

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno–matematički fakultet  
Biološki odsjek

**Maja Stulić**

Utjecaj povećane ekspresije gena p21<sup>WAF1/Cip1</sup> i različitih  
kemoterapeutika na proliferaciju stanica tumora debelog crijeva

**Diplomski rad**

Zagreb, 2010.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za eksperimentalnu terapiju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr.sc. Marijete Kralj i predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u svrhu stjecanja zvanja dipl.ing. biologije, smjer molekularna biologija.

Prije svega, želim se zahvaliti mentorici dr.sc. Marijeti Kralj što mi je omogućila da izradim diplomski rad u ugodnoj i stimulativnoj atmosferi u Laboratoriju za eksperimentalnu terapiju. Zahvaljujem se na pomoći, savjetima i pristupačnosti u svakom trenutku.

Zahvaljujem se dipl.ing. Marku Marjanoviću jer me naučio jako puno stvari i strpljivo i detaljno odgovarao na brojne upite. Hvala na ugodnim druženjima, bezbolnom ukazivanju na pogreške, pomoći i cjelodnevnoj pristupačnosti.

Zahvaljujem se suvoditeljici doc.dr.sc. Maji Matulić na pomoći i susretljivosti.

Zahvaljujem se kolegama na lijepo provedenim studentskim danima, posebno Ani K. i Ani L.

Veliko hvala mojim roditeljima na bezgraničnoj podršci i razumijevanju.

Maja

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### UTJECAJ POVEĆANE EKSPRESIJE GENA p21<sup>WAF1/Cip1</sup> I RAZLIČITIH KEMOTERAPEUTIKA NA PROLIFERACIJU STANICA TUMORA DEBELOG CRIJEVA

Maja Stulić  
Zavod za molekularnu medicinu  
Institut Ruđer Bošković, Bijenička 54, Zagreb

#### SAŽETAK

Protein p21 je primarno definiran kao inhibitor ciklin ovisnih kinaza te faktor koji u slučaju staničnog stresa (oštećenje DNA, oksidativni stres, kemoterapeutici i sl.) uzrokuje kočenje staničnog ciklusa. Noviji literaturni podaci ukazuju na važnu ulogu tog proteina u regulaciji replikacije DNA te vrlo kompleksnu ulogu u indukciji ili inhibiciji stanične smrti, koja ovisi o tipu stanica, staničnom kontekstu i vrsti tretmana koji se koristi na tumorskim stanicama. Zbog mnogoznačne i često kontradiktorne uloge proteina p21, izuzetno je važno proučiti mehanizme njegovog djelovanja nakon oštećenja DNA različitim kemoterapeuticima kako bi se odredio njegov utjecaj na kemosenzitivnost tumorskih stanica, što bi moglo dovesti do usmjerenijih oblika liječenja tumora. U ovom smo radu, pratili utjecaj pet poznatih kemoterapeutika te povećane ekspresije gena p21 na rast tumorskih stanica debelog crijeva HCT116, SW480, SW620 i CaCo-2. Povećanu ekspresiju proteina p21<sup>WAF1/Cip1</sup> postigli smo zaražavanjem stanica replikacijski nesposobnim adenovirusnim vektorima s ugrađenim genom p21<sup>WAF1/Cip1</sup> (Ad5CMV-p21), dok je kao kontrola korišten vektor s ugrađenim genom za  $\beta$ -galaktozidazu. Kako bismo ispitali utjecaj egzogenog proteina p21 na učinak kemoterapeutika, stanice smo nakon infekcije adenovirusnim vektorom tretirali kemoterapeuticima kamptotecinom, doksorubicinom i cisplatinom u različitom rasponu koncentracija. Preživljenje stanica pratili smo MTT testom, a ekspresiju proteina p21 metodom Western blot. Svi su spojevi usporavali rast tumorskih stanica, pri čemu je 5-fluorouracil pokazao najslabije, a kamptotecin najjače djelovanje. Pet dana nakon infekcije stanica vektorom Ad5CMV-p21 došlo je do značajnije inhibicije rasta staničnih linija HCT116 i SW620 u koncentracijama virusa višim od 60MOI. Povećana ekspresija gena p21<sup>WAF1/Cip1</sup> izrazito je pojačala učinak cisplatine i kamptotecina te vrlo slabo doksorubicina u stanicama HCT116 i SW620, dok je sličan, ali slabije izražen učinak pokazan u stanicama CaCo-2. S druge strane, iako su se stanice SW480 pokazale najosjetljivijima na kemoterapeutike, njihov učinak nije pojačan u kombinaciji s pojačanom ekspresijom proteina p21 u toj staničnoj liniji.

(54 stranice, 26 slika, 5 tablica, 70 literaturnih navoda, hrvatski jezik)

Ključne riječi: gen p21<sup>WAF1/Cip1</sup>, kemoterapeutici, tumor, stanični ciklus, adenovirusni vektori

Voditelj: dr.sc. Marijeta Kralj, viši znanstveni suradnik

Suvoditelj: doc.dr.sc. Maja Matulić

Ocjenjivači: dr.sc. Marijeta Kralj, viši znanstveni suradnik  
doc.dr.sc. Maja Matulić  
doc.dr.sc. Dubravka Hranilović

doc.dr.sc. Željka Vidaković-Cifrek  
Rad je prihvaćen: siječanj, 2010

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of science  
Department of biology

Diploma thesis

### INFLUENCE OF EXOGENOUS OVEREXPRESSION OF p21<sup>WAF1/Cip1</sup> GENE AND VARIOUS CHEMOTHERAPEUTICS ON PROLIFERATION OF COLON CANCER CELLS

Maja Stulic  
Division of Molecular Medicine  
Ruđer Bošković Institute, Bijenička 54, Zagreb

#### ABSTRACT

p21<sup>WAF1/Cip1</sup> protein is primarily defined as a cyclin dependent kinase inhibitor which induces cell cycle arrest under stress conditions (DNA damage, oxidative stress, anticancer agents...). Recent studies point out an important role of p21 protein in regulation of DNA replication as well as very complex part in induction or inhibition of cell death, which depends on treatment type, cell type and genetic context. Since p21<sup>WAF1/Cip1</sup> revealed equivocal and somewhat controversial role, it is a major issue to elucidate mechanism of its action after DNA damage caused by common chemotherapeutics in order to establish the influence of p21 to cell chemosensitivity, which could give rise to more targeted tumor therapy. In our experiments we investigated the effects of five common chemotherapeutics and overexpression of exogenous p21<sup>WAF1/Cip1</sup> on the growth of colon cancer cell lines HCT116, SW480, SW620, CaCo-2. Enhanced expression of protein p21<sup>WAF1/Cip1</sup> was accomplished by infection with replication-defective adenoviral recombinant vector Ad5CMVp21, whereas Ad5CMVβ-gal was used as a control vector. In order to evaluate the effect of exogenous protein p21<sup>WAF1/Cip1</sup> on the sensitivity to chemotherapeutics, we treated cells with chemotherapeutics camptothecin, doxorubicin and cisplatin at different concentration range after infection with adenoviral vectors. Cells' viability was monitored by MTT assay, and the expression of p21 protein by Western blot method. All of the tested chemotherapeutics inhibited growth of the tumor cells whereby 5-fluorouracil revealed least and camptothecin strongest effect. We detected significant growth inhibition of HCT116 and SW620 cells five days after infection with Ad5CMV-p21 at MOI 60. Furthermore, p21<sup>WAF1/Cip1</sup> gene overexpression in HCT116 and SW620 cells distinctly enhanced cisplatin and camptotecin influence, whereas it had faint effect on doxorubicin influence. We detected similar but weaker effect of p21 on CaCo-2 cells. On the other hand, even though SW480 appeared to be the most sensitive to chemotherapeutics, their effect wasn't enhanced when combined with p21<sup>WAF1/Cip1</sup> overexpression in this cell line.

(54 pages, 26 figures, 5 tables, 70 references, original in Croatian language)

Keywords: gene p21<sup>WAF1/Cip1</sup>, chemotherapy, tumor, cell cycle, adenoviral vectors

Supervisors: dr.sc. Marijeta Kralj, Senior Research Associate  
doc.dr.sc. Maja Matulić, assistant professor

Rewievers: dr.sc. Marijeta Kralj  
doc.dr.sc. Maja Matulić  
doc.dr.sc. Dubravka Hranilović  
doc.dr.sc. Željka Vidaković-Cifrek

## SADRŽAJ

<b>UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>Onkogeni i tumor supresor geni</b> .....	<b>2</b>
<b>Stanični ciklus</b> .....	<b>3</b>
<b>p21<sup>Waf1 / Cip1</sup></b> .....	<b>5</b>
<b>Uloga proteina p21 u apoptozi</b> .....	<b>8</b>
Indukcija apoptoze .....	8
Inhibicija apoptoze .....	9
<b>Kemoterapeutici</b> .....	<b>11</b>
<b>CILJ RADA</b> .....	<b>14</b>
<b>MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>15</b>
<b>Stanične linije i kemoterapeutici</b> .....	<b>15</b>
<b>Održavanje staničnih kultura</b> .....	<b>17</b>
<b>Brojanje stanica</b> .....	<b>17</b>
<b>Određivanje antiproliferativnog učinka spojeva</b> .....	<b>18</b>
<b>Zaražavanje stanica adenovirusima</b> .....	<b>20</b>
<b>Određivanje ekspresije proteina metodom Western blot</b> .....	<b>21</b>
Nasađivanje i liza stanica .....	21
Određivanje koncentracije proteina .....	21
Elektroforeza proteina.....	22
Western analiza .....	23
Denzitometrijska analiza proteinskih vrpca.....	24
<b>REZULTATI</b> .....	<b>25</b>
<b>Utjecaj kemoterapeutika na proliferaciju tumorskih stanica</b> .....	<b>25</b>
<b>Određivanje IC<sub>50</sub> vrijednosti citostatika</b> .....	<b>28</b>
<b>Učinak Ad5CMVp21 na rast stanica karcinoma kolona</b> .....	<b>29</b>
<b>Western analiza</b> .....	<b>40</b>
<b>RASPRAVA</b> .....	<b>43</b>
<b>ZAKLJUČAK</b> .....	<b>49</b>
<b>LITERATURA</b> .....	<b>50</b>

## UVOD

Normalna funkcija tkiva se održava ravnotežom između stanične proliferacije i apoptoze. Rak kao bolest nastaje kao posljedica gubitka ove ravnoteže tj. nekontrolirane proliferacije stanica i izostanka apoptoze (Liu i sur.2003). Sve maligne neoplazme su posljedica mutacija genetskog materijala transformiranih stanica. Genetske mutacije mogu nastati kao posljedica raznih fizičkih i kemijskih karcinogena kao što su UV zračenje, benzopireni, dimetilnitrozoamin, aflatoksini i dr., te virusi. Mutacijama su kod malignih neoplazmi pogođeni onkogeni i tumor supresor geni. Za nastanak tumora nije dovoljna jedna mutacija, nego je potrebno nekoliko sukcesivnih mutacija, a da pritom stanica održi optimalnu genetičku nestabilnost. Razvoj tumora odnosno kancerogeneza se događa u nekoliko stupnjeva koji se nazivaju inicijacija, promocija i progresija tumora (Vincent i Gatenby 2008). Inicijacija započinje mutacijom koja pogađa jednu stanicu i potiče proliferaciju monoklonske populacije stanica. Tijekom promocije se raznim staničnim faktorima potiče daljnja proliferacija stanica dok se kroz fazu progresije akumuliraju dodatne mutacije i epigenetičke promjene koje omogućuju anigogenezu i metastaziranje. U znanstvenoj je zajednici prihvaćena činjenica da ranoj onkogenezi prethodi šest promjena u jednoj stanici (Zitvogel i sur 2006). Stanice raka pokazuju specifične osobine kao što su poremećaji diobe i rasta, rast u većoj gustoći, smanjena potreba za faktorima rasta, gubitak kontaktne inhibicije, angiogeneza, invazivan rast i metastaziranje, monoklono podrijetlo te heterogenost stanica.

Rak debelog crijeva je treći najzastupljeniji i najsmrtonosniji oblik raka ([www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)). Zastupljenost ove vrste tumora je u korelaciji s dobi oboljelih i u 90% slučajeva se javlja u osoba starijih od 50 godina (Rajamanickam i Agarwal 2008). Prve neoplastične lezije nađene kod raka debelog crijeva su tzv. ACF (od *eng. aberrant crypt foci*), nakupina mukoznih stanica s podebljanim slojem epitela kod kojih je došlo do genetičkih promjena. Nakupljanjem mutacija uključujući i mutaciju gena p53 dolazi do razvoja adenokarcinoma odnosno raka debelog crijeva (Cappell 2007).

## Onkogeni i tumor supresor geni

Danas se zna i prihvaća da je rak „bolest gena“. Uz nastanak raka vezujemo dvije skupine gena:

1) Protoonkogeni su normalni geni koji reguliraju procese proliferacije, diferencijacije i razvoja stanice. Mutirani protoonkogeni se nazivaju onkogeni, a najčešće su rezultat kromosomskih translokacija, amplifikacije gena ili intragenskih mutacija koji utječu na regulaciju aktivnosti produkta gena (Vogelstein i Kinzler 2004). Do povećanja aktivnosti može doći zbog mutacije ili deregulacije ekspresije, ovisno o tipu gena. Mutacijom uglavnom postaju konstitutivno aktivni, ili se aktiviraju u uvjetima u kojima je divlji tip gena neaktivan. Takva promjena potiče stanicu na rast i proliferaciju (Vogelstein i Kinzler 2004).

2) Tumor supresor geni imaju raznolike uloge u fiziologiji stanice koje uključuju regulaciju staničnog ciklusa preko kontrolnih točaka, regulaciju apoptoze, detekciju i popravak DNA, ubikvitinaciju i razgradnju proteina, diferencijaciju i migraciju stanica te mitogeno signaliziranje (Sherr 2004). U te su procese uključeni kao transkripcijski faktori (p53), inhibitori staničnog ciklusa (CKI-inhibitori ciklin ovisnih kinaza), korepresori transkripcije (pRb), proteinske kinaze, sudionici u popravku DNA molekule (BRCA1, BRCA2) i dr. Ukoliko dođe do inaktivacije tumor supresor gena, gubi se kontrola nad nekim od navedenih procesa i stanice mogu postati tumorske. Stanice normalno funkcioniraju u prisutnosti samo jednog funkcionalnog alela tumor supresor gena što znači da mora doći do dvije nezavisne promjene na svakom alelu kako bi došlo do inaktivacije gena. Kod brojnih obiteljskih tumora utvrđena je prisutnost mutacija u jednom alelu tumor supresor gena u zametnim stanicama. Ukoliko dođe do gubitka heterozigotnosti, odnosno somatske mutacije na normalnom alelu, gubi se aktivnost tumor supresor gena koja može rezultirati kancerogenezom. Najpoznatiji tumor supresor gen, zvan i „čuvar genoma“ je gen p53 koji je ujedno i jedan od najčešće mutiranih gena u stanicama raka (Hollstein i sur. 1996). Protein p53 je transkripcijski faktor kodiran TP53 genom koji se nalazi na kraćem kraku kromosoma 17 (17p13.1) (Matlashewski i sur. 1984). TP53 je fosfoprotein kojeg izgrađuju 393 amino-kiseline i ima sedam domena. U normalnoj stanici se nalazi u niskoj koncentraciji jer se aktivno razgrađuje posredstvom E3 ubikvitin ligaze MDM2, međutim stanični stres kao npr. oštećenje DNA, hipoksija ili nedostatak nutrijenata,

uzrokuje stabilizaciju p53 putem postranslacijskih modifikacija (Olivier i sur. 2009). Također, ekspresija gena p53 može biti inducirana i posredstvom nekih onkogeno kao što su E1A, Myc i E2F (Vogelstein i sur 2000). Onkogen *Ras* preko MAPK signalne kaskade potiče ekspresiju p53 i pRb proteina koji posreduju u staničnom starenju indukcijom transkripcije PML-a (*engl. promyelocytic leukemia protein*), gena p21 i brojnih faktora koji djeluju na strukturu kromatina (Lowe i sur. 2004; Ferbeyre i sur. 2000).

Stabilan p53 djeluje kao transkripcijski faktor i posreduje u ekspresiji brojnih ciljnih gena koji su čimbenici u kontroli staničnog ciklusa, popravku DNA, apoptozi i staničnom starenju (Vogelstein i sur. 2000a). Osim što je TP53 je najvažniji uzvodni regulator p21<sup>Waf1/Cip</sup> gena, djeluje i na transkripciju proteina iz porodice proapoptotskih faktora Bcl2 kao što su *puma, noxa, bid* i *bax*. Nadalje, potiče ekspresiju receptora signala i efektoru stanične smrti poput kaspaze-6, Apaf-1, PIDD (potreban za aktivaciju kaspaze-2), DR5 (receptor za TRAIL, *engl. tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*), Fas/CD95 i mnogih drugih (Lowe i sur. 2004).

## Stanični ciklus

Razvoj mnogostaničnog organizma započinje dijeljenjem jedne oplođene jajne stanice. Na tom putu stanice prolaze kroz diferencijaciju, stanično starenje i umiranje, a pritom im je jedna od najvažnijih funkcija dijeljenje i prijenos genetičkog materijala na stanice kćeri. Stanice imaju precizno regulirani ciklus kroz koji se odvija rast stanice, sinteza DNA, popravak oštećenja DNA, dijeljenje jezgre i citoplazme što rezultira s dvjema identičnim stanicama kćeri. Stanični ciklus je podijeljen na faze koje su precizno regulirane i prijelaz iz jedne u drugu je ograničen tzv. kontrolnim točkama. Faze kroz koje stanica prolazi u ciklusu su:

G<sub>1</sub>– U ovoj fazi stanica se priprema za sintezu DNA te je pod utjecajem mitogena i faktora rasta metabolički jako aktivna pri čemu se sintetiziraju enzimi potrebni za S fazu i stanica raste.

S – Tijekom S faze dolazi do replikacije DNA i duplikacije centrosoma.

G<sub>2</sub>– Stanica u G<sub>2</sub> fazi opet ubrzano raste, kromosmi u jezgri postaju sve vidljiviji te se odvija sinteza proteina potrebnih za mitozu

M– Tijekom mitotske faze dolazi do podjele sestrinskih kromatida na dva kromosoma nakon čega slijedi i citokineza kojom se dijele jezgra, citoplazma, organeli te plazmatska membrana i nastaju dvije stanice kćeri.

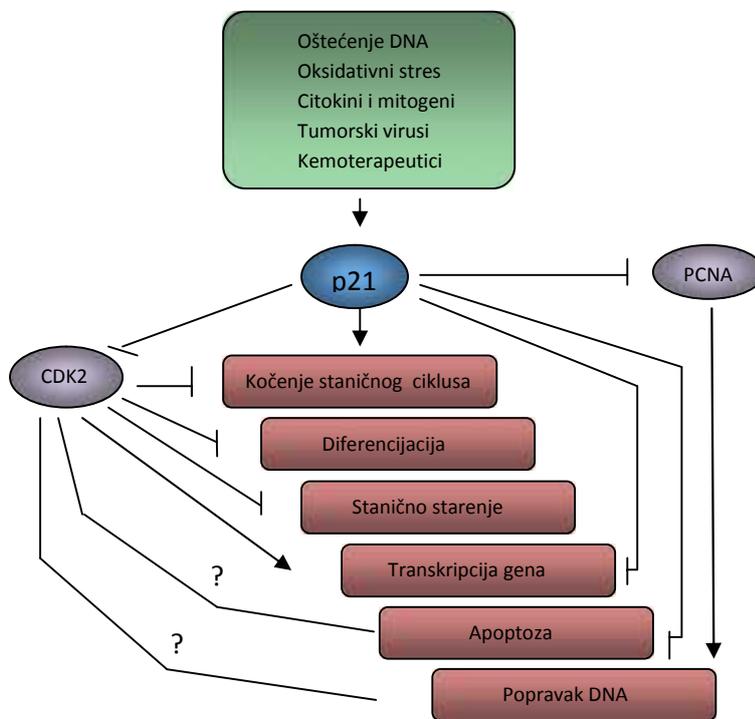
Stanični ciklus je strogo kontroliran preko složene mreže ekstracelularnih i intracelularnih regulatora i kontrolnih točaka (*engl. checkpoint*). Ulazak u novu fazu je uvjetovan završenom i pravilnom prethodnom fazom. Napredovanje kroz faze staničnog ciklusa je posredovano cikličnim nakupljanjem i aktivacijom serin - treoninskih ciklin ovisnih kinaza (CDK) (Abukhdeir i Park 2008) koji stvaraju komplekse s proteinima ciklinima. Aktivnost kompleksa CDK/ciklin mijenja se fosforilacijom odnosno defosforilacijom CDK podjedinice (Viallard i sur. 2001). Porodicu ciklina, s obzirom na faze ciklusa, možemo podijeliti na „G1 cikline“ čija je akumulacija ključna za prolazak iz G1 u S fazu i na „mitotičke cikline“ koji su uključeni u kontrolu prijelaza G2/M i mitoze. U G1 ubrajamo cikline C, D<sub>1-3</sub> i E, dok u mitotičke G2 cikline ubrajamo cikline A i B (Viallard i sur. 2001). Nakon mitogene stimulacije u G1 fazi započinje nakupljanje ciklina D, a potom i stvaranje kompleksa CDK4,6/ciklin D koji fosforilacijom inaktivira pRb protein i tako oslobađa E2F transkripcijski faktor koji utječe na sinzezu proteina potrebnih za S fazu (Sherr 1996). E2F transkripcijski faktor potiče sintezu ciklina E koji stvara kompleks CDK2/ciklin E koji je nužan za prelazak iz G1 u S fazu (Geng i sur. 1996). Ciklin A čiju ekspresiju također potiče faktor E2F, stvara kompleks CDK2/ciklin A koji je pristutan u visokoj koncentraciji tijekom S-faze i omogućava progresiju kroz S fazu. Sinteza ciklina B, kao i stvaranje kompleksa CDK1/ciklin B zvanog i faktor poticanja sazrijevanja MPF (*engl. maturation promoting factor*) počinje u S fazi, raste kroz G2 fazu i nastavlja se kroz mitozu (Ito 2000). Ciklin B aktivira CDK1 kinazu koja fosforilira proteine koji posreduju u promjenama strukture jezgre i citoskeleta koje su nužne za segregaciju kromosoma (Yu and Yao 0). Degradacija kompleksa MPF se odvija ubikvitinskim putem i nužna je za inaktivaciju kinaze i izlazak iz mitoze (Anon 1999).

**p21<sup>Waf1 / Cip1</sup>**

Gen p21<sup>Waf1/Cip1</sup> je prvi otkriven i opisan među inhibitorima ciklin ovisnih kinaza (CDK) (el-Deiry i sur. 1993; Noda i sur. 1994). Kodiran je genom CDKN1A koji se nalazi na šestom kromosomu na lokusu 6p22.1, a sastoji se od tri egzona od kojih se prvi ne translacija. Protein se sastoji od 164 aminokiselina i ima molarnu masu od 21kDa (el-Deiry i sur. 1993). p21<sup>WAF1/Cip1</sup> pripada u Cip/Kip obitelj inhibitora ciklin kinaza (CKI) skupa s p27<sup>Kip1</sup> i p57<sup>Kip1</sup>. (Ball 1997). Cip/Kip porodica proteina pokazuje homologiju sekvenci na amino terminusu. Upravo je N- terminus odgovoran za inhibiciju ciklin/cdk aktivnosti dok je C-terminalna domena p21 odgovorna za interakciju s PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*). p21<sup>WAF1/Cip1</sup> pripada u skupinu tumor supresor gena, što je genetički prvi put dokazano kada je uočeno da p21<sup>-/-</sup> miševi spontano razvijaju tumore (Martín-Caballero i sur. 2001). Protein p21 pokazuje brojne i značajne efekte na proliferaciju stanice, regulaciju gena, apoptozu, stanično starenje te popravak DNA što ga čini jednim od interesantnijih proteina za daljnje istraživanje (slika 1). Funkcija ovog proteina je regulacija odnosno kočenje ciklusa stanice u G1/S i G2/M kontrolnoj točki (Bates i sur. 1998). Ekspresija proteina p21 regulirana je na transkripcijskoj razini putevima koji su ovisni i neovisni o p53, a može biti regulirana i na post-transkripcijskoj razini (Gartel i Tyner 1999). U stanicama s nefunkcionalnim genom p53 je postignuta aktivacija p21 gena nakon stimulacije citokinima i čimbenicima rasta kao što su primjerice EGF, PDGF, FGF ili TGF-β, te različitim induktorima diferencijacije (Gartel i sur. 1996). Nadalje, gen p21<sup>WAF1/Cip1</sup> na transkripcijskoj razini može biti aktiviran neovisno o p53 posredstvom transkripcijskih faktora E2F, STAT, AP2, C/EBPα ili C/EBPβ te posredstvom tumor supresora BRCA1, Wnt-1 i TGF-β (Kraljevic Pavelic i sur. 2008).

Kao što je već rečeno, tumor supresor protein p53 je inducibilni transkripcijski faktor koji se aktivira i stabilizira nakon oštećenja DNA i sudjeluje u transaktivaciji brojnih gena uključenih u regulaciju i kontrolu staničnog ciklusa uključujući i gen p21 (Vogelstein, Lane, i Levine 2000). Veže se za DNA regiju 24kb uzvodno od kodirajuće sekvence p21<sup>Waf1/Cip1</sup> (el-Deiry i sur. 1993). Ranije studije su pokazale da p21 uzrokuje zastoj u staničnom ciklusu i rastu stanice u G1 fazi u ovisnosti o transkripcijskom faktoru p53.

Novija istraživanja ukazuju na ulogu p21 kao vrlo bitnog efektora nekoliko tumor supresorskih puteva koji sprječavaju proliferaciju stanice i p53 neovisnim putem (Abbas i Dutta 2009).

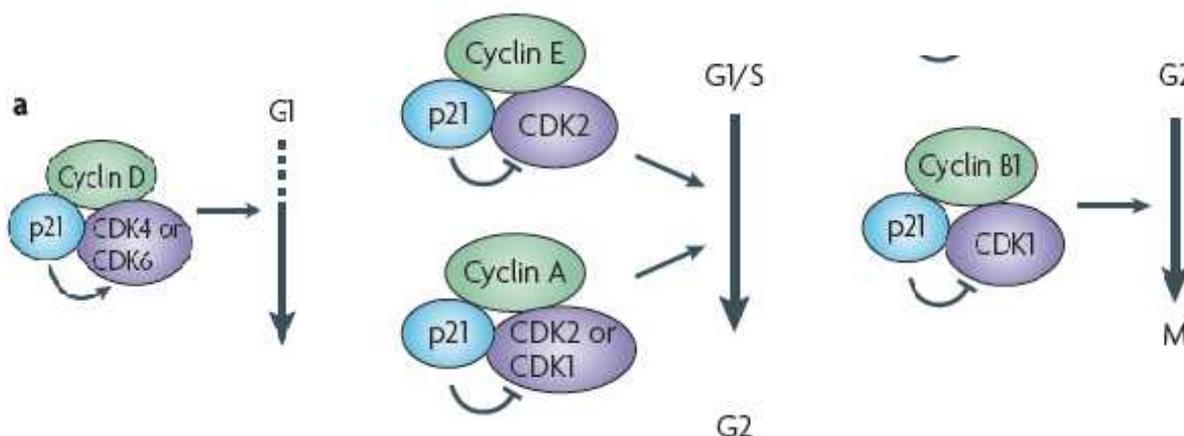


**Slika 1. Središnja uloga p21 u odgovoru na stanični stres.** p21 sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa, diferencijaciji, staničnom starenju, transkripciji, apoptozi te popravku DNA.

Primarna uloga proteina p21 je vezanje i inhibicija ciklin ovisnih kinaza ( Cdk 2 i cdk1) te posljedično zaustavljanje staničnog ciklusa (Harper i sur. 1993). Međutim, pokazano je da cdk inhibitori p21 (cip1), p27(kip) te p57(kip2) potpomažu vezanje CDK4 i ciklina D u funkcionalnu kinazu budući da spontano vezanje nije efikasno. Pri niskim koncentracijama p21 potpomaže slaganje aktivne kinaze, dok pri višim koncentracijama inhibira kompleks CDK2/ciklin E i CDK4,6/ciklin D (LaBaer i sur. 1997).

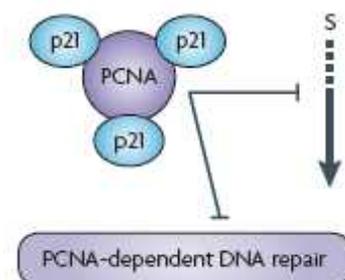
Protein p21 inhibira CDK2/ciklin E kompleks što za posljedicu ima inhibiciju fosforilacije Rb proteina ovisne o CDK2 (Zhu i sur. 1995) Ukoliko Rb protein nije fosforiliran, on se veže na transkripcijske faktore iz porodice E2F. Inhibicijom E2F sprječava se transkripcija E2F ovisnih gena S faze i nema progresije kroz S fazu staničnog ciklusa. p21 se veže i na CDK1-ciklin A ili CDK2-ciklin A što također onemogućava prolaz kroz S fazu u G2 (Abbas i Dutta 2009).

Interakcija p21 s kompleksom CDK1/ciklin B1 inhibira kinaznu aktivnost onemogućavajući progresiju kroz G2 fazu (slika 2). Proteinske fosfataze cdc25A i cdc25C defosforiliraju, a time i aktiviraju CDK1/ciklin B kompleks i tako omogućuju prolaz u mitozu. Protein p21 se na kompleks veže preko sličnog proteinskog motiva i tako „natječe“ za vezanje s cdc25 fosfatazama (Zhu i sur. 1995).



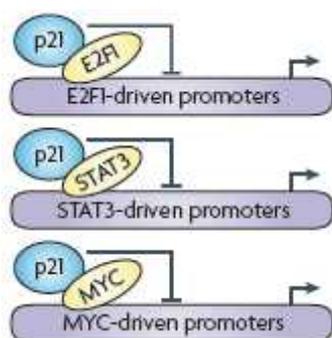
**Slika 2. Interakcija proteina p21 s kompleksima CDK/ciklin kroz faze staničnog ciklusa.** Protein p21, kao Inhibitor ciklin ovisnih kinaza, ima mogućnost zaustavljanja staničnog ciklusa u svim fazama. Da bi došlo do inhibicije kinazne aktivnosti CDK/ciklin kompleksa p21 mora stupiti u interakciju s obje domene: regulatornom( ciklin) i katalitičkom (CDK). Preuzeto od Abbas i Dutta 2009

C-terminalna domena p21 proteina odgovorna je za interakciju, a time i inhibiciju proliferirajućeg faktora PCNA. Uslijed te interakcije dolazi do inhibicije ciklusa u S fazi (slika 3) (Abbas i Dutta 2009). PCNA je kofaktor odnosno podjedinica DNA-polimeraze  $\delta$ . Ima funkciju spojnice DNA (engl. *DNA clamp*) tj. obuhvati DNA te sprječava disocijaciju enzima i DNA. Povezivanje s PCNA može biti praćeno fosforilacijom, proteolizom, afinitetnom kompeticijom te modifikacijom PCNA ubikvitinom (Moldovan i sur 2007).



**Slika 3. Interakcija p21 proteina s proliferirajućim faktorom PCNA (proliferating cell nuclear antigen)(Abbas i Dutta 2009).**

Protein p21 konkurrira za interakciju s PCNA s brojnim proteinima koji sudjeluju u sintezi i popravku DNA. Tako p21-PCNA inhibira popravak krivo sparenih baza (*mismatch repair*) jer je pokazano da PCNA ulazi u interakciju s MLH1 i MSH2 prije resinteze DNA (Umar i sur. 1996). Protein p21 također inhibira i popravak baza izrezivanjem (engl. *BER base excision repair*) sprječavajući stimulaciju endonukleaze FEN1, DNA ligaze 1 i DNA polimeraze  $\delta$  ovisnu o PCNA(Tom i sur. 2001).



**Slika 4. Inhibicija transkripcijskih faktora E2F1, STAT3 i MYC direktnom interakcijom s p21. Preuzeto iz Abbas i Dutta 2009.**

Osim navedenih interakcija s cdk/ciklin kompleksima i PCNA, p21 ulazi u druge brojne interakcije. Direktnim vezanjem može inhibirati aktivnost transkripcijskih faktora E2F1, STAT3 i MYC (Abbas i Dutta 2009)(slika 4). Vezanje p21 na myc box II regiju c-myc proteina blokira stvaranje c-Myc-Max kompleksa i tako suprimira transkripcijsku aktivaciju E box-a pomoću c-myc-a. Međutim, c-myc se veže direktno na C-terminus p21 i djelomično umanjuje inhibitorni efekt p21 na proliferirajući faktor PCNA, a time i na sintezu DNA. p21 i c-myc se nalaze u svojevrsnoj ravnoteži jer c-myc pogoduje replikaciji DNA

kompetirajući za vezanje p21 s PCNA, dok p21 represira transkripcijsku aktivnost vezanjem na c-myc.

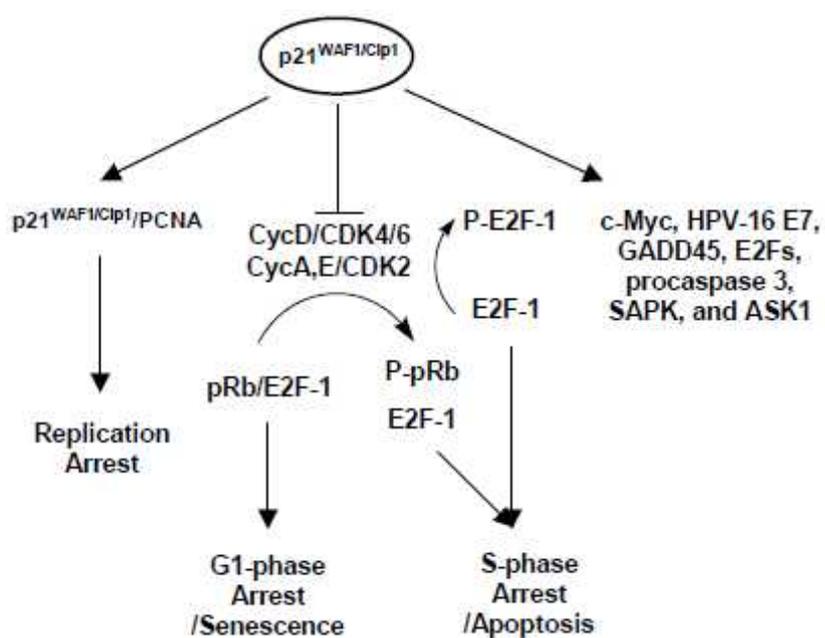
## Uloga proteina p21 u apoptozi

### Indukcija apoptoze

Utjecaj p21 proteina na apoptozu je poprilično polemičan. U pojedinim tipovima stanica u određenim uvjetima može inducirati apoptozu, dok kod drugih štiti stanicu apoptoze posredovane p53 (Kralj i sur. 2003). Još nije potpuno jasno kako p21 inducira apoptozu, međutim u nekim slučajevima pokazano je kako se apoptoza podudara s indukcijom p21 (Abbas i Dutta 2009). Pokazano je da se apoptoza inducirana proteinom p21 javlja uglavnom u tumorskim stanicama s mutiranim i nefunkcionalnim genom p53 (Liu i sur. 2003), te da je u nekim slučajevima p21 u interakciji s PCNA nužan za apoptozu induciranu kemoterapeutikom (Chopin i sur. 2004). Kod apoptoze posredovane proteinom p21 nije zamijećena aktivacija *BAX2* i *Bcl-2* gena koji su regulatori apoptoze (pojačana ekspresija u p53 induciranoj apoptozi), što navodi na to da se apoptoza posredovana p21 proteinom odvija drugim mehanizmom (Ramondetta i sur. 2000).

## **Inhibicija apoptoze**

Velik broj eksperimentalnih dokaza upućuje na činjenicu da protein p21 inhibira apoptozu. Jedan od načina inhibicije apoptoze je stvaranje kompleksa s prokaspazom 3 (ne stvara kompleks s kaspazom 3), kaspazom 8 i kaspazom 10. Tim putem također štiti stanicu od apoptoze posredovane Fas proteinom (Suzuki i sur. 1998). Još jedan način inhibicije je direktna interakcija s MYC i E2F1 (na str.9) koji induciraju ekspresiju proapoptotskih faktora. p21 može inhibirati apoptozu i interakcijom s regulatorima apoptoze- SAPK (od *engl. stress activated protein kinase*) i ASK1 (od *engl. apoptosis signal regulating kinase*). Osim direktne interakcije s medijatorima apoptoze, dokazano je da p21 kod nekih staničnih linija utječe na ekspresiju anti-apoptotskih i mitogenih faktora, što povezuje p21 s karcinogenezom i progresijom tumora (Chang i sur. 2000). Također, u stanicama s nižim stupnjem DNA oštećenja se pokazalo da p21 sprečava p53 posredovanu indukciju apoptoze. Rezultati radova ukazuju da dvostruka funkcija p21 gena- tumor supresorska ili onkogen, odnosno proapoptotska ili antiapoptotska ovisi o genetičkom okruženju i stehiometriji pojedinih faktora u stanici, te o staničnoj liniji i samom kemoterapeutiku, odnosno mehanizmu kojim on zaustavlja rast i sprečava ili uzrokuje apoptozu (Liu, Bishop, i Liu 2003). Treba spomenuti kako se čini da p21 nema bitnu ulogu u tumorigenezi te da su mutacije p21 gena izuzetno rijetke u humanim tumorima (Deng i sur. 1995).



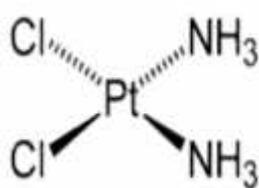
**Slika 5. Nizvodne interakcije p21 proteina.** Na slici su prikazane interakcije proteina p21 koje rezultiraju kočenjem rasta ili replikacije DNA te sprečavaju ili induciraju apoptozu, a javljaju se kao odgovor na stanični stres kao što je oštećenje DNA, antitumorski agensi, tumorski virusi, hipoksija i sl.

## Kemoterapeutici

Danas su u primjeni brojni lijekovi odnosno kemijski spojevi koji na razne načine sprječavaju širenje i razvoj malignih neoplazija. Najčešće se koriste spojevi koji utječu na proces DNA sinteze ili dijeljenja stanice. Uspjeh kemoterapije uvelike ovisi on načinu na koji kemoterapeutik uzrokuje staničnu smrt, a da pritom minimalno djeluje na normalne stanice (Liu i sur. 2003). Kemoterapeutici se dijele u skupine na osnovu mehanizma djelovanja na alkilirajuće agense, antimetabolite, antitumorske antibiotike, biljne alkaloida, steroidne hormone te inhibitore topoizomeraza. Navest ćemo neke od najpoznatijih kemoterapeutika koji se razlikuju prema mehanizmu djelovanja, a koje smo koristili u ovom radu:

**Paklitaksel** je mitotski inhibitor koji se koristi u terapiji raka. Spoj onemogućava dinamičku nestabilnost mikrotubula stabilizirajući GDP- vezani tubulin u mikrotubulu, tako da ne dolazi do depolimerizacije tubula ni nakon hidrolize GTP-a na vrhu. Paklitaksel se veže na  $\beta$ -podjedinicu mikrotubula. Kompleks paklitaksel/mikrotubul je fiksiran i time je onemogućena normalna funkcija mikrotubula u transportu celularnih komponenata. Osim toga, imaju ulogu i u pozicioniraju kromosome tijekom replikacije i razdvajanja na stanice kćeri. Osim interakcije s mikrotubulima, pokazalo se da se paklitaksel veže i na bcl-2 (inhibitor apoptoze), i tako inducira apoptozu (Kumar 1981).

**Cisplatina** je kemoterapeutik koji sadrži platinu i jedini je anorganski kompleks koji se koristi se za liječenje raka u kombinaciji sa zračenjem ili drugim kemoterapeutcima. Ulaskom u stanicu, cisplatina se hidrolizira i stvara reaktivni kompleks  $[Pt(NH_3)_2Cl_2]$ . Kompleks se koordinira s DNA preko N-7 atoma adenina ili guanina. Još jednom dolazi do hidrolize i istiskivanja klora što omogućava vezanje platine i na drugu purinsku bazu. Nastali cisplatina/DNA adukt narušava veze među bazama i uzrokuje izvijanje  $\alpha$ -heliksa te



lomove DNA molekule. Ovo DNA oštećenje se ne može ispraviti mehanizmom popravka DNA i vodi apoptozu (<http://pubs.acs.org>).

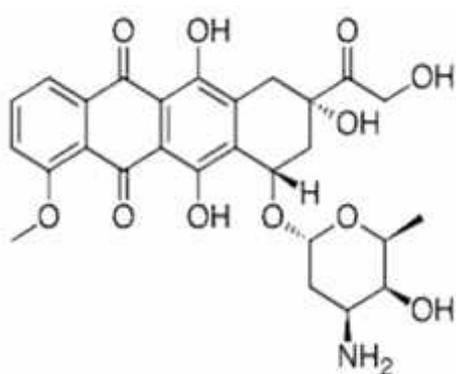
Cisplatina omogućava nastanak unutarlančane i međulančane veze u nukleinskim kiselinama i proteinima.

Slika 6. Molekula cisplatine

**Doksorubicin** pripada u antraciklinskim antibioticima koji se koriste u kemoterapiji i djeluju na tri načina ([www.cancernetwork.com](http://www.cancernetwork.com)):

- inhibicija sinteze DNA ili RNA interkalacijom između baza
- inhibicija topoizomeraze II što onemogućava relaksaciju superzavijene DNA
- stvaranje slobodnih radikala kisika što oštećuje membrane i DNA

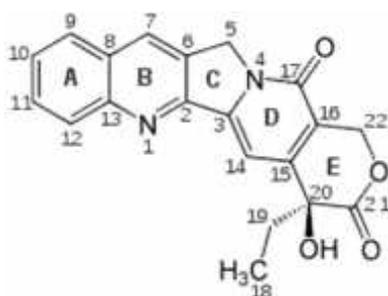
Planarni aromatski dio se interkalira između dva para baza u DNA, dok se šećer smješta u mali utor u DNA i reagira s bočnim parom (Frederick i sur. 1990). U stanicama tumora



prostate snažno potiče ekspresiju p53 proteina, dok se ekspresija p21 proteina pri niskim koncentracijama doksorubicina povećava, a pri višim smanjuje. Apoptoza u stanicama je utoliko veća što je ekspresija p21 manja (Martinez i sur. 2000). Doksorubicin u malim koncentracijama inhibira topoizomerazu II, a u visokim se interkalira u DNA (Schmidt i sur. 2001).

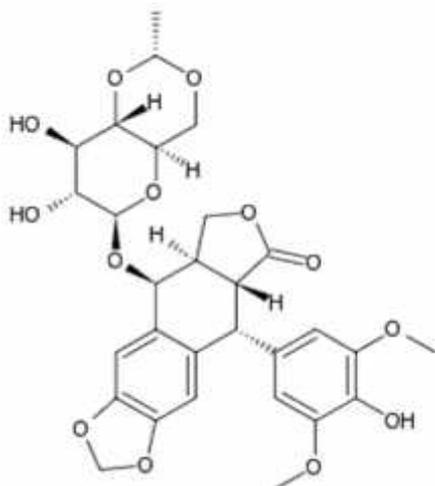
Slika 7. Molekula doksorubicina

**Kamptotecin** je alkaloid koji je inhibitor enzima DNA topoizomeraze I. Vodikovim vezama ulazi u stabilnu interakciju s kompleksom DNA/topoizomeraza I. Time se sprječava religacija DNA i uzrokuje oštećenje koje vodi u apoptozu.



Slika 8. Molekula kamptotecina

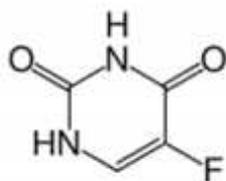
Najbitniji dio molekule je E- prsten koji ulazi u trostruku interakciju s enzimom. Hidroksilna skupina na C-20 stvara vodikovu vezu s aspartatom 533. Lakton stvara dvije vodikove veze s amino grupom arginina 364. D-prsten interagira s +1 citozinom i stabilizira kompleks topoizomeraza I-DNA. Toksičnost kamptotecina se bazira na pretvaranju jednolančanih lomova u dvolančane tijekom S-faze ciklusa (Pommier i sur. 2003)



**Etopozid** je biljni alkaloid i uz doksorubicin, najpoznatiji inhibitor topoizomeraze II. Uloga topoizomeraze II je odvijanje superzavijene DNA stvaranjem dvolančanih lomova. Posljedica vezanja i inhibicije topoizomeraze II su stvaranje stabilnog kompleksa spoj-enzim-DNA (engl. *cleavage complex*). Takvi kompleksi se nakupljaju što uzrokuje trajne lomove u DNA molekuli koji uzrokuju staničnu smrt (Nitiss 2009; Baldwin i Osheroff 2005).

Slika 9. Molekula etopozida

**5-fluorouracil** je analog pirimidina i inhibitor timidilat sintaze koji pripada skupini lijekova pod nazivom antimetaboliti. Timidilat sintaza metilira dUMP (deoksiuridin monofosfat) u dTMP (timidin monofosfat), i njegovom inhibicijom se blokira sinteza timidina, a time DNA replikacija. S obzirom da je analog pirimidina, ugrađuje se u DNA i RNA uzrokujući kočenje staničnog ciklusa i apoptozu.



Slika 10. Molekula 5-fluorouracila

## **CILJ RADA**

Protein p21 je primarno definiran kao inhibitor ciklin ovisnih kinaza te faktor koji u slučaju nepravilnosti u stanici (stres, oštećenje DNA i sl.) uzrokuje kočenje staničnog ciklusa. Detaljnija istraživanja su ukazala na važnu ulogu proteina p21 u regulaciji replikacije DNA te vrlo kompleksnu i kontradiktornu ulogu u indukciji ili inhibiciji stanične smrti. Razvojem metoda unosa DNA u stanicu te *in vitro* mutagenze intenzivno se počeo istraživati utjecaj prekomjerne ekspresije proteina p21, odnosno njegovog nedostatka na vijabilnost tumorskih stanica. Cilj našega rada je bio ustanoviti utjecaj povećane ekspresije egzogenog proteina p21 na rast staničnih linija tumora debelog crijeva ljudi: HCT116, SW480, SW620 i CaCo-2. Ove stanice izabrane su kao model zbog njihovog različitog statusa endogeno eksprimiranih proteina p53 i p21 te stupnja invazivnosti. Nadalje, željeli smo utvrditi utjecaj prekomjerne ekspresije proteina p21 na modulaciju učinka poznatih kemoterapeutika cisplatine, doksorubicina i kamptotecina u stanicama tumora debelog crijeva. Navedena tri kemoterapeutika različitim mehanizmima uzrokuju oštećenje DNA molekule. Ekspresiju egzogenog proteina p21 potigli smo korištenjem adenovirusnih vektora s ugrađenim genom p21<sup>WAF1/Cip1</sup> (Ad5CMVp21), rast stanica mjerili smo kolorimetrijskim testom (MTT), a ekspresiju proteina p21 pratili smo metodom Western blot.

## MATERIJALI I METODE

### Stanične linije i kemoterapeutici

U pokusima smo koristili četiri stanične linije tumora debelog crijeva i šest kemoterapeutika koji se primjenjuju u konvencionaloj terapiji:

**SW480** stanična linija je uspostavljena od stanica primarnog adenokarcinoma kolona. Nađena je G→A mutacija u kodonu 273 gena p53 što u proteinu rezultira supstitucijom Arg→His, te mutacija C→T u kodonu 309 istoga gena, koja rezultira Pro→Ser supstitucijom. Stanice eksprimiraju više p53 proteina od normalnih stanica i pozitivne su za ekspresiju *c-myc*, *H-ras*, *N-ras*, *myb*, *sis* i *fos* onkogeni. Ne eksprimiraju metaloproteinazu matrilisin koja se povezuje s invazivnošću tumora. Stanice proizvode citokin GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony stimulating factor*) i imaju mutaciju u kodonu 12 *ras* protoonkogeni ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)).

**SW620** su metastatske epitelne stanice kolorektalnog adenokarcinoma. Izolirane su iz metastaza u limfnom čvoru istog pacijenta iz kojeg su izolirane stanice primarnog tumora- SW480. Stanice sintetiziraju malu količinu karcinoembrijskog antigena (CEA) i jako su tumorigenične. Nađena je G→A mutacija u kodonu 273 p53 gena što rezultira Arg→His supstitucijom. Detektirana je ekspresija *c-myc*, *K-ras*, *H-ras*, *N-ras*, *Myb*, *sis* i *fos* onkogeni ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)).

**CaCo-2** su epitelne stanice kolorektalnog adenokarcinoma. Stanice u kulturi spontano diferenciraju i stvaraju monosloj stanica koji morfološki i funkcionalno ima slične karakteristike zrelog enterocita (Sambuy i sur. 2005). Zbog toga se ova linija osim za istraživanje tumora koristi i za proučavanje stanične permeabilnosti za potencijalni lijek, kemijskih karakteristika pasivne difuzije difuzije lijeka, toksičnosti pojedinog lijeka i drugih efekata na transepitelni transport (Meunier i sur. 1995).

**HCT116** su stanice kolorektalnog karcinoma izolirane iz epitela kolona. Sintetiziraju karcinoembrijski antigen (CEA) i keratin. Stanice eksprimiraju TGF beta 1 (transforming growth factor beta 1) i TGF beta 2. Stanična linija ima mutaciju u kodonu 13 *ras*

protoonkogeni i može se koristiti kao pozitivna kontrola za PCR testiranje mutacija u ovom kodonu ([www.atcc.org](http://www.atcc.org))

**Tablica 1. Stanične linije tumora debelog crijeva koje su korištene u istraživanju te pripadajući status proteina p53 i p21**

	p53 status	p21 status	tip stanica
HCT116	p53 <sup>wt</sup>	Ekspresija endogenog p21 proteina	Primarni tumor debelog crijeva
CaCo-2	p53 <sup>mut</sup>	Diferenciraju spontano; raste im bazalna ekspresija p21	Primarni tumor debelog crijeva
SW620	p53 <sup>mut</sup>	Nema bazalne ekspresije p21 proteina	Mezastaza tumora debelog crijeva iz limfnog čvora
SW480	p53 <sup>mut</sup>	Ekspresija endogenog p21 proteina	Primarni tumor debelog crijeva

**Tablica 2. Kemoterapeutici korišteni u pokusima**

	Molarna masa	Kratice spojeva	djelovanje
ETOPOZID	Mr=588,6	Eto	Inhibicija enzima topoisomerase II
KAMPTOTECIN	Mr=348,35	CMP	Inhibicija enzima DNA topoisomerase I
CIS-PLATINA	Mr=300,06	Cis	Uzrokuje izvijanje i lomove $\alpha$ -heliksa
DOKSORUBICIN	Mr=543,52	Doxo	DNA interkalator
5-FLUOROURACIL	Mr=130,08	5-FU	Analog pirimidina

## Održavanje staničnih kultura

Pokuse smo izvodili na četiri stanične linije tumora debelog crijeva: SW620, SW480, CaCo-2 i HCT116. Nakon odležavanja stanica čuvanih na  $-190^{\circ}\text{C}$ , stanice smo uzgajali u bocama za stanične kulture od  $75\text{ cm}^2$  i  $175\text{ cm}^2$  u hranjivoj tekućoj podlozi DMEM (eng. *Dulbecco's modified Eagle's medium*, Gibco, SAD) sa streptomycinom ( $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) i penicilinom ( $100\text{ U/ml}$ ) te s dodatkom 10% telećeg seruma (FCS eng. *Fetal calf serum*, Gibco, SAD) te 2 mM L-glutamin. Stanice smo uzgajali u *in vitro* uvjetima u inkubatoru u vlažnoj atmosferi pri  $37^{\circ}\text{C}$  i 5%  $\text{CO}_2$ . Stanice smo presađivali nakon što bi postigle 80-90% konfluentnosti i koristili za pokuse. Iz boce smo uklonili medij i stanice dva puta ispirali s po 5 ml tripsina (0.25%, Gibco Bre, Life technologies) pri čemu smo tijekom drugog ispiranja u boci ostavili 1 ml tripsina. Uloga tripsina, kao proteolitičkog enzima, je odvajanje stanica jedne od druge i od podloge. Tripsin specifično cijepa proteine iza karboksilnih skupina aminokiselina lizina i arginina. Stanice smo potom inkubirali dok se nisu odvojile od podloge. Nakon toga smo dodali 5ml svježeg podloge te resuspendirali stanice pomoću pipete. Pritom serum inhibira djelovanje tripsina. Veći dio suspenzije stanica bi potom koristili za pokus, a manju količinu stanica bi vratili u bocu i dodali 10 ml svježeg medija kako bi stanice dalje rasle.

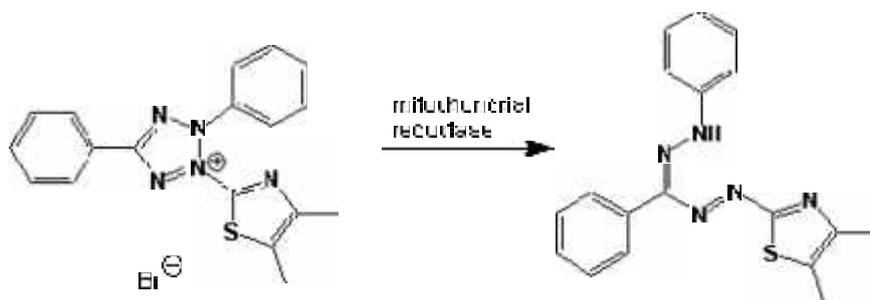
## Brojanje stanica

Broj živih stanica u suspenziji određivali smo pomoću tripanskog modrila pod svjetlosnim mikroskopom. Metoda se temelji na činjenici da žive stanice imaju intaktnu staničnu membranu preko koje se boja, u ovom slučaju tripansko modrilo, izbacuje iz stanice dok mrtve stanice nemaju tu mogućnost i zato se intenzivno bojaju. U tu svrhu potrebno je prvo stanice resuspendirati u epruveti. Potom se u bunarić pločice s 96 bunarića doda 80  $\mu\text{l}$  0.05% tripanskog modrila i 20  $\mu\text{l}$  suspenzije stanica te dobro resuspendira pomoću mikropipete. 20  $\mu\text{l}$  suspenzije se stavi pod pokrovno stakalce Neubauerove komorice. Komorica se stavi pod mikroskop na povećanje objektiva 10x pri čemu se vidi 16 identičnih kvadrata. Brojali smo žive stanice odnosno stanice koje se nisu obojile plavo. Kada je izbrojano 4x16 kvadrata ukupan broj stanica (n) se izračuna korištenjem slijedećeg izraza:

$$\text{Broj st/ml} = (n/4) \cdot 5 \times 10^4 \text{ st/ml}$$

### Određivanje antiproliferativnog učinka spojeva

Za određivanje djelovanja spoja na preživljenje tumorskih stanica te  $IC_{50}$  vrijednosti koristili smo kolorimetrijski test-MTT. MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid] jest reagens koji se koristi za mjerenje preživljenja stanica. Dehidrogenaze u živim stanicama reduciraju žuti 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid u ljubičasti formazan koji je netopiv u vodi.



Slika 11. Prevođenje MTT-a u ljubičasti formazan djelovanjem mitohondrijskih reduktaza

Za određivanje preživljenja stanice smo nasadivali na pločice sa 96 bunarića u koncentracijama od 3000 stanica po bunariću te u volumenu od 150  $\mu$ l. Suspenziju određenog volumena i broja stanica smo pripremali u sterilnoj kadici te pipetom s osam nastavaka nasadivali na pločicu. Pri tome smo jednu kolonu ostavljali praznu za slijepu probu. Na jednoj pločici smo ispitivali djelovanje četiri različita spoja u pet različitih koncentracija. Također smo nasadili posebnu pločicu s jednom kolonom od svake stanične linije koja se koristi za mjerenje preživljenja netretiranih stanica na početku pokusa (tzv. „nulti“ dan pokusa). Stanice su inkubirane 24 h kako bi se prihvatile za podlogu i počele rasti. „Nulti“ dan pločicu s početnom kontrolom smo podvrgnuli MTT testu, a potom propremili pet razrjeđenja spojeva u DMEM-u. Svaki spoj smo dodavali u tetraplikatu i u slijedu pet koncentracija po 50  $\mu$ l po jažici, a kontrolnim stanicama u zadnjoj koloni na pločici smo dodali 50  $\mu$ l medija. Nakon 72 h stanice smo podvrgavali MTT testu kako bi utvrdili stopu rasta stanica. Sa pločica smo odstranili medij i potom dodali 40  $\mu$ l po jažici MTT reagensa koji se priprema razrjeđivanjem 10x matične otopine (200 mg MTT otopljeno u 40 mL PBS-a) u DMEM-u s 10% FCS-a u omjeru 1:9. Pločice smo omotali folijom i stavili u inkubator na četiri sata, nakon čega smo u jažice nakapavali po

160  $\mu$ l DMSO-a. DMSO se koristi kao otapalo za inače u vodi netopivi formazan. Pločice se protresu, kako bi se kristali formazana što bolje otopili te se na čitaču mikrotitarskih pločica (Multiskan EX, Thermo Scientific, SAD) očitaju vrijednosti apsorbancije pri valnoj duljini od 570 nm pri kojoj formazan maksimalno apsorbira svjetlost.

### Određivanje inhibicije proliferacije i IC<sub>50</sub> vrijednosti

Intenzitet obojenja formazanskog produkta izražen apsorbancijom (engl. *Optical density*, OD) je izravno proporcionalan broju živih stanica. Postotak rasta se računa prema sljedećim izrazim:

Kemijski spoj pokazuje citostatički učinak ako je:

$\overline{OD_{test}} - \overline{OD_{tzero}} \geq 0$ , i tada se postotak rasta računa prema izrazu:

$$\text{postotak rasta (\%)} = 100 \times \frac{(\overline{OD_{test}} - \overline{OD_{tzero}})}{\overline{OD_{ctrl}} - \overline{OD_{tzero}}}$$

Kemijski spoj pokazuje citotoksični učinak ako je:

$\overline{OD_{test}} - \overline{OD_{tzero}} \leq 0$ , i tada se postotak rasta računa prema izrazu:

$$\text{postotak rasta (\%)} = 100 \times \frac{\overline{OD_{test}} - \overline{OD_{tzero}}}{\overline{OD_{zero}}}$$

Značenje kratica:

$\overline{OD_{test}}$  - srednja vrijednost optičke gustoće stanica 72 h nakon tretmana

$\overline{OD_{tzero}}$  - srednja vrijednost optičke gustoće netretiranih stanica („Nulti“ dan)

$\overline{OD_{ctrl}}$  - srednja vrijednost netretiranih stanica nakon 72 h (kontrola, 72 h)

Nakon određivanja postotka rasta za svaku pojedinačnu koncentraciju, crtaju se krivulje odnosa koncentracije spoja i postotka rasta (od engl. *dose-response*). Iz tih krivulja smo linearnom regresijom izračunali IC<sub>50</sub> vrijednosti.

## Zaražavanje stanica adenovirusima

Za unošenje p21<sup>waf1/cip1</sup> gena u stanice koristili smo replikativno defektan rekombinantni adenovirus (Ad5CMV-p21) s ugrađenim genom koji kodira za protein p21 (Introgen Therapeutics Inc., Houston, TX, USA). Ovaj vektor sadrži promotor citomegalovirusa (CMV), p21 cDNA te SV40 poliadenilacijski signal. Kao kontrolni vektor koristili smo Ad5CMV- $\beta$ -gal koji umjesto regije E1A ima ugrađen gen za enzim  $\beta$ -galaktozidazu. Virusni vektori se umnožavaju u komplementirajućim stanicama HEK 293. Nakon umnožavanja, viruse je potrebno pročititi centrifugiranjem u gradijentu cezijeveg klorida te im odrediti titar (broj aktivnih virusnih čestica (PFU - od eng. *plaque forming unit*) u mililitru. Virusi koje smo koristili u pokusima bili su predhodno umnoženi i pročišćeni te im je određen titar: titar Ad5CMV-p21 virusa je bio  $5 \times 10^{10}$  pfu/ml, dok je titar AdCMV- $\beta$ -gal bio  $2,5 \times 10^{10}$  pfu/ml. Stanice smo nasađivali u pločice s 96 bunarića, u koncentraciji od 3000 stanica po jažici i potom stavili u inkubator na 24 sata. Razrjeđenja virusa smo pripremili u DMEM-u obogaćenom s 2% FCS-a. Stanice smo zaražavali različitim MOI (od eng. *multiplicity of infection*) što se definira kao broj infektivnih virusnih čestica po stanici. U jažice smo dodavali virus u volumenu od 50  $\mu$ l. Nakon 70 minuta u inkubatoru (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>), u jažice smo dodavali 150  $\mu$ l otopine testiranih spojeva, ili čisti obogaćeni medij.

## Određivanje ekspresije proteina metodom Western blot

### Nasađivanje i liza stanica

Pokus smo započeli nasađivanjem stanica u pločice sa 6 bunarića u koncentraciji od  $2 \times 10^5$  i volumenu od 2ml po bunariću. Nakon 24 sata stanice smo inficirali rekombinantnim adenovirusnim vektorom s ugrađenim genom p21<sup>WAF1/Cip1</sup> u volumenu od 650 $\mu$ l, i koncentraciji 60 MOI. Otopinu virusa smo pripremili u 2% DMEM-u. Nakon inkubacije u trajanju od 70min vakuum sisaljkom smo odsisali otopinu virusa i dodali 2ml otopine kemoterapeutika koje smo pripremili u otopini 10% DMEM-a i u koncentracijama koje odgovaraju IC<sub>50</sub> vrijednosti za pojedini spoj. Nakon 24 h i 48 h stanice smo lizirali te potom izolirali proteine. Pločice smo stavili na led kako bismo usporili reakcije nakon lize stanica te spriječili degradaciju proteina. Prvo smo odsisali medij, te potom dva puta isprali s po 1 ml PBS-a. Nakon što smo odsisali PBS, dodali smo pufer za lizu (50 mM TRIS (pH=7.6), 150 mM NaCl, 2mM EDTA, 1%NP40, 0.5% TRITONx-100) u volumenu od 200  $\mu$ l po bunariću. Stanice smo zatim odvojili od podloge pomoću strugalice, prebacili u epruvete od 1.5 ml i ostavili 10 minuta na ledu da se liziraju. Da bi dobili izolat proteina i uklonili ostatke liziranih stanica, epruvete smo centrifugirali 10 minuta pri 13200 rpm-a pri temperaturi od 4°C. Dobiveni supernatant smo prebacili u nove epruvete od 1.5 ml i potom odredili koncentracije proteina u uzorcima.

### Određivanje koncentracije proteina

Za određivanje koncentracija proteina koristili smo metodu određivanja koncentracije proteina po Lowryu (D<sub>C</sub> Protein Assay, Reagent A, B i S, Bio-Rad, SAD). Metoda se zasniva na reakciji između proteina i bakra u lužnatom mediju te naknadnoj redukciji Folinovog reagensa. Kao standard za određivanje baždarnog pravca smo koristili razrijeđenja (1.5; 1; 0,75; 0,5; 0,25 ) govedeg albumina iz seruma (Bovine gamma globulin, 2mg/ml, Bio-Rad, SAD). Na pločice s 96 bunarića smo nanosili 5  $\mu$ L pojedinog razrijeđenja standarda, 5  $\mu$ L odgovarajućeg uzorka te 5  $\mu$ l pufera u jažicu za slijepu probu. U iste jažice smo zatim dodali 25  $\mu$ L otopine A` (lužnata otopina bakrova tartarata), te 200  $\mu$ L otopine B

(razrjeđeni Folinov reagens). Nakon 15 min absorbancija se mjeri pri valnoj duljini od 750 nm (Multiskan EX, Thermo Scientific, SAD). Koncentracija proteina (mg/mL) se određuje prema baždarnom pravcu dobivenom standardnom krivuljom.

### Elektroforeza proteina

Proteine iz staničnih lizata smo razdvojili poliakrilamidnom gel elektroforezom. Sastav gela detaljno je opisan u tablicama 3 i 4. Gel za sabijanje služi koncentriranju proteinskog uzorka u oštru vrpцу što omogućava bolje razdvojene i oštre vrpce u gelu za razdvajanje.

**Tablica 3. Kemikalije potrebne za pripremu 12% gela za razdvajanje**

12% gel za razdvajanje	Volumen /ml
H <sub>2</sub> O	3,3
30%-tna otopina akrilamida i bisakrilamida (u omjeru 29:1)	4,0
1,5 M Tris (pH=8,8)	2,5
10% SDS	0,1
10% amonij persulfat	0,1
TEMED	0,004

**Tablica 4. Kemikalije potrebne za pripremu 5% gela za sabijanje**

5% gel za sabijanje	Volumen / ml
H <sub>2</sub> O	3,4
30%-tna otopina akrilamida i bisakrilamida ( u omjeru 29:1)	0,83
1,0 M Tris ( ph=6,8)	0,63
10% SDS	0,05
10% amonij persulfat	0,05
TEMED	0,005

Prije nanošenja na gel, u epruvete s 30μl uzorka smo dodali po 6 μl pufera za nanošenje uzoraka- 6xPLD, engl. *protein loading dye* (6,0 mL glicerola, 1,2 g SDS-a, 0,31g DTT-a, 1,25 mL 0,5 M pufera Tris pH 6,8, boja bromfenol plavo, nadopunili s vodom do ukupnog volumena 10 μL). Tako pripremljene uzorke smo denaturirali 10 minuta na 70°C te potom nanosili na gel. Koristili smo dva proteinska standarda (Precision Plus Protein, WesternC standards, BIO RAD; Precision Plus Protein Standards BIO RAD) . Elektroforeza se odvijala u puferu sastava: TRIS-HCl (3g/L), glicin (14,4 g/L), 10% SDS (1g/L) u reH<sub>2</sub>O, pri naponu

struje od 100 mV u gelu za sabijanje, koju smo povećali na 150 mV nakon prelaska uzoraka u gel za razdvajanje.

### **Western analiza**

Nakon razdvajanja proteina SDS elektroforezom, slijedi transfer istih na nitroceluloznu membranu (Bio Rad, SAD). Prije samoga transfera membranu i gel smo složili između sloja filter papira (Whatman papir, Bio Rad, SAD) i spužvica koje smo fiksirali u nosaču kojeg smo potom postavili u kadicu. Transfer proteina s gela na membranu se odvija na 200 mV, 80 minuta, u kadici s puferom za transfer (200 mL/L metanola, 14,4 g/L glicina i 3,03 g/L tris baze u deH<sub>2</sub>O).

Nakon transfera membrane smo blokirali 45 minuta u 5% nemasnom mlijeku otopljenom u TBST puferu (20 mol/dm<sup>3</sup> pufera Tris·HCl (pH 7,5), 0,15 mol/dm<sup>3</sup> NaCl, 0,005% Tween-20 u deH<sub>2</sub>O). Potom smo membrane pakirali u prozirnice u koje smo dodavali 2 ml otopine antitijela na p21 protein (1:150; Mouse Anti-human p21 0,5 mg/ml BD Pharmingen) u nemasnom mlijeku, odnosno na  $\alpha$ -tubulin i stavili na +4°C preko noći. Sljedeći dan membrane smo ispirali TBST-om 3 puta po 10 minuta kako bi se uklonilo nespecifično vezano protutijelo, a zatim ponovno pakirali u prozirnice i dodali po 2ml otopine sekundarnog antitijela (horse radish peroxidase sheep anti mouse, GE healthcare) u 5% nemasnom mlijeku (1:3000). Inkubacija sa sekundarnim antitijelom je trajala 60 minuta uz konstantno miješanje na klackalici nakon čega smo membrane ponovo ispirali 3 puta po 10 min u TBST-u. Nakon ispiranja na membranu smo nanijeli reagens (SuperSignal West Pico Chemiluminiscent substrate, Thermo Scientific, SAD; SuperSignal West Femto Trial Kit, Thermo Scientific, SAD; Western Lightning Chemiluminisence Reagent Plus, PerkinElmer LAS, Inc., SAD) koji se nakon 5 min ukloni. Signal smo potom vizualizirali na filmu (Lumi-film chemiluminescent detection film, Roche) nakon ekspozicije (duljinu ekspozicije smo svaki put određivali po iskustvu). Koristili smo uređaj za razvijanje Curix 60 (AGFA).

### **Denzitometrijska analiza proteinskih vrpca**

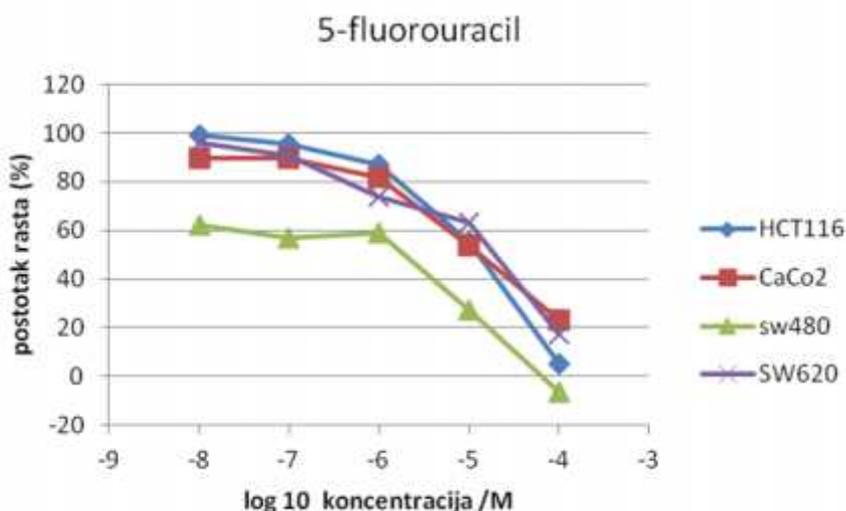
Intenzitet proteinskih vrpca  $\alpha$ -tubulina i proteina p21 smo analizirali metodom denzitometrije. U tu svrhu smo se koristili programom *ImageJ* koji je dostupan na stranici američkog Nacionalnog instituta za zdravlje i ima mogućnost kvantificiranja intenziteta vrpca dobivenih Western analizom (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>). Rezultate smo izrazili kao relativnu intenzitet vrpca proteina p21 u odnosu na relativni intenzitet vrpca  $\alpha$ -tubulina iz istog uzorka.

## REZULTATI

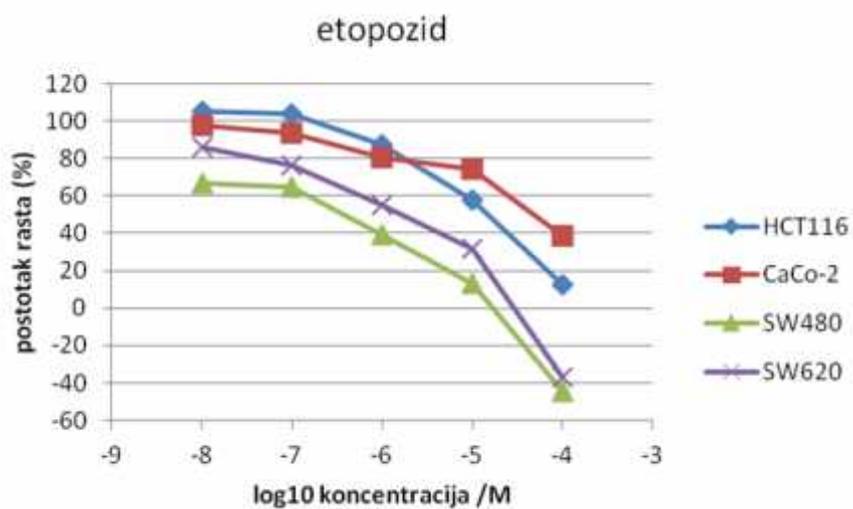
### Utjecaj kemoterapeutika na proliferaciju tumorskih stanica

Pokuse smo započeli određivanjem utjecaja pet kemoterapeutika na proliferaciju stanica tumorskih staničnih linija HCT116, SW480, SW620 i CaCo-2 koristeći MTT test vijabilnosti stanica. Grafički smo prikazali ovisnost postotka živih stanica (na grafu postotak rasta, *engl. percentage of growth*) o koncentraciji kemoterapeutika. Postoci rasta stanica koji su prikazani na ordinatama krivulja znače slijedeće:

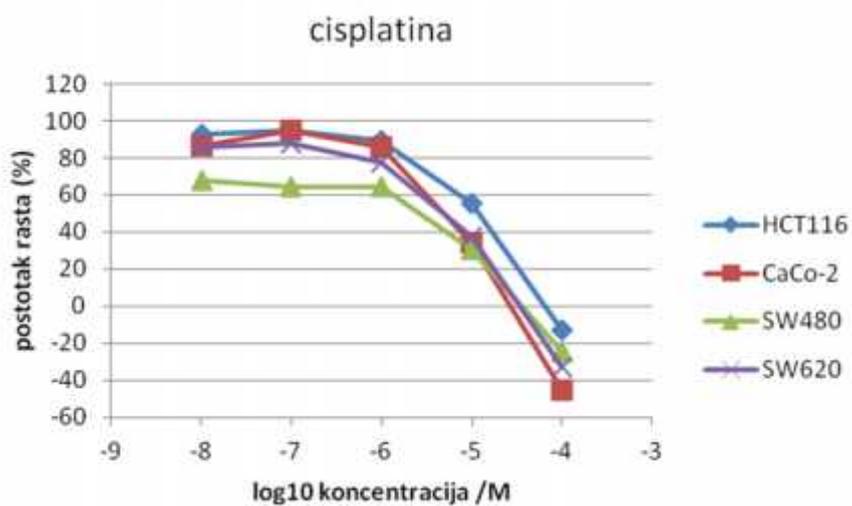
- postotak rasta od 100% je jednak vijabilnosti kontrolnih stanica 72 sata nakon nasađivanja
- postotak rasta od -100% znači da su sve stanice postotak rasta od 0% znači da je rast stanica u potpunosti inhibiran. Vijabilnost stanica u tom je slučaju jednaka onoj prije tretmana (u pokusu označeno kao 0.dan)
- pozitivan postotak rasta (0 do 100%) ukazuje na citostatski učinak kemoterapeutika
- negativan postotak rasta (0 do -100%) ukazuje na citotoksičnost kemoterapeutika



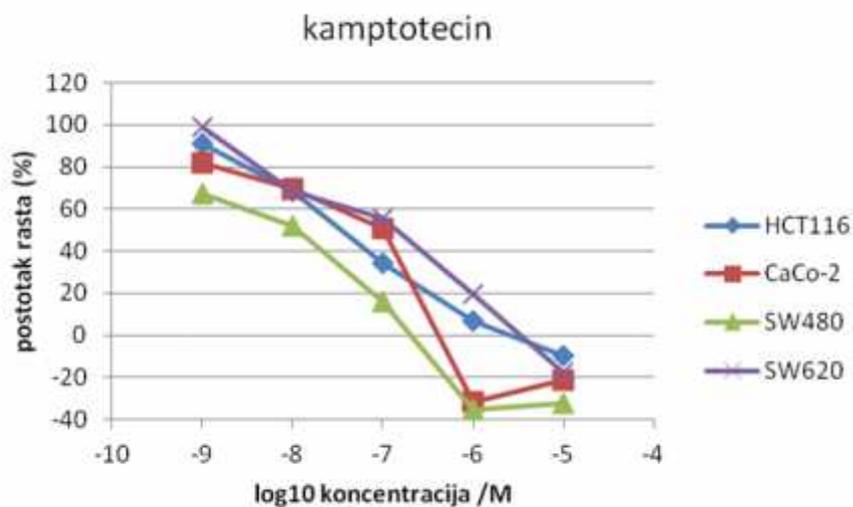
Slika 12. Utjecaj kemoterapeutika 5-fluorouracila na rast tumorskih staničnih linija HCT116, CaCo-2, SW620 i SW480. Krivulja prikazuje ovisnost postotka rasta stanica o koncentraciji spoja.



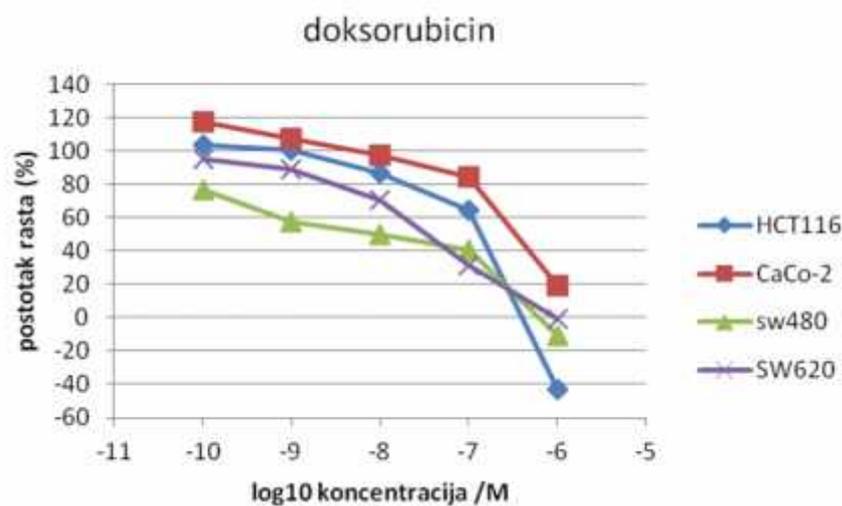
Slika 13. Utjecaj kemoterapeutika etopsida na rast tumorskih staničnih linija HCT116, CaCo-2, SW620 i SW480. Krivulja prikazuje ovisnost postotka rasta stanica o koncentraciji spoja



Slika 14. Utjecaj kemoterapeutika cisplatine na rast tumorskih staničnih linija HCT116, CaCo-2, SW620 i SW480. Krivulja prikazuje ovisnost postotka rasta stanica o koncentraciji spoja



Slika 15. Utjecaj kemoterapeutika kamptotecina na rast tumorskih staničnih linija HCT116, CaCo-2, SW620 i SW480. Krivulja prikazuje ovisnost postotka rasta stanica o koncentraciji spoja.



Slika 16 . Utjecaj kemoterapeutika doksorubicina na rast tumorskih staničnih linija HCT116, CaCo-2, SW620 i SW480. Krivulja prikazuje ovisnost postotka rasta stanica o koncentraciji spoja.

## Određivanje IC<sub>50</sub> vrijednosti citostatika

IC<sub>50</sub> je mjera djelotvornosti tvari u inhibiranju biološke ili biokemijske funkcije. To je kvantitativna vrijednost koja pokazuje količinu aktivne tvari potrebne za 50%-tnu inhibiciju određenog procesa. IC<sub>50</sub> vrijednosti u tablici 5 jesu koncentracije citostatika pri kojoj je preživljenje stanica 50% u odnosu na kontrolu.

**Tablica 5. Učinak 5-fluorouracila, etopozida, kamptotecina, doksorubicina i cisplatine na rast stanica HCT116, SW620, SW480 i CaCo-2. Prikazane su IC<sub>50</sub> vrijednosti, tj. koncentracije pri kojima je došlo do 50%-tne inhibicije rasta stanica.**

	IC <sub>50</sub> /M HCT116	IC <sub>50</sub> /M SW620	IC <sub>50</sub> /M SW480	IC <sub>50</sub> /M CaCo-2
<b>5-fluorouracil</b>	1,162x10 <sup>-5</sup>	2,063x10 <sup>-5</sup>	1,970x10 <sup>-6</sup>	1,243x10 <sup>-5</sup>
<b>Etopozid</b>	1,509x10 <sup>-5</sup>	1,588x10 <sup>-6</sup>	4,134x10 <sup>-7</sup>	5,822x10 <sup>-5</sup>
<b>Kamptotecin</b>	3,733x10 <sup>-8</sup>	1,039x10 <sup>-7</sup>	8,888x10 <sup>-9</sup>	7,977x10 <sup>-8</sup>
<b>Doksorubicin</b>	1,252x10 <sup>-7</sup>	3,030x10 <sup>-8</sup>	1,153x10 <sup>-8</sup>	3,401x10 <sup>-7</sup>
<b>Cisplatina</b>	1,016x10 <sup>-5</sup>	4,901x10 <sup>-6</sup>	2,945x10 <sup>-6</sup>	4,994x10 <sup>-6</sup>

Vrijednosti IC<sub>50</sub> za svaki spoj i liniju dobivene su linearnom regresijom iz prikazanih krivulja (slika 11-15). Svi spojevi pokazuju antiproliferativni učinak na tumorske stanice, što je i očekivano s obzirom da smo koristili poznate spojeve koji se koriste u kemoterapiji. Povećanjem koncentracije spoja smanjuje se postotak rasta odnosno vijabilnost stanica. Među testiranim kemoterapeutikama 5-fluorouracil je pokazao najslabije citostatsko djelovanje s obzirom da su za postizanje IC<sub>50</sub> korištene najviše koncentracije (10<sup>-5</sup>M) (slika 12), dok citotoksični učinak spoja nije zabilježen. Uočeno je da etopozid značajnije citostatsko i citotoksično djelovanje postiže kod staničnih linija SW480 i SW620. Najjače citostatsko djelovanje je postignuto kemoterapeutikom kamptotecinom koji pri koncentracijama višim od 10<sup>-6</sup> pokazuje i citotoksično djelovanje (slika 15). Zamjetili smo također snažno citostatsko djelovanje doksorubicina koji je u većim koncentracijama bio citotoksičan za stanične linije HCT116 i SW480 (slika 16). Naposljetku, zabilježili smo umjereno citostatsko djelovanje, ali i najjači citotoksični učinak kemoterapeutika cisplatine za sve stanične linije (slika 14). Stanična linija SW480 se pokazala najosjetljivijom na korištene kemoterapeutike što pokazuju najniže vrijednosti IC<sub>50</sub> stanica SW480 među svim testiranim staničnim linijama (Tablica 5).

## Učinak Ad5CMVp21 na rast stanica karcinoma kolona

Da bismo utvrdili utjecaj egzogenog p21<sup>Waf1/Cip1</sup> na rast stanica u kulturi, te da li se razlikuje od utjecaja samog vektora AdCMV $\beta$ -gal, nasadili smo stanice na pločicu s 96 bunarića te ih zarazili virusnim vektorima u rasponu od 10-80 MOI. Udio živih stanica smo određivali treći, četvrti i peti dan nakon zaražavanja testom vijabilnosti (MTT test).

Oba su virusa izazvala inhibiciju proliferacije stanica. Međutim, preživljenje stanica koje su zaražene kontrolnim vektorom je bilo visoko i tek pri većim koncentracijama je palo na 80% i to kod staničnih linija HCT116 i SW620 (slika 16 i 18). Zamjetili smo da vektor s p21<sup>Waf1/Cip1</sup> kazetom intenzivnije koči rast stanica linija HCT116 i SW620 u koncentraciji većoj od 40 MOI i to 5.dan nakon zaražavanja (slika 16 i 18). Inhibitorno djelovanje egzogenog p21 proteina na vijabilnost staničnih linija SW480 i CaCo-2 se pokazalo jako slabim, jer je postotak rasta kod tih stanica pao tek na 80% (slika 17 i 19).

S obzirom da je literaturno pokazano da povećana ekspresija p21<sup>WAF1/Cip1</sup> gena različito modulira učinak kemoterapeutika te da taj učinak ovisi o vrsti tumorskih stanica, kao i kemoterapeutika, ispitali smo utjecaj povećane ekspresije gena p21 u kombinaciji s različitim terapeutima na rast navedenih četiriju staničnih linija karcinoma debelog crijeva. Stanice smo nakon zaražavanja virusnim vektorom tretirali s kemoterapeutikom u određenom rasponu koncentracija. Koncentracija virusa je u kombiniranom tretmanu bila konstantna i iznosila 60 MOI. Rezultati pokazuju kako egzogeni p21<sup>Waf1/Cip1</sup> uglavnom pojačava inhibitorni efekt kemoterapeutika, no taj učinak se dosta razlikuje između staničnih linija, a najmanje je izražen kod stanične linije SW480 (slika 22). Primjerice, rast stanica HCT 116 je bio značajno inhibiran četvrti i peti dan, pri čemu su stanice najosjetljivije na doksorubicin, no povećana ekspresija gena p21 pojačala je učinak niskih koncentracija tog spoja do 20% (slika 21). S druge strane, inhibitorni je efekt gena p21<sup>Waf1/Cip1</sup> značajniji u kombinaciji s kamptotecinom i cisplatinom kod kojih je 4. i 5. dan kombinirani tretman pokazao i do 40% jači učinak u odnosu na same kemoterapeutike (slika 21).

Stanice SW480 su se pokazale osjetljivijima na doksorubicin i cisplatinu nego na kamptotecin, a rast im je značajnije inhibiran četvrti i peti dan (slika 22). Iako im se postotak rasta značajno smanjio (i do 80%), nismo zamjetili značajniji dodatni učinak na

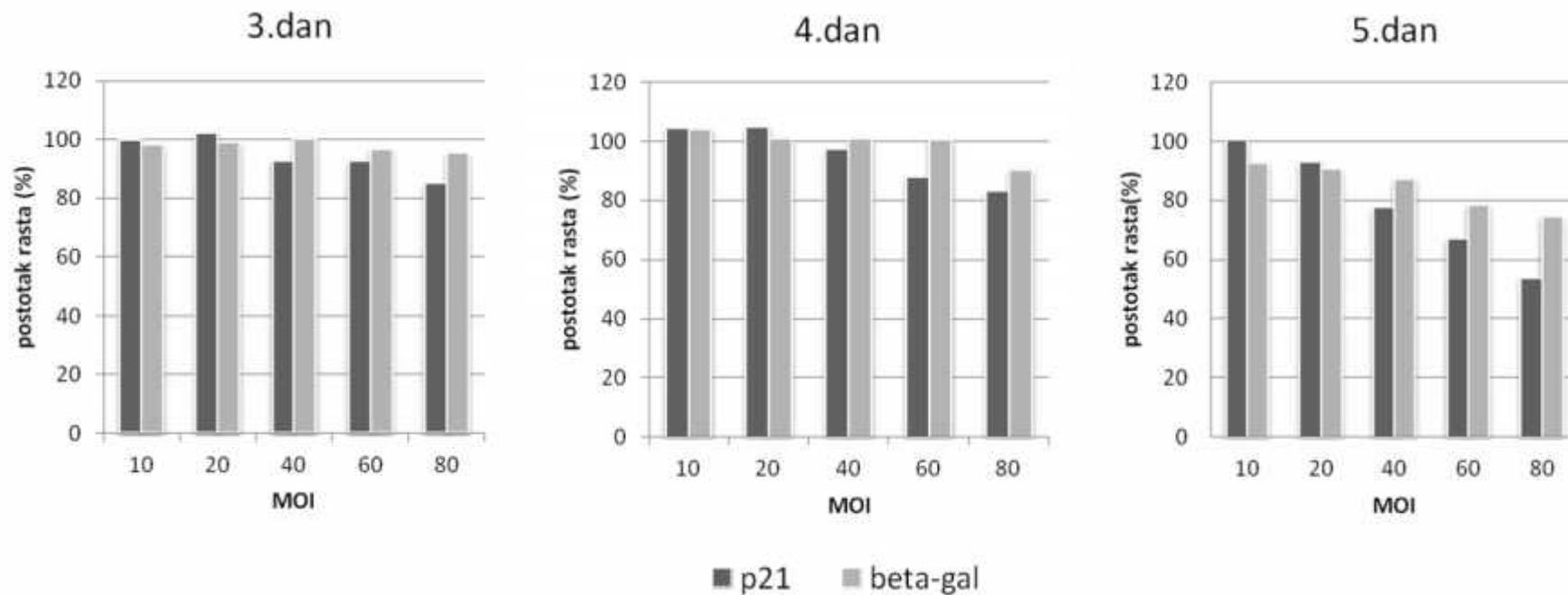
kočenje rasta stanica uz vektor s p21 genom, osim u nižim koncentracijama cisplatine i kamptotecina nakon 5 dana inkubacije (slika 22).

Stanicama SW620 povećana je ekspresija gena p21 značajno povećala učinak kamptotecina i cisplatine (u sve tri vremenske točke), pri čemu je u nekim tretmanima došlo do 40% jače inhibicije rasta stanica u odnosu na sam kemoterapeutik. (slika 23),

Kod stanične linije CaCo-2 smo također zamjetili značajno (20% - 30%) pojačanje djelovanja svih kemoterapeutika kao posljedicu povećane ekspresije gena p21 (slika 24).

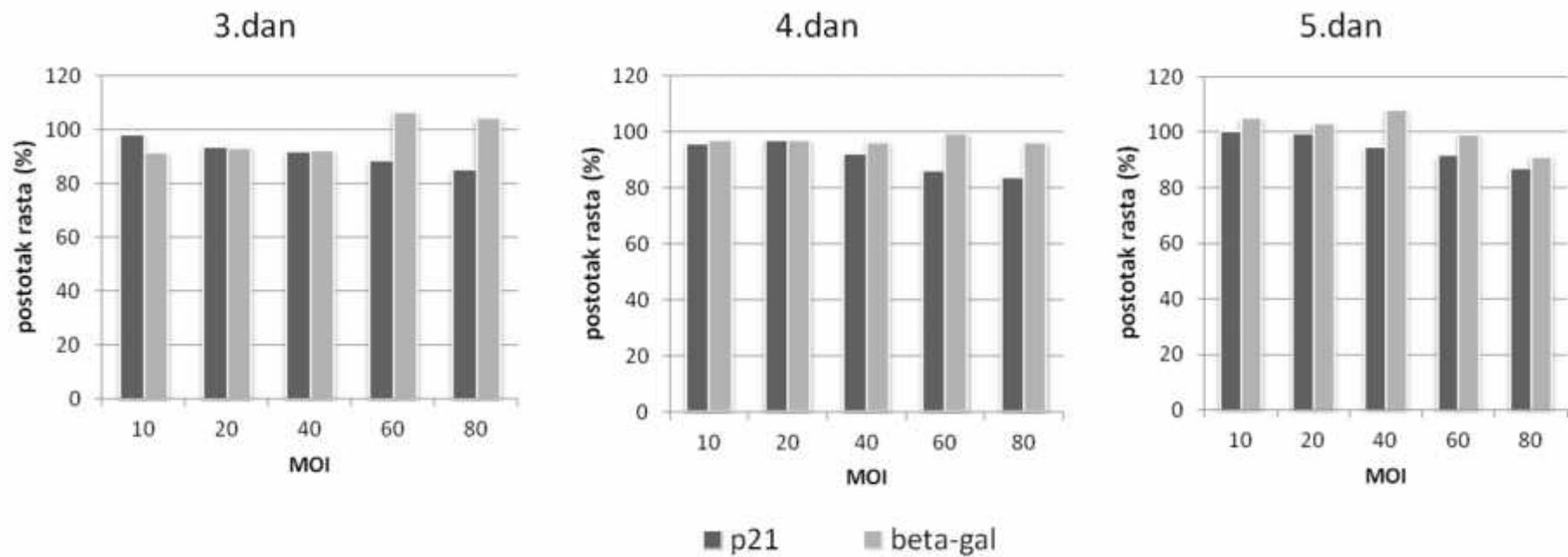
Temeljem ovih eksperimenata možemo zaključiti da povećana ekspresija gena p21, dobivena unosom gena putem rekombinantnog adenovirusnog vektora, pojačava učinak kemoterapeutika cisplatine, kamptotecina te u manjoj mjeri doksorubicina u stanicama karcinoma debelog crijeva SW620, HCCT 116, CaCo-2 i SW480. To je pojačanje najslabije izraženo u stanicama SW480.

## HCT116



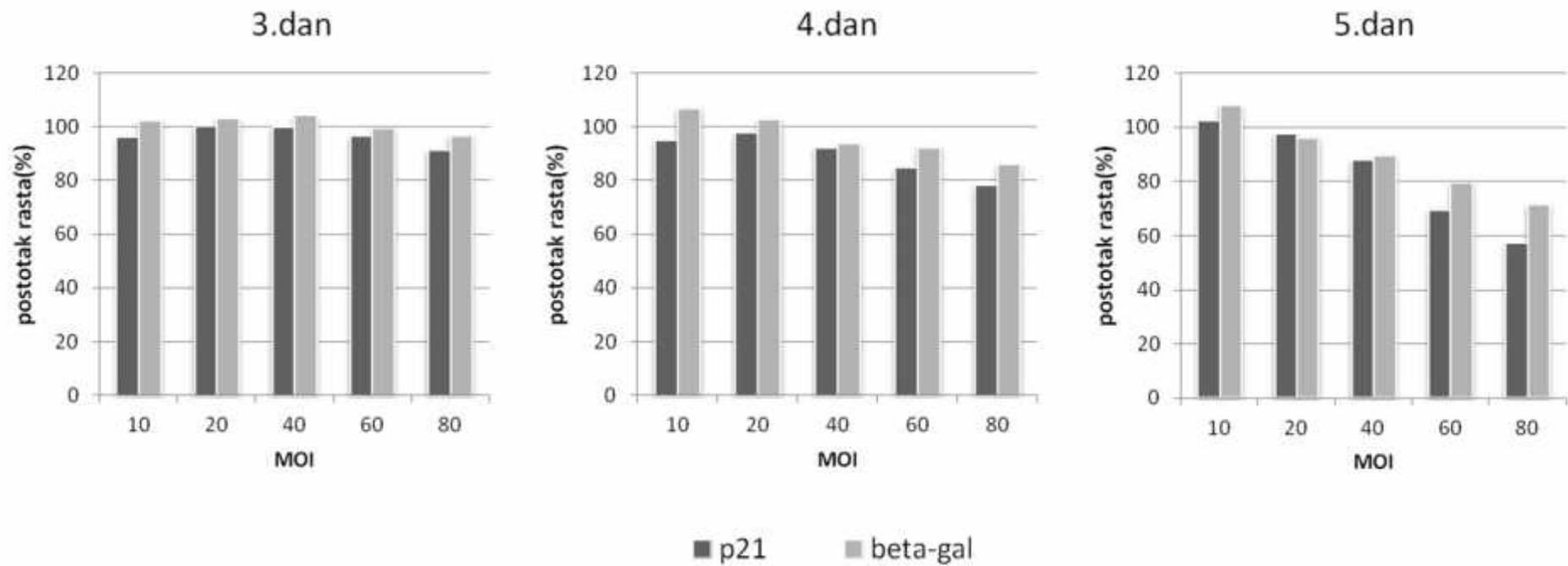
Slika 17. Inhibicija rasta HCT116 stanica 3, 4 i 5 dana nakon zaražavanja s adenovirusnim vektorom koji nosi gen za p21 (tamna kolona) i  $\beta$ -Gal (svijetla kolona).

## SW480



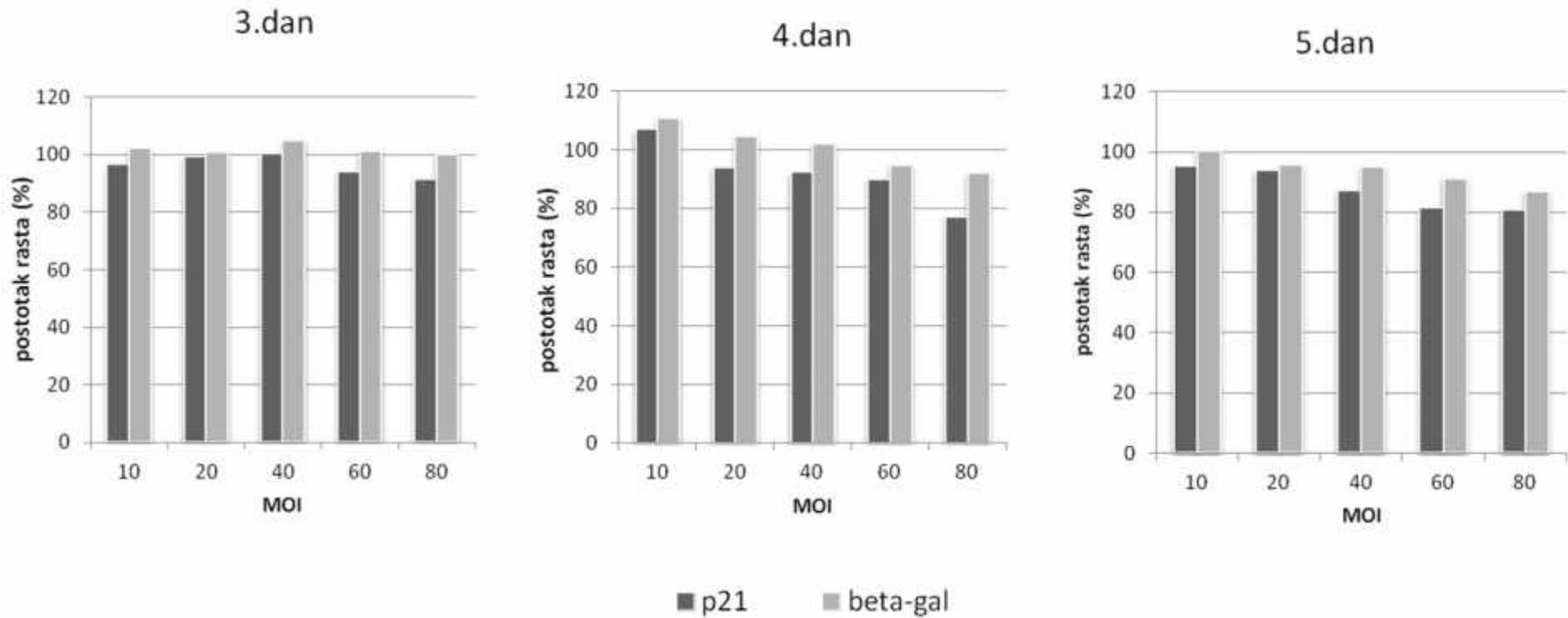
Slika 18. Inhibicija rasta SW480 stanica 3, 4 i 5 dana nakon zaražavanja s adenovirusnim vektorom koji nosi gen za p21 (tamna kolona) i  $\beta$ -Gal (svijetla kolona).

## SW620

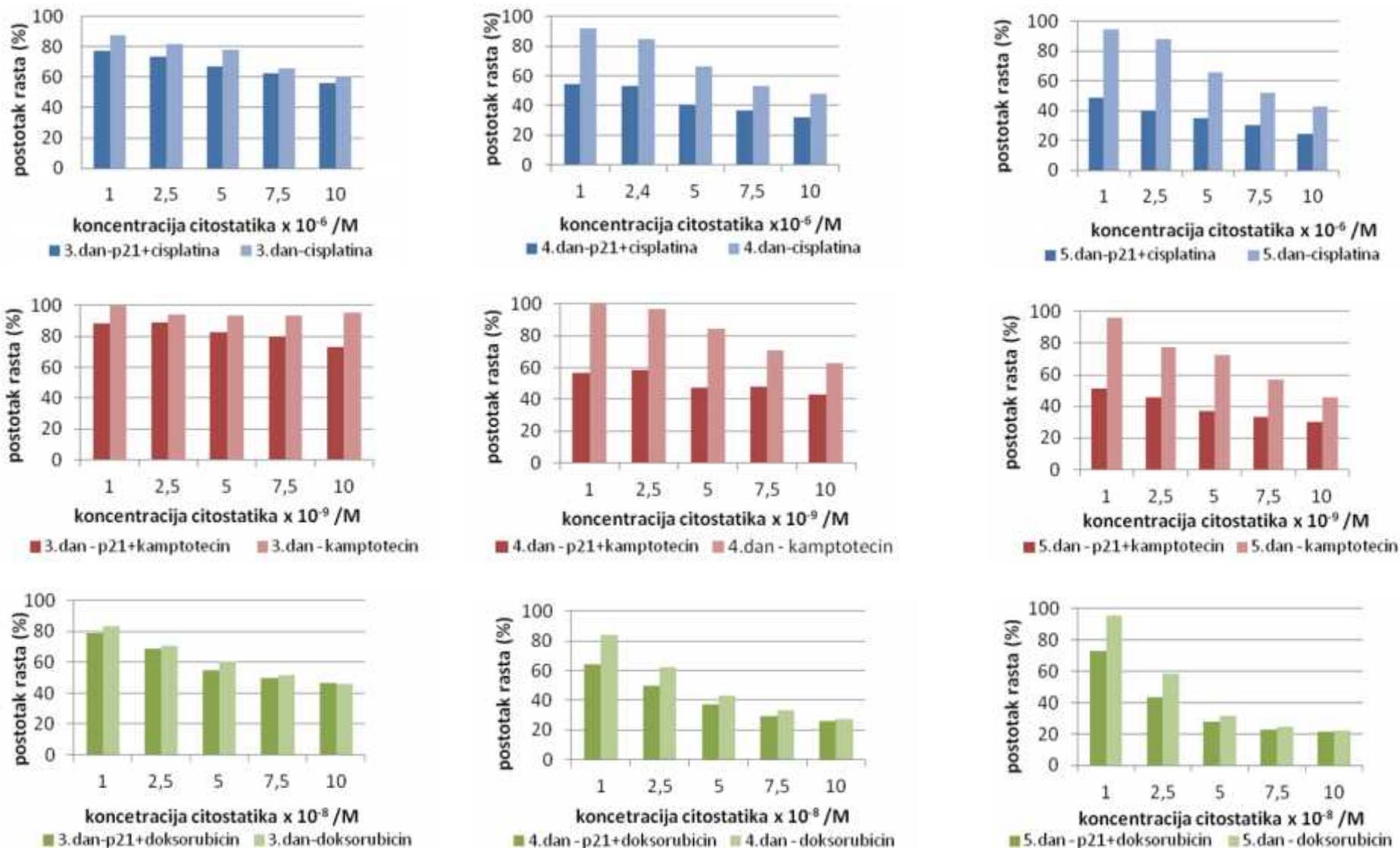


Slika 19. Inhibicija rasta SW620 stanica 3, 4 i 5 dana nakon zaražavanja s adenovirusnim vektorom koji nosi gen za p21 (tamna kolona) i  $\beta$ -Gal (svijetla kolona).

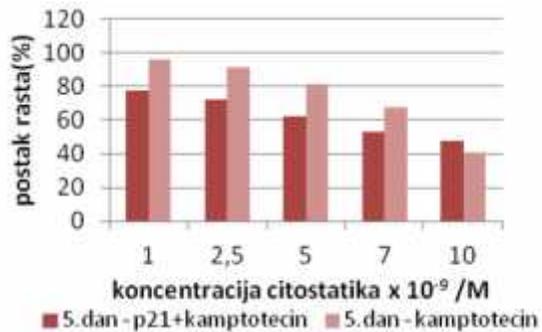
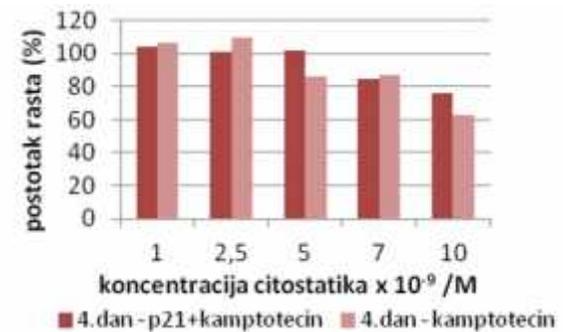
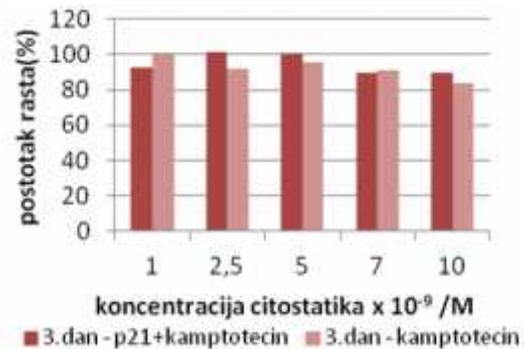
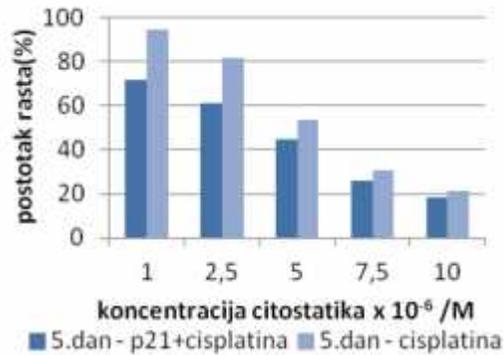
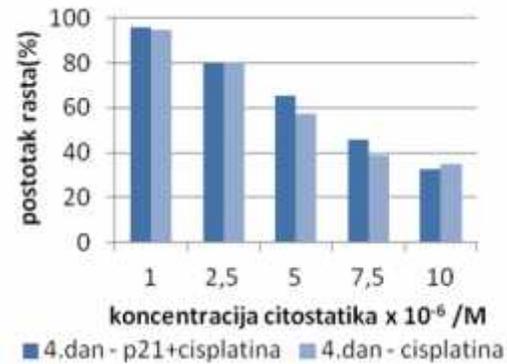
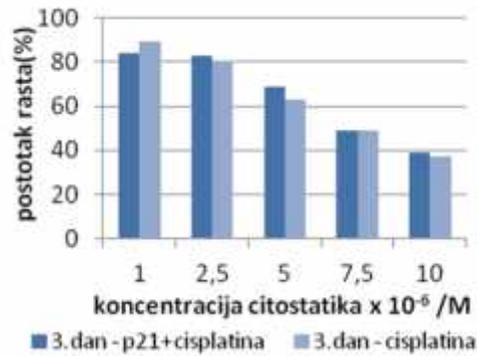
## CaCo-2

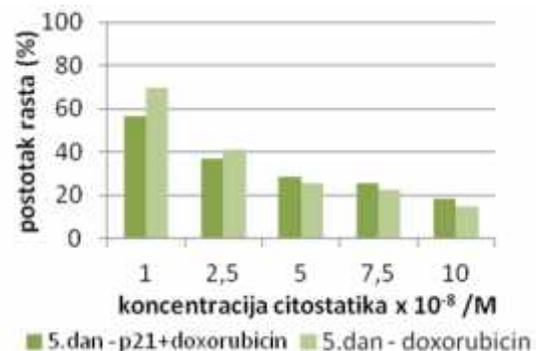
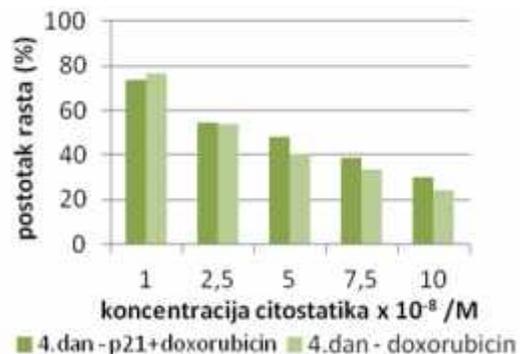
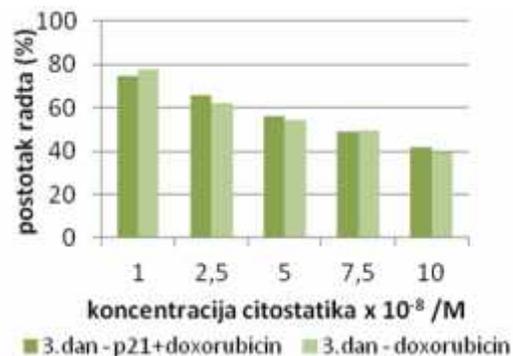


Slika 20. Inhibicija rasta CaCo-2 stanica 3, 4 i 5 dana nakon zaražavanja s adenovirusnim vektorom koji nosi gen za p21 (tamna kolona) i  $\beta$ -Gal (svijetla kolona).

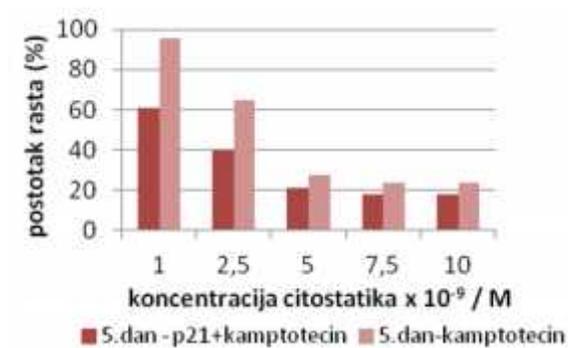
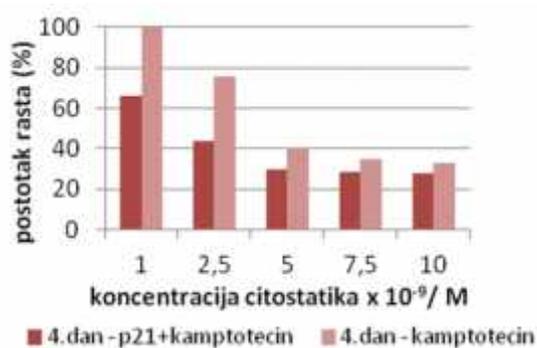
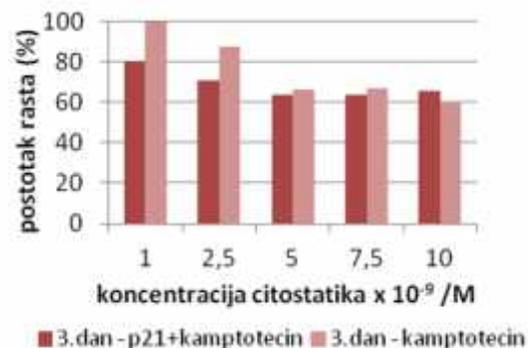
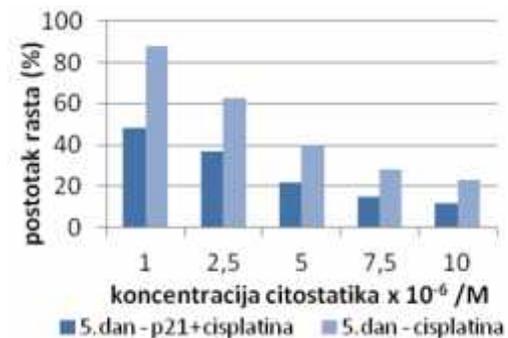
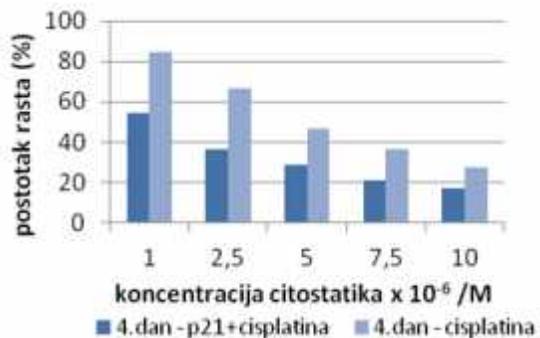
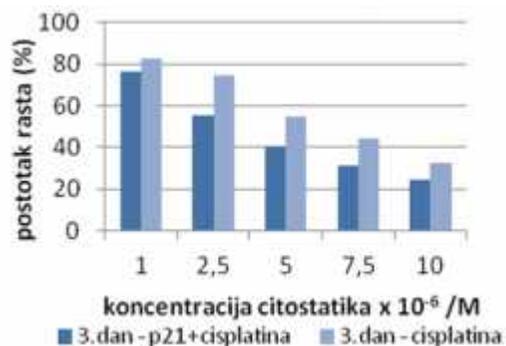


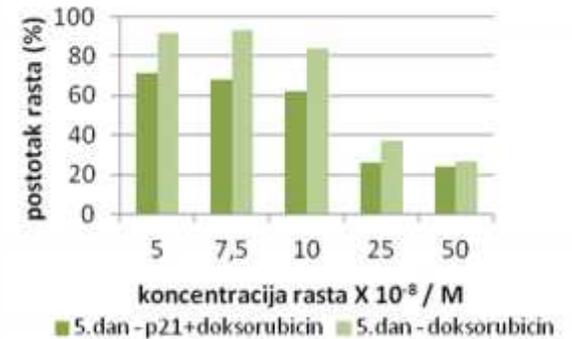
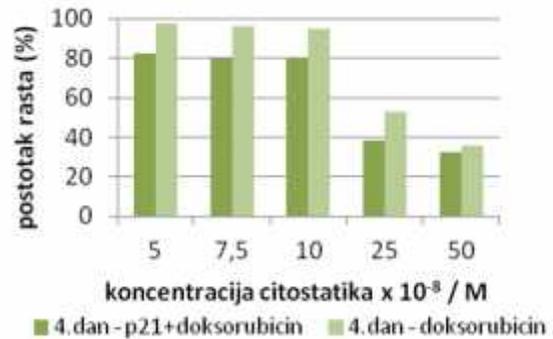
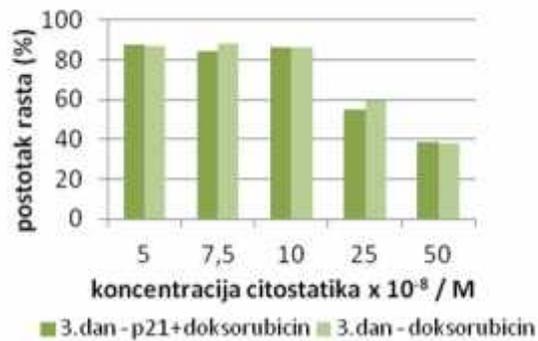
Slika 21. Rast stanica linije HCT116 3, 4 i 5 dana nakon zaražavanja s adenovirusnim vektorom s ugrađenim genom p21<sup>WAF1/Cip1</sup> i odgovarajućim kemoterapeutikom. Grafovi prikazuju stanice stanične linije HCT116 tretirane cisplatinom (plavo), kamptotecinom (crveno) i doxorubicinom (zeleno). Pratili smo rast stanica tretiranih kemoterapeutikom i adenovirusnim vektorom s p21 genom (tamnija kolona) te stanica tretiranih samo kemoterapeutikom (svjetlija kolona).



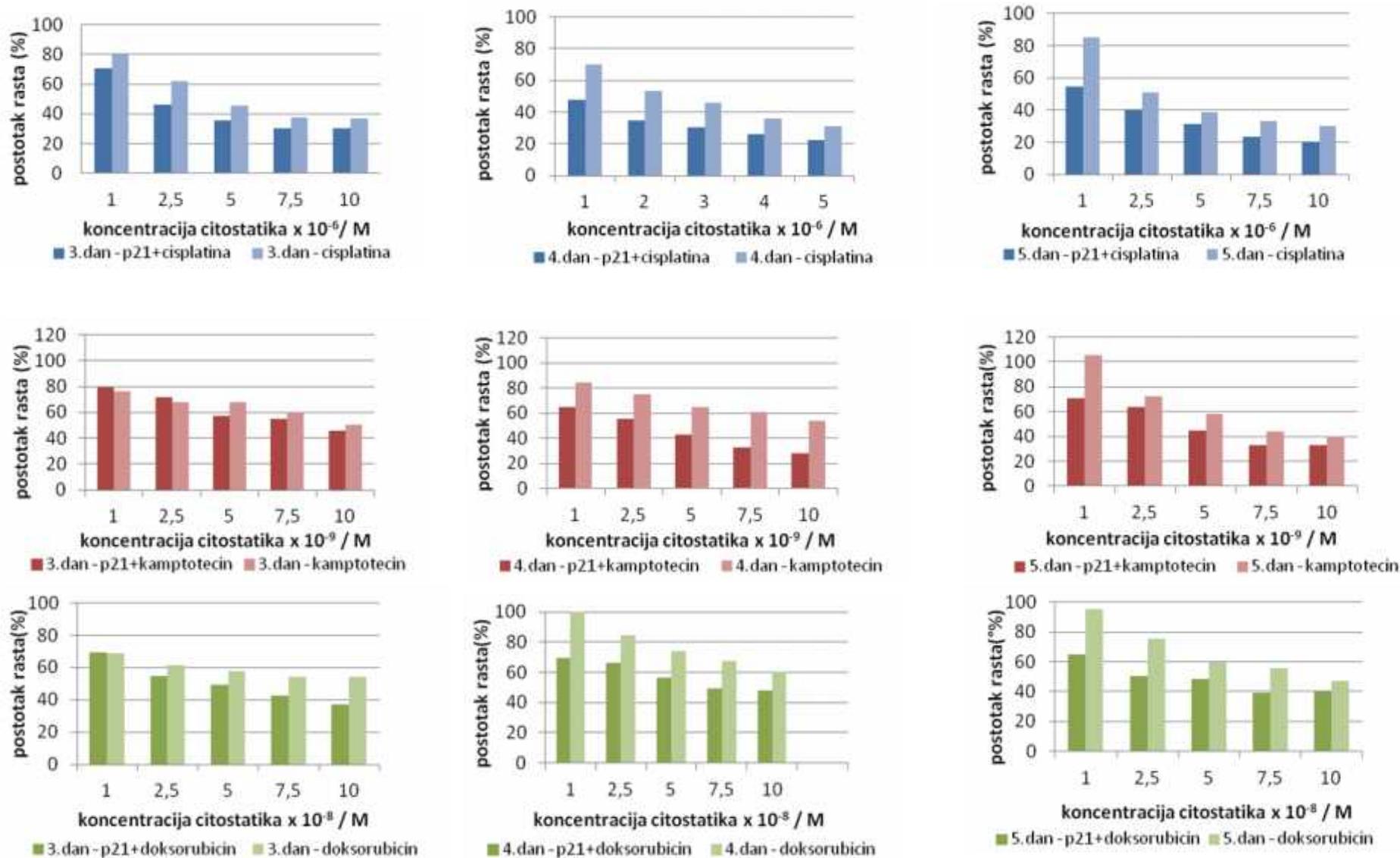


Slika 22. Rast stanica linije SW480 3, 4 i 5 dana nakon zaražavanja s adenovirusnim vektorom s ugrađenim genom p21<sup>WAF1/Cip1</sup> i odgovarajućim kemoterapeutikom. Grafovi prikazuju stanice stanične linije SW480 tretirane cisplatinom (plavo), kamptotecinom (crveno) i doxorubicinom (zeleno). Pratili smo rast stanica tretiranih kemoterapeutikom i adenovirusnim vektorom s p21 genom (tamnija kolona) te stanica tretiranih samo kemoterapeutikom (svjetlija kolona).





**Slika 23. Rast stanica linije SW620 3, 4 i 5 dana nakon zaražavanja s adenovirusnim vektorom s ugrađenim genom p21<sup>WAF1/Cip1</sup> i odgovarajućim kemoterapeutikom.** Grafovi prikazuju stanice stanične linije SW620 tretirane cisplatinom (plavo), kamptotecinom (crveno) i doksorubicinom (zeleno). Pratili smo rast stanica tretiranih kemoterapeutikom i adenovirusnim vektorom s p21 genom (tamnija kolona) te stanica tretiranih samo kemoterapeutikom (svijetlija kolona).

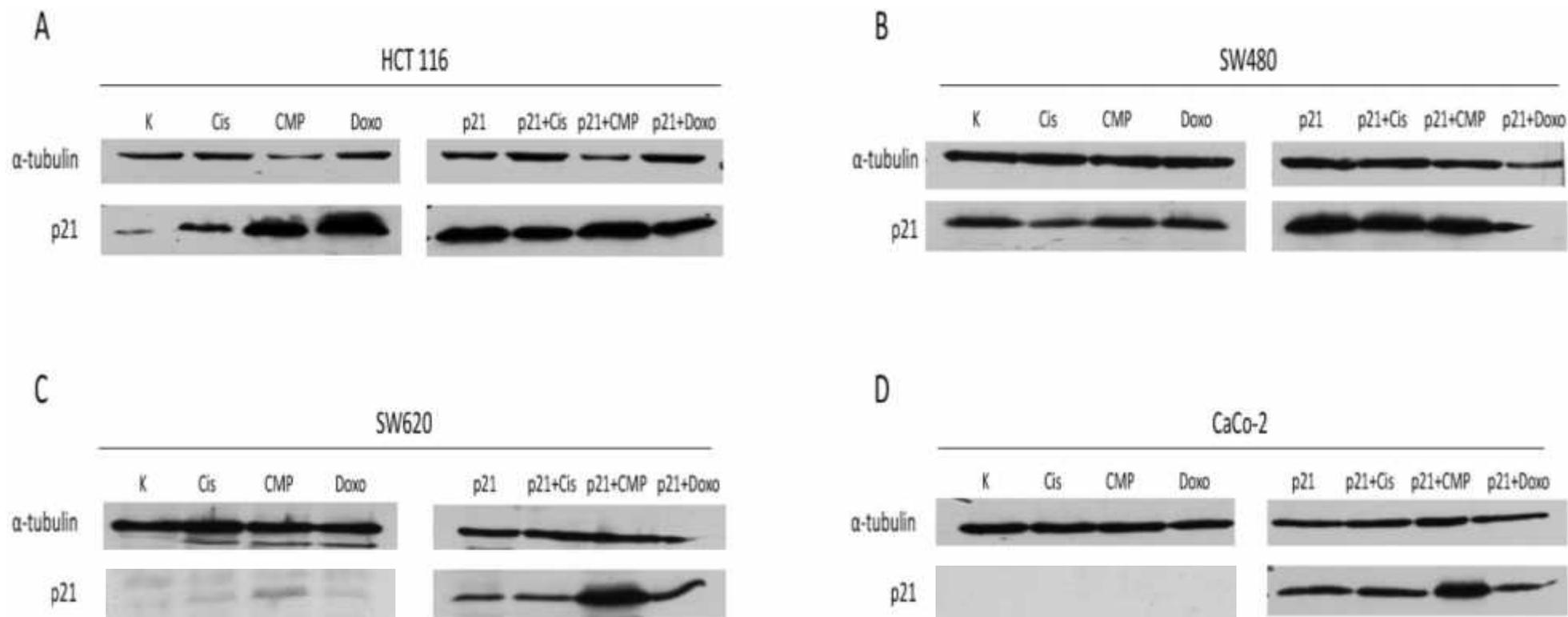


Slika 24. Rast stanica linije CaCo-2 3, 4 i 5 dana nakon zaražavanja s adenovirusnim vektorom s ugrađenim genom p21<sup>WAF1/Cip1</sup> i odgovarajućim kemoterapeutikom. Grafovi prikazuju stanice stanične linije CaCo-2 tretirane cisplatinom (plavo), kamptotecinom (crveno) i doxorubicinom (zeleno). Pratili smo rast stanica tretiranih kemoterapeutikom i adenovirusnim vektorom s p21 genom (tamnija kolona) te stanica tretiranih samo kemoterapeutikom (svijetlija kolona).

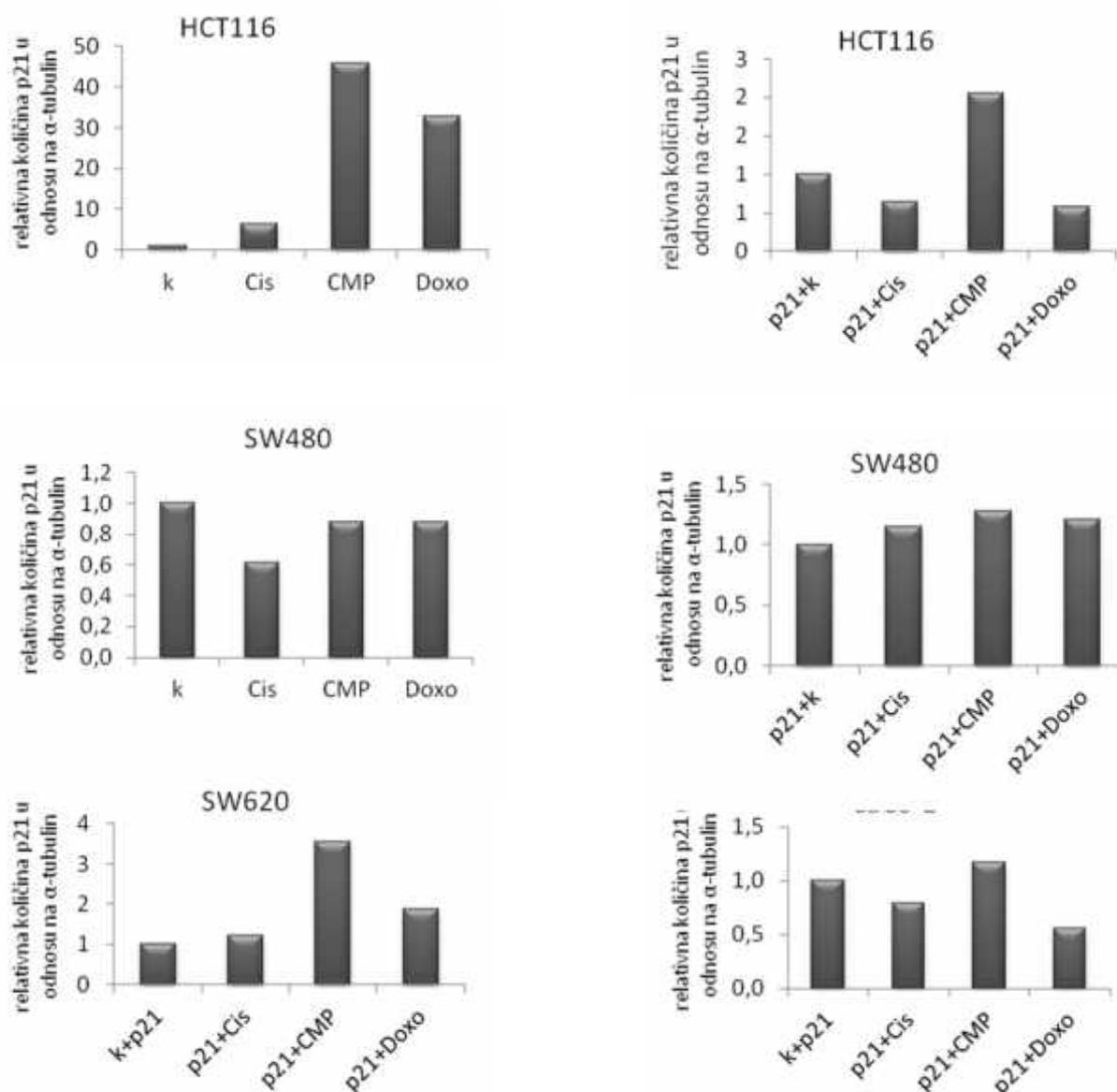
## Western analiza

Western analizom lizata staničnih proteina iz transduciranih i netransduciranih uzoraka smo željeli dokazati da je transdukcija gena bila uspješna, tj. da je adenovirusni vektor uspješno unio željeni gen ( $p21^{WAF1/Cip1}$ ) u stanice tumora te da je taj gen u stanicama aktivan. Postojanje povećane razine p21 proteina u zaraženim stanicama potvrdilo je uspješnost transfekcije. Također, željeli smo istražiti da li tretman kemoterapeutičima povećava ekspresiju proteina p21, kao rezultat odgovora stanica na stres izazvan oštećenjem DNA. Kao kontrolu pravilnog nanošenja uzoraka na gel, koristili smo protutijelo na  $\alpha$ -tubulin koji je strukturni protein čija bi količina trebala biti jednaka u svim uzorcima ukoliko je postupak pravilno izveden i tretman ne utječe na njegovu ekspresiju. Bazalna ekspresija proteina p21 dokazana je u stanicama SW480 i HCT116. Kemoterapeutici su inducirali ekspresiju endogenog p21 u stanicama SW480 i HCT116 te je također vrlo slaba ekspresija detektirana u stanicama SW620 nakon tretmana kamptotecinom (slika 25, A, B i C). Pogledom na proteinske vrpce stanične linije HCT116 vidi se kako je indukcija endogenog gena p21 različita u ovisnosti o kemoterapeutiku (slika 25 A), pri čemu je denzitometrijski utvrđeno da je signal najjači za stanice tretirane kamptotecinom, a znatno slabiji za one tretirane cisplatinom (Slika 26). Naprotiv, intenziteti proteinskih vrpca netransduciranih uzoraka stanica SW480 su podjednaki u uzorcima tretiranim kamptotecinom i doksorubicinom, što upućuje na to da ti kemoterapeutici nemaju značajniji utjecaj na razinu ekspresije proteina p21, za razliku od stanica tretiranih cisplatinom gdje je došlo do smanjenja ekspresije tog proteina (slika 25, C).

U svim transduciranim staničnim linijama smo detektirali protein p21, a temeljem jačeg intenziteta proteinskih vrpca zaključili smo kako je ekspresija  $p21^{WAF1/Cip1}$  jača nego u netransduciranih uzorcima (slika 25). Među transduciranim uzorcima, stanice tretirane kamptotecinom pokazuju pojačanu ekspresiju proteina p21 (slika 25 i 26) što smo utvrdili i denzitometrijskom analizom, dok stanice tretirane cisplatinom pokazuju istu, ili čak smanjenu ekspresiju proteina p21 u odnosu na kontrolu (slika 26).



**Slika 25. Dokazivanje transfekcije virusnim vektorom s p21 genom.** Slovicima A-D su označeni pokusi za pojedinu staničnu liniju. Kemoterapeutici su označeni kraticama. **Cis:** cisplatin; **CMP:** kamptotecin; **Doxo:** doksorubicin. Za pojedini pokus, gornji biljeg predstavlja  $\alpha$ -tubulin, a donji p21 protein. Stanične linije su **A:**HCT116; **B:**SW480; **C:**SW620 i **D:**CaCo-2



**Slika 26. Denzitometrijska kvatifikacija jačine signala proteina p21.** Proteinske vrpce dobivene Western analizom su obrađene korištenjem programa *ImageJ*. Na grafovima su prikazane relativne količine proteina p21 u odnosu na količinu α-tubulina iz istog uzorka. Kratice na x-osi označavaju testirani kemoterapeutik (Cis: Cisplatin; CMP: Kamptotecin; Doxo: Doksorubicin), a p21 označava adenovirusom uneseni gen p21<sup>WAF1/Cip1</sup>.

## RASPRAVA

Rak kao bolest nazivaju i pošasti 21. stoljeća, a razlog leži u činjenici da tijekom života jedna od tri osobe oboli od raka, pri čemu je rak uzročnik 13% svih smrtnih slučajeva u svijetu ([www.who.int/cancer](http://www.who.int/cancer)). Upravo to je razlog zbog kojeg rak kao genetska bolest okupira pažnju brojnih znanstvenika. Konvencionalno liječenje raka obuhvaća operativni zahvat, kemoterapiju i zračenje. Kemoterapija ima citostatično i citotoksično djelovanje na tumorske stanice, međutim, pogađa i normalne stanice tkiva koja se intenzivnije dijele (gastrointestinalni epitel, koštana srž, folikuli dlaka) te se bolesnici suočavaju s mnogim posljedicama i nuspojavama. Brojni znanstvenici i laboratoriji ulažu velike napore u pronalaženje i sintetiziranje novih kemoterapeutika s novim i boljim svojstvima. Razvojem metoda kojima se omogućava unos novoga gena u stanicu otvorila se prilika za ispitivanje genetske terapije koja se u *in vitro* sustavima pokazala kao djelotvoran način unosa tumor supresor gena kao što su p53, p21 ili pRb. Godine rada kao i napredak u tehnologiji pridonijeli su tome da se do danas generirao ogroman broj podataka o genima i mehanizmima koji su uključeni u regulaciju staničnog rasta, diobe, diferencijacije i smrti. Rezultati eksperimentata su pokazali kako povećana ekspresija egzogenog p53 gena uzrokuje kočenje rasta stanica i p53 ovisnu apoptozu (Katayose i sur. 1995; Kralj i sur. 2003; Blagosklonny i el-Deiry 1996). Temeljem tih saznanja znanstvenici su se počeli baviti tumor supresor genom p21<sup>WAF1/Cip1</sup> čiju ekspresiju, između ostalog, aktivira transkripcijski faktor p53, a čiji je proteinski produkt bitan faktor u mreži regulacije navedenih procesa i kao takav bitna meta za istraživanje.

Jedan od problema vezanih uz kemoterapiju je rezistencija stanica na kemoterapeutike koja se s vremenom javlja (Lincet i sur. 2000). Kombinacija kemoterapeutika s inhibitorima ciklin-kinaza kao terapijska strategija koja pojačava citotoksičnost kemoterapeutika kod pojedinih staničnih linija se intenzivno istražuje (Schmidt i Fan 2001). Cilj ovih pokusa je bio ustanoviti utjecaj povećane ekspresije p21<sup>WAF1/Cip1</sup> gena na rast stanica karcinoma debelog crijeva s različitim endogenim statusom gena p53 i p21 kao i utjecaj kemoterapeutika u kombinaciji s pojačano eksprimiranim genom p21<sup>WAF1/Cip1</sup> na rast stanica.

Pokuse smo započeli promatranjem učinka šest različitih kemoterapeutika na pojedinu staničnu liniju i određivanjem  $IC_{50}$  vrijednosti za kemoterapeutike. Kod svih uzoraka se preživljenje smanjuje s povećanjem koncentracije kemoterapeutika što je očekivano i u skladu s prethodnim istraživanjima (Lincet i sur. 2000; Nitiss 2009); Agrez i sur. 1983).

5-fluorouracil je pritom imao najviše vrijednosti  $IC_{50}$  ( $\approx 10^{-5}$  M), a kamptotecin najniže ( $\approx 10^{-8}$  M). Zamjetili smo da su stanice SW480 pri niskim koncentracijama kemoterapeutika najosjetljivije tj. imaju najniži postotak rasta. Stanične linije SW480 i SW620 su izolirane iz istog pacijenta. Pritom je linija SW480 uspostavljena iz primarnog tumora kolona, a linija SW620 iz metastaze u limfnom čvoru što znači da stanice SW480 imaju manji stupanj zloćudne preobrazbe. Pokazano je da djelovanjem pojedinih kemoterapeutika dolazi do povećane ekspresije Fas proteina i indukcije Fas ovisnog apoptotskog puta kod stanica SW480, dok kod stanica SW620 u jednakim uvjetima nije dokazana ekspresija istog, što bi mogao biti jedan od razloga veće osjetljivosti stanica linije SW480 u odnosu na SW620 (Bergmann-Leitner i Abrams 2000; Qiang Zhu i sur. 2006).

Kod knockout miševa  $p21^{-/-}$  uočene su kromosomske aberacije i gubitak kontrole nad staničnim ciklusom (Barboza i sur. 2006) što dovoljno govori o važnosti proteina p21. Zbog utjecaja prvenstveno na kočenje staničnog ciklusa, a zatim i na apoptozu, egzogena ekspresija p21 proteina u stanicama se intenzivno proučava (Tsao i sur. 1999). Egzogenom ekspresijom  $p21^{WAF1/Cip1}$  u stanicama tumora dojke (Parker i sur 2000), grkljana (Kraljevic Pavelic i sur 2008), debelog crijeva (Kralj i sur. 2003), prostate (Gotoh i sur. 1997), pluća (Joshi, Chen, i sur. 1998), gušterače (Joshi, Dergham, i sur. 1998) i endometrija (Ramondetta i sur. 2000) pokazano je kako protein p21 ima inhibitorni učinak na rast stanica.

Da bismo promatrali utjecaj p21 proteina na rast, stanice smo zarazili adenovirusnim vektorima koji imaju ugrađen gen  $p21^{WAF1/Cip1}$ . Adenovirusni vektori su pogodni za ovaj način istraživanja jer imaju mogućnost inficiranja velikog broja stanica, mogu se dobiti u visokom titru te se ne ugrađuju u genom stanice. Kako bismo provjerili mogućnost da je kočenje rasta stanica posljedica djelovanja samog virusa, stanice smo zaražavali i s adenovirusom koji nosi gen za  $\beta$ -galaktozidazu, a koji je služio kao kontrolni vektor. Iako je vektor Ad5CMVp21 imao jači inhibitorni učinak od Ad5CMV $\beta$ -gal vektora i potonji je također uzrokovao inhibiciju rasta stanica. Naime, poznato je da i sam virusni vektor može

utjecati na stanični ciklus inhibicijom E2F-1 faktora neovisno o pRb ili p53 statusu (Kuhn i sur. 2002).

Naši rezultati pokazuju kako je najznačajnije kočenje rasta posredstvom adenovirusnog vektora s genom p21<sup>WAF1/Cip1</sup> postignuto kod staničnih linija HCT116 i SW620. Značajnija inhibicija rasta stanica (preživljenje od 50%) se događa tek 5. dan nakon zaražavanja i pri koncentracijama virusa iznad 60MOI. Rast staničnih linija CaCo-2 i SW480 je pao tek na 80%. Western analizom smo isključili mogućnost neuspjele transdukcije s obzirom da je intezitet vrpca p21 proteina iz transduciranih uzoraka stanica SW480 bio znatno jači, odnosno pojavio se u stanicama CaCo-2.

Stanice linije SW620 imaju mutirani p53 i nemaju bazalnu ekspresiju p21 proteina. Literatura pokazuje da kod stanica s takvim statusom gena, egzogeno unešeni geni p53 i p21 imaju značajan utjecaj na kočenje rasta i aktivaciju apoptoze neovisne o p53 (Tsao i sur. 1999; Kralj i sur. 2003; Katayose i sur. 1995). CaCo-2 stanična linija se pokazala najrezistentnijom na povećanu ekspresiju p21<sup>WAF1/Cip1</sup> što se slaže s rezultatima koje su dobili Kralj i suradnici kada su na isti način promatrali kočenje rasta staničnih linija MCF-7, HeLa, SW620 i CaCo-2 (Kralj i sur. 2003). Zanimljivo je da je stanična linija HCT116 koja ima gen p53<sup>wt</sup> i u skladu s tim eksprimira protein p21, osjetljivija na djelovanje prekomjerno ekspimiranog proteina p21 od stanica SW480 i CaCo-2 koje nemaju funkcionalni p53. Naime, mnogi literaturni podaci navode kako je kočenje rasta stanica posredstvom egzogeno ekspimiranog gena p21<sup>WAF1/Cip1</sup> značajnije kod stanica s mutiranim ili deletiranim p53 genom što se objašnjava činjenicom da p21 može inhibirati p53 posredovanu apoptozu. Pretpostavljamo da se radi o nekoj drugoj genskoj mutaciji stanične linije HCT116.

Rezultati literaturnih izvješća koja opisuju djelovanje ekspresije gena p21<sup>WAF1/Cip1</sup> na učinak kemoterapeutika kao i na indukciju apoptoze su proturječni i mnogo se radi na otkrivanju uvjeta u stanici koji utječu na djelovanje proteina p21. Tako su Parker i suradnici pokazali da egzogeno ekspimirani gen p21<sup>WAF1/Cip1</sup> povećava preživljenje stanica tumora dojke koje su tretirane paklitakselom i etopozidom (Parker i sur.2000), dok su Ruan i suradnici zaključili kako inducibilna ekspresija p21<sup>WAF1/Cip1</sup> smanjuje toksičnost BCNU-a [(N,N'-bis(2-chloroethyl)-N-nitroso-urea] i cisplatine za stanice glioblastoma (Ruan i sur. 1998). Naprotiv, Kraljević Pavelić i suradnici su pokazali da ekspresija egzogenog p21<sup>WAF1/Cip1</sup>

pojačava inhibitorni učinak cisplatine, ali smanjuje utjecaj metotreksata na tumorske stanice grkljana (Kraljevic Pavelic i sur. 2008). Nadalje, u stanicama hepatocelularnog karcinoma (Qin i Ng 2001), kao i stanicama tumora jajnika (Lincet i sur. 2000) tretiranim kemoterapeutikom cisplatinom te uz ekspresiju egzogenog p21<sup>WAF1/Cip1</sup> dokazana je jača inhibicija rasta stanica u kulturi kao i veći broj stanica u apoptozi u odnosu na stanice tretirane samo kemoterapeutikom.

Kako bi provjerili utjecaj p21 proteina na inhibiciju rasta stanica kemoterapeutikom, od prvotnih šest odlučili smo se za tri kemoterapeutika koji na različite načine oštećuju DNA molekulu i izazivaju kočenje rasta ili smrt stanice: doksorubicin, kamptotecin i cisplatinu. Cisplatina spada u alkilirajuće kemoterapeutike koji djeluju neovisno o staničnom ciklusu (stanica ne mora biti u procesu diobe da bi spoj imao citotoksičan učinak), dok je za djelovanje inhibitora topoizomeraze kamptotecina i protutumorskog antibiotika doksorubicina nužno da je stanica u diobi (Schmidt i sur. 2001). Prije tretmana kemoterapeutikom, stanice smo inficirali virusnim vektorom u koncentraciji od 60 MOI, za koju smo se odlučili jer je empirijski pokazano (Kralj i Marjanović) kako je pri toj koncentraciji transducirano 50% zaraženih stanica te im rast nije značajnije inhibiran. Preživljenje svih staničnih linija je opadalo s povećanjem koncentracije kemoterapeutika i vremena inkubacije (u danima). U stanicama HCT116 je povećana ekspresija proteina p21 izrazito pojačala inhibitorni učinak cisplatine i kamptotecina ( za 40%), dok je učinak doksorubicina bio znatno slabije pojačan (do 20% , za  $1 \times 10^{-8} \text{M}$  i  $2,5 \times 10^{-8} \text{M}$  koncentracije citostatika). Slični su rezultati za staničnu liniju SW620 kod koje također p21 pojačava učinak svih kemoterapeutika, pri čemu je utjecaj na kamptotecin i cisplatinu jači nego na doksorubicin. Zanimljiva je činjenica da je egzogeni p21 kod tri stanične linije blago pojačao osjetljivost na doksorubicin, što nije u potpunom skladu s radom (Martinez i sur. 2002) koji su utvrdili da se apoptoza uzrokovana doksorubicinom u stanici javlja s smanjenjem koncentracije proteina p21 te da se unošenjem antisense p21<sup>WAF1/Cip1</sup> gena povećava osjetljivost stanica tumora prostate na doksorubicin.

Staničnoj liniji CaCo-2 je rast također dodatno inhibiran u kombinaciji s egzogeno ekspimiranim p21 proteinom, no u ovom slučaju utjecaj p21 proteina je nešto slabiji i podjednak za sva tri kemoterapeutika, što je zanimljivo s obzirom da egzogeni p21 protein (bez kemoterapeutika) nije imao značajniji utjecaj na inhibiciju rasta.

SW480 stanice nisu dodatno inhibirane djelovanjem egzogeno eksprimiranog p21 proteina o čemu govori činjenica da je razina proliferacije podjednaka onoj kod stanica koje su tretirane samo kemoterapeutikom.

Western analizom smo pokazali da je transdukcija bila uspješna. Vrpce p21 proteina jačeg intenziteta dobili smo iz transduciranih uzoraka svih staničnih linija, a bazalne razine p21 proteina smo dokazali u stanicama HCT116 te SW480. Uočili smo da SW480 stanice unatoč činjenici da eksprimiraju mutirani p53 gen, eksprimiraju visoku razinu proteina p21. Ti su rezultati u skladu s već prije objavljenim rezultatima (Rochette i sur 2005) koji su ustvrdili da u staničnoj liniji SW480, mutirani p53 protein ima mogućnost vezanja promotora i indukcije ekspresije gena p21. Također, pokazali su da je razina p53 proteina u ovim stanicama konstantno povišena što za posljedicu ima visoke bazalne razine p21 proteina, neovisne o staničnom stresu (Rochette i sur. 2005). Vizualizacijom proteina nismo uspjeli dobiti dokaz za postojanje bazalnog p21 proteina kod staničnih linija SW620 i CaCo-2, što je očekivano za SW620, međutim, ne slaže se sa dosadašnjim podacima za CaCo-2 (Kralj i sur. 2003). Literaturni podaci pokazuju da stanice linije CaCo-2 imaju jedan mutirani i jedan deletirani p53 alel (Djelloul i sur. 1997), međutim utvrđeno je da stanice nakon postizanja konfulentnosti spontano diferenciraju pri čemu im raste bazalna ekspresija p21 proteina (Gartel i sur. 1996). Smatra se da se u tom slučaju gen p21 inducira putem neovisnim o p53 transkripcijskom faktoru.

Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da je utjecaj testiranih kemoterapeutika na rast ispitivanih tumorskih staničnih linija debelog crijeva jači u kombinaciji s egzogenim p21 proteinom. Dodatnu inhibiciju rasta u slučaju transdukcije s Ad5CMVp21 vektorom su pokazale stanične linije SW620, HCT116 i CaCo-2, dok kod stanične linije SW480 nismo zamjetili razliku u postotku rasta u odnosu na inhibiciju rasta uzrokovanu kemoterapeutikom. U literaturi postoje navodi kako je kočenje rasta stanica posredstvom egzogeno eksprimiranog gena p21<sup>WAF1/Cip1</sup> značajnije kod stanica s mutiranim ili nefunkcionalnim p53 genom koje ne eksprimiraju endogeni p21 protein, međutim u ovom pokusu nismo zamjetili tu poveznost. (Kralj 2001; Blagosklonny i El-Deiry 1998; Katayose i sur. 1995) S obzirom da korišteni kemoterapeutici različitim mehanizmima uzrokuju oštećenja DNA i na složenu mrežu djelovanja p21 proteina, nužno je provesti daljnje eksperimente kojima bi se dobio uvid u stanični ciklus i apoptozu.

Mogućnost korištenja gena p21<sup>WAF1/Cip1</sup> u svrhu genskog liječenja tumora, sasvim sigurno ima puno potencijala, međutim s obzirom na složenu mrežu interakcija i postojeće kontradiktorne rezultate o utjecaju na „život i smrt“ stanice potrebno je još detaljnih istraživanja da bi upoznali maleni ali utjecajni protein p21.

## ZAKLJUČAK

1. Kemoterapeutici 5-fluorouracil, etopozide, cisplatina, kamptotecin i doksorubicin usporavaju rast tumorskih staničnih linija HCT116, SW480, SW620, CaCo-2. S obzirom na dobivene  $IC_{50}$  vrijednosti 5-fluorouracil najslabije inhibira tumorske stanice ( $IC_{50} \approx 10^{-5}$ ), dok najjače djelovanje pokazuje kamptotecin ( $IC_{50} \approx 10^{-8}$ ).
2. Stanična linija SW480 je najosjetljivija na djelovanje svih testiranih kemoterapeutika.
3. Najznačanije kočenje rasta posredstvom adenovirusnog vektora s genom p21 postignuto je kod staničnih linija HCT116 i SW620, pri koncentraciji virusa od 60MOI, peti dan nakon zaražavanja.
4. Egzogeno eksprimirani protein p21 pojačava inhibitorni učinak kemoterapeutika cisplatine, doksorubicina i kamptotecina na rast staničnih linija HCT116, SW620 i CaCo-2, pri čemu je utjecaj na stanice CaCo-2 slabiji.
5. Učinak kamptotecina i cisplatine je u odnosu na doksorubicin značajnije pojačan posredstvom proteina p21 kod stanične linije HCT116 i SW620, dok je kod stanica CaCo-2 učinak p21 na inhibiciju rasta podjednak za sve kemoterapeutike.
6. Ekspresija egzogenog proteina p21 ne pojačava inhibitorni učinak kemoterapeutika na stanice SW480.

## LITERATURA

- Abbas T, and A Dutta. 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature Reviews. Cancer* 9, no. 6 (June): 400-414. doi:10.1038/nrc2657.
- Abukhdeir A M, and B H Park. 2008. P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 10: e19. doi:10.1017/S1462399408000744.
- Agrez M. V., M. M. Ames, and M. M. Lieber. 1983. In vitro chemotherapy sensitivity patterns of human colon carcinoma continuous cell lines. *Journal of Surgical Oncology* 24, no. 1: 79-82. doi:10.1002/jso.2930240118.
- Anon. 1999. Mechanisms and regulation of the degradation of cyclin B. Text. September 29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1692665/?tool=pmcentrez>.
- Baldwin E L, and N Osheroff. 2005. Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Current Medicinal Chemistry. Anti-Cancer Agents* 5, no. 4 (July): 363-372.
- Ball K L. 1997. p21: structure and functions associated with cyclin-CDK binding. *Progress in Cell Cycle Research* 3: 125-134.
- Barboza J A, G Liu, Z Ju, A K El-Naggar, and G Lozano. 2006. p21 delays tumor onset by preservation of chromosomal stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, no. 52 (December 26): 19842-19847. doi:10.1073/pnas.0606343104.
- Bates S, K M Ryan, A C Phillips, and K H Vousden. 1998. Cell cycle arrest and DNA endoreduplication following p21Waf1/Cip1 expression. *Oncogene* 17, no. 13 (October 1): 1691-1703. doi:10.1038/sj.onc.1202104.
- Bergmann-Leitner E S, and S I Abrams. 2000. Differential role of Fas/Fas ligand interactions in cytolysis of primary and metastatic colon carcinoma cell lines by human antigen-specific CD8+ CTL. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 164, no. 9 (May 1): 4941-4954.
- Blagosklonny M V, and W S El-Deiry. 1998. Acute overexpression of wt p53 facilitates anticancer drug-induced death of cancer and normal cells. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 75, no. 6 (March 16): 933-940.
- Blagosklonny M V, and W S el-Deiry. 1996. In vitro evaluation of a p53-expressing adenovirus as an anti-cancer drug. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 67, no. 3 (July 29): 386-392. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19960729)67:3<386::AID-IJC13>3.0.CO;2-6.
- Cappell M S. 2007. From colonic polyps to colon cancer: pathophysiology, clinical presentation, screening and colonoscopic therapy. *Minerva Gastroenterologica E Dietologica* 53, no. 4 (December): 351-373.

- Chang B D, K Watanabe, E V Broude, J Fang, J C Poole, T V Kalinichenko, and I B Roninson. 2000. Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, no. 8 (April 11): 4291-4296.
- Chopin V, R A Toillon, N Jouy, and X Le Bourhis. 2004. P21(WAF1/CIP1) is dispensable for G1 arrest, but indispensable for apoptosis induced by sodium butyrate in MCF-7 breast cancer cells. *Oncogene* 23, no. 1 (January 8): 21-29. doi:10.1038/sj.onc.1207020.
- Deng C, P Zhang, J W Harper, S J Elledge, and P Leder. 1995. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82, no. 4 (August 25): 675-684.
- Djelloul S, M E Fogue-Lafitte, B Hermelin, M Mareel, E Bruyneel, A Baldi, A Giordano, E Chastre, and C Gespach. 1997. Enterocyte differentiation is compatible with SV40 large T expression and loss of p53 function in human colonic Caco-2 cells. Status of the pRb1 and pRb2 tumor suppressor gene products. *FEBS Letters* 406, no. 3 (April 14): 234-242.
- el-Deiry W S, T Tokino, V E Velculescu, D B Levy, R Parsons, J M Trent, D Lin, W E Mercer, K W Kinzler, and B Vogelstein. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, no. 4 (November 19): 817-825.
- Ferbeyre G, E de Stanchina, E Querido, N Baptiste, C Prives, and S W Lowe. 2000. PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes & Development* 14, no. 16 (August 15): 2015-2027.
- Frederick C A, L D Williams, G Ughetto, G A van der Marel, J H van Boom, A Rich, and A H Wang. 1990. Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: adriamycin and daunomycin. *Biochemistry* 29, no. 10 (March 13): 2538-2549.
- Gartel A L, M S Serfas, M Gartel, E Goufman, G S Wu, W S el-Deiry, and A L Tyner. 1996. p21 (WAF1/CIP1) expression is induced in newly nondividing cells in diverse epithelia and during differentiation of the Caco-2 intestinal cell line. *Experimental Cell Research* 227, no. 2 (September 15): 171-181. doi:10.1006/excr.1996.0264.
- Gartel A L, M S Serfas, and A L Tyner. 1996. p21--negative regulator of the cell cycle. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 213, no. 2 (November): 138-149.
- Gartel A L, and A L Tyner. 1999. Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Experimental Cell Research* 246, no. 2 (February 1): 280-289. doi:10.1006/excr.1998.4319.
- Geng Y, E N Eaton, M Picón, J M Roberts, A S Lundberg, A Gifford, C Sardet, and R A Weinberg. 1996. Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene* 12, no. 6 (March 21): 1173-1180.

- Gotoh A, C Kao, S C Ko, K Hamada, T J Liu, and L W Chung. 1997. Cytotoxic effects of recombinant adenovirus p53 and cell cycle regulator genes (p21 WAF1/CIP1 and p16CDKN4) in human prostate cancers. *The Journal of Urology* 158, no. 2 (August): 636-641.
- Harper J W, G R Adami, N Wei, K Keyomarsi, and S J Elledge. 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, no. 4 (November 19): 805-816.
- Hollstein M, B Shomer, M Greenblatt, T Soussi, E Hovig, R Montesano, and C C Harris. 1996. Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. *Nucleic Acids Research* 24, no. 1 (January 1): 141-146.
- Ito Masaki. 2000. Factors controlling cyclin B expression. *Plant Molecular Biology* 43, no. 5: 677-690. doi:10.1023/A:1006336005587.
- Joshi U S, Y Q Chen, G P Kalemkerian, M R Adil, M Kraut, and F H Sarkar. 1998. Inhibition of tumor cell growth by p21WAF1 adenoviral gene transfer in lung cancer. *Cancer Gene Therapy* 5, no. 3 (June): 183-191.
- Joshi U S, S T Dergham, Y Q Chen, M C Dugan, J D Crissman, V K Vaitkevicius, and F H Sarkar. 1998. Inhibition of pancreatic tumor cell growth in culture by p21WAF1 recombinant adenovirus. *Pancreas* 16, no. 2 (March): 107-113.
- Katayose D, R Wersto, K H Cowan, and P Seth. 1995. Effects of a recombinant adenovirus expressing WAF1/Cip1 on cell growth, cell cycle, and apoptosis. *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research* 6, no. 10 (October): 1207-1212.
- Kralj M, K Husnjak, T Körbler, and J Pavelić. 2003. Endogenous p21WAF1/CIP1 status predicts the response of human tumor cells to wild-type p53 and p21WAF1/CIP1 overexpression. *Cancer Gene Therapy* 10, no. 6 (June): 457-467. doi:10.1038/sj.cgt.7700588.
- Kraljevic Pavelic S, T Cacev, and M Kralj. 2008. A dual role of p21waf1/cip1 gene in apoptosis of HEp-2 treated with cisplatin or methotrexate. *Cancer Gene Therapy* 15, no. 9 (September): 576-590. doi:10.1038/cgt.2008.28.
- Kuhn H, U Liebers, C Gessner, L Karawajew, V Ruppert, A Schumacher, C Witt, and G Wolff. 2002. Infection of cells with replication deficient adenovirus induces cell cycle alterations and leads to downregulation of E2F-1. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1542, no. 1-3 (January 30): 106-115.
- Kumar, N. 1981. Taxol-induced polymerization of purified tubulin. Mechanism of action. *The Journal of Biological Chemistry* 256, no. 20 (October 25): 10435-10441.
- LaBaer J, M D Garrett, L F Stevenson, J M Slingerland, C Sandhu, H S Chou, A Fattaey, and E Harlow. 1997. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes & Development* 11, no. 7 (April 1): 847-862.

- Lincet H, L Poulain, J S Remy, E Deslandes, F Duigou, P Gauduchon, and C Staedel. 2000. The p21(cip1/waf1) cyclin-dependent kinase inhibitor enhances the cytotoxic effect of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Letters* 161, no. 1 (December 8): 17-26.
- Liu S, W R Bishop, and M Liu. 2003. Differential effects of cell cycle regulatory protein p21(WAF1/Cip1) on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* 6, no. 4 (August): 183-195.
- Lowe S W, E Cepero, and G Evan. 2004. Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432, no. 7015 (November 18): 307-315. doi:10.1038/nature03098.
- Martín-Caballero J, J M Flores, P García-Palencia, and M Serrano. 2001. Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice. *Cancer Research* 61, no. 16 (August 15): 6234-6238.
- Martinez L A, J Yang, E S Vazquez, M C Rodriguez-Vargas, M Olive, J T Hsieh, C J Logothetis, and N M Navone. 2002. p21 modulates threshold of apoptosis induced by DNA-damage and growth factor withdrawal in prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 23, no. 8 (August): 1289-1296.
- Matlashewski G, P Lamb, D Pim, J Peacock, L Crawford, and S Benchimol. 1984. Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *The EMBO Journal* 3, no. 13 (December 20): 3257-3262.
- Meunier V, M Bourrié, Y Berger, and G Fabre. 1995. The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biology and Toxicology* 11, no. 3-4 (August): 187-194.
- Moldovan G L, B Pfander, and S Jentsch. 2007. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* 129, no. 4 (May 18): 665-679. doi:10.1016/j.cell.2007.05.003.
- Nitiss J L. 2009. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature Reviews. Cancer* 9, no. 5 (May): 338-350. doi:10.1038/nrc2607.
- Noda A, Y Ning, S F Venable, O M Pereira-Smith, and J R Smith. 1994. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Experimental Cell Research* 211, no. 1 (March): 90-98. doi:10.1006/excr.1994.1063.
- Olivier M, A Petitjean, V Marcel, A Pétré, M Mounawar, A Plymoth, C C de Fromentel, and P Hainaut. 2009. Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer Gene Therapy* 16, no. 1 (January): 1-12. doi:10.1038/cgt.2008.69.
- Parker L P, J K Wolf, and J E Price. 2000. Adenoviral-mediated gene therapy with Ad5CMVp53 and Ad5CMVp21 in combination with standard therapies in human breast cancer cell lines. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 30, no. 4 (October): 395-405.

- Pommier Y, C Redon, V Ashutosh Rao, J A Seiler, O Sordet, H Takemura, S Antony, et al. 2003. Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. *Mutation Research* 532, no. 1-2 (November 27): 173-203.
- Qin L F, and I O Ng. 2001. Exogenous expression of p21(WAF1/CIP1) exerts cell growth inhibition and enhances sensitivity to cisplatin in hepatoma cells. *Cancer Letters* 172, no. 1 (October 22): 7-15.
- Rajamanickam, Subapriya, and Agarwal. 2008. Natural products and colon cancer: current status and future prospects. *Drug Development Research* 69, no. 7 (November 1): 460-471. doi:10.1002/ddr.20276.
- Ramondetta L, G B Mills, T W Burke, and J K Wolf. 2000. Adenovirus-mediated expression of p53 or p21 in a papillary serous endometrial carcinoma cell line (SPEC-2) results in both growth inhibition and apoptotic cell death: potential application of gene therapy to endometrial cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 6, no. 1 (January): 278-284.
- Rochette P J, N Bastien, J Lavoie, S L Guérin, and R Drouin. 2005. SW480, a p53 double-mutant cell line retains proficiency for some p53 functions. *Journal of Molecular Biology* 352, no. 1 (September 9): 44-57. doi:10.1016/j.jmb.2005.06.033.
- Ruan S, M F Okcu, J P Ren, P Chiao, M Andreeff, V Levin, and W Zhang. 1998. Overexpressed WAF1/Cip1 renders glioblastoma cells resistant to chemotherapy agents 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and cisplatin. *Cancer Research* 58, no. 7 (April 1): 1538-1543.
- Sambuy Y, I De Angelis, G Ranaldi, M L Scarino, A Stammati, and F Zucco. 2005. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology* 21, no. 1 (January): 1-26. doi:10.1007/s10565-005-0085-6.
- Schmidt M, and Z Fan. 2001. Protection against chemotherapy-induced cytotoxicity by cyclin-dependent kinase inhibitors (CKI) in CKI-responsive cells compared with CKI-unresponsive cells. *Oncogene* 20, no. 43 (September 27): 6164-6171. doi:10.1038/sj.onc.1204814.
- Schmidt M, Y Lu, J M Parant, G Lozano, G Bacher, T Beckers, and Z Fan. 2001. Differential roles of p21(Waf1) and p27(Kip1) in modulating chemosensitivity and their possible application in drug discovery studies. *Molecular Pharmacology* 60, no. 5 (November): 900-906.
- Sherr, C J. 1996. Cancer cell cycles. *Science (New York, N.Y.)* 274, no. 5293 (December 6): 1672-1677.
- Sherr, C J. 2004. Principles of tumor suppression. *Cell* 116, no. 2 (January 23): 235-246.
- Suzuki A, Y Tsutomi, K Akahane, T Araki, and M Miura. 1998. Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP. *Oncogene* 17, no. 8 (August 27): 931-939. doi:10.1038/sj.onc.1202021.

- Tom S, T A Ranalli, V N Podust, and R A Bambara. 2001. Regulatory roles of p21 and apurinic/aprimidinic endonuclease 1 in base excision repair. *The Journal of Biological Chemistry* 276, no. 52 (December 28): 48781-48789. doi:10.1074/jbc.M109626200.
- Tsao Y P, S J Huang, J L Chang, J T Hsieh, R C Pong, and S L Chen. 1999. Adenovirus-mediated p21((WAF1/SDII/CIP1)) gene transfer induces apoptosis of human cervical cancer cell lines. *Journal of Virology* 73, no. 6 (June): 4983-4990.
- Umar A, A B Buermeyer, J A Simon, D C Thomas, A B Clark, R M Liskay, and T A Kunkel. 1996. Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. *Cell* 87, no. 1 (October 4): 65-73.
- Viallard J F, F Lacombe, F Belloc, J L Pellegrin, and J Reiffers. 2001. [Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology]. *Cancer Radiothérapie: Journal De La Société Française De Radiothérapie Oncologique* 5, no. 2 (April): 109-129.
- Vincent T L, and R A Gatenby. 2008. An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. *International Journal of Oncology* 32, no. 4 (April): 729-737.
- Vogelstein B, D Lane, and A J Levine. 2000. Surfing the p53 network. *Nature* 408, no. 6810 (November 16): 307-310. doi:10.1038/35042675.
- Vogelstein B, and K W Kinzler. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine* 10, no. 8 (August): 789-799. doi:10.1038/nm1087.
- Yu, Huijuan, and Xuebiao Yao. 0. Cyclin B1: conductor of mitotic symphony orchestra. *Cell Res* 18, no. 2: 218-220.
- Zhu, L, E Harlow, and B D Dynlacht. 1995. p107 uses a p21CIP1-related domain to bind cyclin/cdk2 and regulate interactions with E2F. *Genes & Development* 9, no. 14 (July 15): 1740-1752.
- Zhu Q, J Liu, C Yang, H Xu, An Zhang, Y Cui, H Wang, C Qin, and Y Li. 2006. Influence of antitumor drugs on the expression of Fas system in SW480 colon cancer cells. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 18, no. 10 (October): 1071-1077. doi:10.1097/01.meg.0000231750.68513.6c.
- Zitvogel L, A Tesniere, and G Kroemer. 2006. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nature Reviews. Immunology* 6, no. 10 (October): 715-727. doi:10.1038/nri1936.

