitana je uloga inducibilnog oblika Hsp70 u fiziološkim i stresnim uvjetima. Hsp70, induciran stresom, pokazao je značajnu ulogu u zaštiti tumorskih stanica od stanične smrti izazvane staurosporinom. U svrhu utišavanja ekspresije Hsp70 pri fiziološkim uvjetima korištena je tehnologija koja počiva na RNA interferenciji, specifičnoj razgradnji ciljne mRNA pomoću kratke siRNA uklopljene u nanočestice. Dizajnirane su kitozanske nanočestice za dostavu Hsp70 sljedno-specifične siRNA. U uvjetima *in vitro* kitozanske nanočestice pokazale su nisku toksičnost, učinkovito uklapanje Hsp70 siRNA te učinkovito utišavanje Hsp70. U staničnim linijama Jurkat i U251N utišavanje Hsp70 omogućeno pomoću Hsp70 siRNA uklopljene u kitozanske nanočestice, prouzročilo je smanjenje vijabilnosti ovih tumorskih staničnih linija.

U radu je ispitana i antitumorska učinkovitost istovremene inhibicije Hsp90, pomoću celastrola, i Hsp70 pomoću kitozanskih nanočestica s uklopljenom Hsp70 siRNA. Učinkovitost ovog pristup bila je značajna u dvodimenzionalnim modelima tumorskih staničnih linija, dok su u trodimenzionalnim modelima bile potrebne povećane koncentracije oba spoja/sustava kako bi se postiglo značajno smanjenje vijabilnosti tumorskih stanica.

Rad predstavlja temelje za daljnja istraživanja optimalnih nanosustava za dostavu sljedno-specifičnih siRNA za HSP te moguća ispitivanja istovremene inhibicije Hsp70 i Hsp90 u tumorskim modelima *in vivo*.

Rad je pohranjen u Centralnoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži:	151 stranica, 34 slike, 6 tablica i 115 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.
Ključne riječi:	tumor, stresni proteini, Hsp70, RNA interferencija, kitozanske nanočestice
Mentor:	**Dr. sc. Karmela Barišić**, *redovita profesorica, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*
Ocjenjivači:	**Dr. sc. Jelena Filipović-Grčić**, *redovita profesorica, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*
	Dr. sc. Dusica Maysinger, *redovita profesorica, Sveučilište McGill, Montreal, Kanada*
	Dr. sc. Sonja Levanat, *znanstvena savjetnica, Institut Ruđer Bošković*
Rad prihvaćen:	22. svibnja 2013.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Haematology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Doctoral thesis

POSTTRANSCRIPTIONAL SILENCING OF HEAT SHOCK PROTEINS USING siRNA NANOTHERAPY

Mirela Matokanović

SUMMARY

Stress proteins (HSP) are intracellular proteins expressed constitutively but can also be induced by various types of stress including environmental changes and non-stress conditions such as cell cycle, growth factors, development and differentiation. Under physiological conditions these proteins function as molecular chaperones that enable the function of different proteins. Hsp27 and Hsp70 appear to function at key regulatory control points in apoptotic process, whereas the major role of Hsp90 is protection from degradation for the major factors responsible for cell proliferation. The promotion of tumor cell survival is closely related to the ability of Hsp to inhibit programmed cell death during malignant proliferation.

The purpose and the main goal of the proposed study was to explore Hsp70's role in protection against programmed cell death in tumor cells. The role of stress induced Hsp70 and the role of Hsp70 within physiological levels was explored. Stress induced Hsp70 was found to efficiently protect tumor cells against cell death promoted with staurosporin. Hsp70 silencing was accomplished using the technology based on RNA interference, specific degradation of mRNA after binding with siRNA delivered into the cells with nanoparticles. Chitosan based nanoparticles for Hsp70 siRNA delivery were prepared. These showed low toxicity, efficient siRNA entrapment and efficient Hsp70 silencing. In Jurkat and U251N cell lines Hsp70 silencing with Hsp70 siRNA delivered in chitosan nanoparticles significantly decreased cell viability.

The antitumor efficiency of simultaneous inhibition of Hsp90 with celastrol and Hsp70 with chitosan nanoparticles entrapping Hsp70 siRNA was also explored. Significant reduction in cell viability was observed in two-dimensional cell cultures, while for the induction of comparable effect in three-dimensional cell cultures, U251N spheroids, higher concentration of both celastrol and Hsp70 siRNA were necessary.

The results of this work present important findings that could lead into the development of optimal delivery systems for siRNA and possible *in vivo* research of Hsp70/Hsp90 inhibition approach.

The thesis is deposited in the Central Library of Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 151 pages, 34 figures, 6 tables and 115 references. Original is in Croatian language.
Keywords: tumor, stress proteins, Hsp70, RNA interference
Supervisor: **Karmela Barišić**, **Ph.D.,** *Full Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb.*
Reviewers: **Jelena Filipović-Grčić**, **Ph.D.,** *Full Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb.*
Dusica Maysinger, **Ph.D.,** *Full Professor, McGill University, Montreal, Kanada*
Sonja Levanat, **Ph.D.,** *Scientific Advisor, Institut Ruđer Bošković*
Thesis accepted: May 22nd, 2013