

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SARA TRATNIK

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SARA TRATNIK

**VREDNOTENJE ANTIPROLIFERATIVNE AKTIVNOSTI ZAVIRALCEV HSP90
IN TOPOIZOMERAZE II α NA CELIČNI LINIJI RAKA DOJKE (MCF-7)**

EVALUATION OF THE ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF HSP90 INHIBITORS
AND INHIBITORS OF TOPOISOMERASE II α ON BREAST CANCER CELL LINE
(MCF-7)

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko naložko sem opravljala na katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Lucije Peterlin Mašič, mag. farm..

Zahvaljujem se svoji mentorici prof. dr. Luciji Peterlin Mašič za zaupanje in priložnost opravljati zanimivo eksperimentalno delo v celičnem laboratoriju, kjer sem pridobila veselje do raziskovanja in veliko izkušenj za delo s celicami. Iskrena hvala za vso pomoč in vodenje pri izdelavi naloge.

Posebno se zahvaljujem Darji Gramec Skledar in Maši Kenda za sodelovanje, potrpežljivost, nasvete in čas, ki so mi ga posvetile pri praktičnem delu.

Hvala izr. prof. dr. Janezu Ilašu, doc. dr. Tihomirju Tomašiču in Žigu Skoku za prijaznost in vse strokovne nasvete.

Navsezadnje pa naj se zahvalim družini, prijateljem in Jerneju. Hvala ker ste bili ob meni, verjeli vame, me razumeli, podpirali in spodbujali na moji poti.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložko izdelala samostojno, pod mentorstvom prof. dr. Lucije Peterlin Mašič, mag. farm..

Sara Tratnik

Ljubljana, 2018

Predsednik komisije: prof. dr. dr.h.c Stanko Srčič, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Jurij Trontelj, mag. farm.

VSEBINA

1	UVOD.....	1
1.1	CELIČNI CIKEL.....	1
1.2	NASTANEK IN ZNAČILNOSTI RAKAVIH CELIC	2
1.3	ŠAPERONI.....	4
1.4	HSP90	4
1.4.1	HSP90 kot potencialna tarča v terapiji raka	5
1.4.1.1	Znani zaviralci Hsp90	5
1.5	RAZDELITEV IN FUNKCIJA TOPOIZOMERAZ.....	7
1.5.1	Topoizomeraza II α	7
1.5.1.1	Zaviralci topoizomeraze II α	8
1.6	METODE DOLOČANJA CELIČNE PROLIFERACIJE	11
1.6.1	Merjenje sinteze DNA	11
1.6.2	Merjenje metabolne aktivnosti celic.....	12
1.6.3	Določevanje proteinov povezanih s celično delitvijo.....	12
2	NAMEN DELA.....	13
3	MATERIALI	15
3.1	CELIČNE LINIJE.....	15
3.1.1	Celična linija MCF-7	15
3.1.2	Celična linija PC3 MM2 luc	16
3.2	TESTIRANE SPOJINE IN POZITIVNE KONTROLE	16
3.3	REAGENTI	17
3.4	LABORATORIJSKE APARATURE:	17
3.5	OSTALA LABORATORIJSKA OPREMA IN PRIPOMOČKI.....	18
4	METODE	19
4.1	OSNOVE DELA S CELICAMI	19
4.2	GOJENJE CELIC	20
4.3	ŠTETJE CELIC	21
4.4	ZAMRZOVANJE CELIC	22
4.5	PRIPRAVA RAZTOPIN	22
4.5.1	Priprava raztopin testnih spojin	22
4.5.1.1	Določevanje topnosti spojin v NMR cevki.....	22

4.5.2	Priprava 1,5 do 3,0% DMSO v gojitvenem mediju.....	23
4.6	MTS TEST PROLIFERACIJE	23
4.7	TEST AKTIVNOSTI LUCIFERAZE	25
4.8	Statistična analiza rezultatov	27
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	28
5.1	TESTIRANJE NA CELIČNI LINIJI MCF-7	28
5.1.1	Eksperimentalna določitev zaviralne aktivnosti etopozida	29
5.1.2	Eksperimentalno ovrednotenje zaviralne aktivnosti testnih spojin	30
5.1.2.1	Tetrahidrobenzotiazoli	34
5.1.2.2	Benzotiazoli	36
5.1.2.3	Benzen pirolamidi.....	36
5.1.2.4	Ostale spojine.....	38
5.1.3	Težave pri testiranju slabše aktivnih spojin.....	39
5.1.4	Primerjava rezultatov s testiranjem na encimih	40
5.2	TESTIRANJE NA CELIČNI LINIJI PC3 MM2 luc.....	41
6	SKLEP	45
7	LITERATURA	47

KAZALO SLIK

Slika 1: Slika celičnega cikla	1
Slika 2: Značilnosti rakavih celic.....	3
Slika 3: Struktura C-končnega zaviralca in zaviralca Hsp90, ki zavira preko alosterične modulacije..	5
Slika 4: Strukture izbranih N-končnih zaviralcev Hsp90.....	6
Slika 5: Shema mehanizma delovanja topoizomeraze IIA z označenimi mesti, kjer delujejo znani zaviralci.....	8
Slika 6: Strukture izbranih topoizomeraznih strupov..	9
Slika 7: Kemijske strukture izbranih katalitičnih zaviralcev.....	10
Slika 8: Načrt vrednotenja izbranih zaviralcev na celični liniji MCF-7.....	14
Slika 9: Načrt vrednotenja izbranih zaviralcev na celični liniji PC3 MM2 luc.	14
Slika 10: Rast MCF-7 celic.....	15
Slika 11: Rast PC3 celic.....	16
Slika 12: Improvizirana vodna kopel pri testiranju aktivnosti luciferaze.....	19
Slika 13: Celotno polje hemocitometra	21
Slika 14: Prikaz enega od štirih kvadratov s celicami, katere vključimo v štetje.....	21
Slika 15: Strukturi MTS reagenta in njegovega obarvanega produkta formazana, ki nastane v metabolno aktivnih celicah.....	23
Slika 16: Primer načrta testne plošče, kjer smo preverjali antiproliferativno aktivnost spojin pri koncentraciji 50 µM.	25
Slika 17: Primer načrta testne plošče za določitev IC ₅₀ aktivnim spojinam (delež proliferacije <30 %) pri razširjenih koncentracijah.....	25
Slika 18: Bioluminescenčna reakcija, katalizirana z encimom luciferaze	26
Slika 19: Prikaz robnega efekta na eni izmed testnih ploščic.....	28
Slika 20: Krivulja odnosa med učinkom in logaritmom koncentracije etopozida 1	29
Slika 21: Delež proliferacije po izpostavitvi spojinam 2 - 23 pri koncentraciji 50 µM.	34
Slika 22: Krivulje odnosa med učinkom in logaritmom koncentracije za spojine 3, 5, 6, 8, 9, 11- 15 in 17	35
Slika 23: Delež proliferacije po izpostavitvi spojinam 24 - 37 pri koncentraciji 50 µM. ..	36
Slika 24: Krivulja odnosa med učinkom in logaritmom koncentracije za spojino 36	36
Slika 25: Delež proliferacije po izpostavitvi spojinam 38 - 71 pri koncentraciji 50 µM. ..	37

Slika 26: Krivulje odnosa med učinkom in logaritmom koncentracije za spojine 53, 61, 64, 65, 66 in 68	37
Slika 27: Krivulje odnosa med učinkom in logaritmom koncentracije za spojine 53 in 66 po 24, 48 in 72 urni inkubaciji.....	38
Slika 28: Delež proliferacije po izpostavitvi spojinam 72 - 79 pri koncentraciji 50 μM ...	38
Slika 29: Krivulje odnosa med učinkom in logaritmom koncentracije za spojine 74, 75, 76 in 78	39
Slika 30: Razlika v določeni IC ₅₀ vrednosti za spojino 35	40
Slika 31: Delež aktivne luciferaze po izpostavitvi spojinam 3, 5, 6, 8, 9, 11, 14, 15, 37, 80 in 81 pri 100 μM in 50 μM koncentraciji.....	42
Slika 32: Inhibicijske krivulje ponovnega zvitja luciferaze v odvisnosti od logaritma koncentracije za spojine 11, 37 in 81	43

KAZALO ENAČB

Enačba 1: Računanje koncentracije celic.	21
Enačba 2: Računanje deleža proliferacije celic.	24
Enačba 3: Izračun aktivnosti luciferaze.	27

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Topoizomerazni strupi, registrirani v Sloveniji.....	9
Preglednica II: Zaviralna aktivnost spojin na rast celic MCF-7	31
Preglednica III: Zaviralna aktivnost spojine 39 na rast celic MCF-7.....	41
Preglednica IV: Zaviralna aktivnost spojin na ponovno zvitje encima luciferaze	44

POVZETEK

Vsakodnevno smo izpostavljeni različnim karcinogenim dejavnikom, ki povzročajo kopiranje mutacij genov, ki nadzorujejo celični cikel. Te spremembe vodijo v nastanek rakavih celic, ki v procesu karcinogeneze pridobijo številne značilne biološke lastnosti. Ena glavnih značilnosti rakavih celic je njihova neprestana in nenadzorovana delitev. O vzrokih nastanka raka vemo vedno več, kar nam omogoča razvijanje novih uspešnih načinov zdravljenja.

Na Fakulteti za farmacijo so skozi leta razvijali in sintetizirali številne potencialne zaviralce proteina topotnega stresa (Hsp90) in topoizomeraze II α . Zaradi svoje vpleteneosti v celični cikel in svoje zaščitne funkcije, ta dva proteina predstavljata vse bolj pomembni tarči v razvoju novih protirakavih učinkovin. Topoizomeraza II α je že dobro znana in validirana tarča protirakavih učinkovin, medtem ko so zaviralci proteina Hsp90 v fazi intenzivnega razvoja in kliničnih raziskav. Njihova izraženost je dokazano večja v rakavih celicah, kar omogoča možnost razvoja selektivnejših protirakavih učinkovin.

Naš cilj je bil na celični liniji raka dojke (MCF-7) ovrednotiti vpliv potencialnih zaviralcev omenjenih tarč na proliferacijo celic, kar bo skupaj s strukturami pripomoglo k optimiziranju in odkrivanju novih spojin. Želeli smo odkriti čim več informacij o strukturnih elementih, pomembnih za delovanje spojin. Spojine smo izbrali iz DNA-girazne knjižnice spojin dosegljivi na Fakulteti za farmacijo in jim z MTS testom proliferacije določili zaviralno aktivnost. Za najbolj aktivne spojine smo ponovili testiranje in jim določili IC₅₀ vrednosti. Skupno smo testirali 79 spojin in od teh odkrili 22 spojin, ki so zavirale rast celic za več kot 70%. Ugotovili smo, da na aktivnost ugodno vpliva prisotnost bazičnega centra na ustreznih razdaljih vsaj dveh C-atomov od amida, medtem ko so bile spojine s prosto alifatsko karboksilno kislino neaktivne. Da bi lahko predvideli kaj več, bi bilo treba testirati večjo serijo spojin. Rezultate celičnega testiranja smo primerjali tudi s testi na encimih, vendar večje povezave nismo opazili. Iz tega smo sklepali, da spojine zavirajo proliferacijo celic najverjetneje preko drugih, do zdaj neznanih interakcij. V okviru magistrske naloge smo vzpostavili tudi novo specifično testno metodo za odkrivanje in vrednotenje zaviralcev Hsp90 na celični liniji raka prostate z luciferazo (PC3 MM2 luc). S to metodo smo testirali le najbolj obetavne zaviralce Hsp90. Želeli smo potrditi domnevo, da gre za zaviranje proliferacije preko zaviranja proteina Hsp90. Z rezultati smo dokazali šibko zaviranje Hsp90 proteina le nekaterih spojin, iz česar

sklepamo, da je posledica zaviranja verjetno tudi vezava na druge tarče. Za potrditev bodo nujne ponovitve.

Ključne besede: celični cikel, celična proliferacija, MCF-7, zaviralci Hsp90, zaviralci topoizomeraze II α

ABSTRACT

People are exposed to various carcinogenic factors that cause accumulation of gene mutations that control the cell cycle on a daily basis. These changes lead to the formation of cancer cells, which in the process of carcinogenesis gain a number of typical biological properties. One of the main features of cancer cells is their continuous and uncontrolled division. More and more information about the causes of cancer is available, which allows the scientists to develop new successful treatments.

Throughout the years, the Faculty of Pharmacy has developed and synthesized numerous potential inhibitors of the heat shock protein (Hsp90) and the topoisomerase II α . Due to their involvement in the cell cycle of the cell and their protective functions, these two proteins represent an increasingly important target in the development of the new anti-cancer drugs. Topoisomerase II α is a well-known and validated anti-infectives target, while Hsp90 protein inhibitors are at the stage of intensive development and clinical research. Their expression is proven to be higher in cancerous cells, which makes it possible to develop more selective anti-cancer agents.

Our goal was to evaluate the impact of potential inhibitors of these targets on cell proliferation on the cell line of breast cancer (MCF-7), which will, together with the structures, help to optimize and detect new compounds. We wanted to find out as much information about the structural elements that are important to the functioning of the compounds. The compounds were selected from the DNA-gyroscope library available at the Faculty of Pharmacy and their inhibitory activity was determined with the MTS proliferation assay. For the most active compounds, we repeated the testing and determined the IC₅₀ values. Altogether, 79 compounds were tested and 22 compounds were found to inhibit cell growth by more than 70%. We found out that the activity is favorably affected by the presence of a base center at an appropriate distance of at least two C-atoms from the amide, while the compounds with the free aliphatic carboxylic acid were inactive. In order to predict more, a larger series of compounds should be tested. The results of the cell testing were also compared with the enzyme tests, but we did not notice any major connections. It was therefore concluded that the compounds most likely inhibit the proliferation of cells through other unknown interactions. Within the Master's thesis, we also established a new specific test method for the detection and evaluation of Hsp90 inhibitors on the cell line of prostate cancer with luciferase (PC3 MM2 luc). We tested

only the most promising Hsp90 inhibitors using this method. We wanted to confirm the assumption that proliferation is blocked by inhibiting the Hsp90 protein. The results proved the weak inhibit of Hsp90 protein of only some compounds, which suggests that the consequence of inhibiting is probably also binding to other targets. To confirm, it will be necessary to repeat the test method.

Key words: cell cycle, cell proliferation, MCF-7, Hsp90 inhibitors, topoisomerase II α inhibitors

SEZNAM OKRAJŠAV

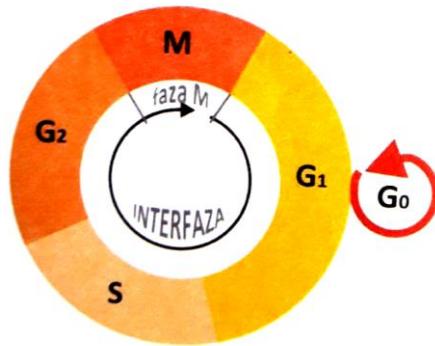
Hsp90	protein toplotnega šoka 90 kDA (heat shock protein)
kDA	enota za maso, s katero izražamo atomske in molekulske mase
MCF-7	celična linija raka dojke (Michigan Cancer Foundation-7)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol
IC₅₀	inhibitorna koncentracija, ki nam pove koliko zdravilne učinkovine je potrebno, da dosežemo 50% delež inhibitornega učinka neke biološke ali biokemijske funkcije
PC3 MM2 luc	celična linija raka prostate s povečano izraženo luciferazo
UV	ultravijolična svetloba
ATP	adenozin trifosfat
GHKL	encimski kompleks giraza, Hsp90, histidin kinaza, MutL protein
BrDU	timidinski analog 5-bromo-2-deoksiridin
IdU	timidinski analog 5-jodo-2-deoksiridin
CldU	5-kloro-2-deoksiridin
EdU	5-etinil-2-deoksiridin
NADH	reduciran β-nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	reduciran β-nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
DMSO	dimetil sulfoksid
tpIIα	encim topoizomeraza II alfa
Luc2/mCherry	luciferazni gen kresničke
pac	gen za rezistenco na puromicin
MEM	osnovno Eaglovo gojišče (Minimum Essential Medium Eagle)
FBS	fetalni goveji serum
DMEM	Eaglovo gojišče, prilagojeno po Dulbecou (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
PBS	fosfatni pufer
LAF	brezprašna komora z laminarnim pretokom zraka

NMR	jedrska magnetna resonanca (nuclear magnetic resonance)
PES	elektron prenašalni reagent (fenazin etosulfat)
A549	celična linija pljučnega raka
HCT116	celična linija raka debelega črevesja in danke
RA	rezidualna aktivnost

1 UVOD

1.1 CELIČNI CIKEL

Celični cikel je zaporedje dogodkov, ki vodijo celico do njene delitve. Začne se z rastjo celice in nadaljuje s podvojitvijo dednega materiala, tej pa sledi delitev, s katero se dedni material razporedi v dve novonastali hčerinski celici. Ti dogodki se ponavljajo iz generacije v generacijo celic, zato govorimo o življenjskem krogu celice (slika 1) (1).



Slika 1: Slika celičnega cikla (1).

Cikel pri evkarijontih celicah obsega obdobje interfaze in obdobje mitoze (faza M). Shema celičnega cikla je prikazana na sliki 1. V interfazi celica raste, shranjuje hrnilne snovi in se pripravlja na obdobje mitotske delitve, ter se med tem razdeli v dve celici. Interfazo delimo na tri obdobja: faza G₁, S in G₂. Faza G₁ je najbolj nestalno obdobje, ki sledi mitozi in poteka do začetka podvajanja DNA. V tej fazi celica začne ponovno rasti in se pripravlja na podvajanje DNA. V povprečju faza poteka 3 ure, na njeno dolžino pa vplivajo številni dejavniki, kot so: mitogeni, rastni faktorji, hormoni in celični stiki. Če zunajcelični dejavniki ali dokončna diferenciranost celice zavirajo napredovanje celičnega cikla, celica vstopi v mirujočo fazo G₀. Ta traja, dokler pogoji niso primerni za rast in delitev celice, kar lahko traja tudi več dni ali tednov. Izjemoma v fazi G₀ ostanejo vse do smrti zrele celice, ki so dokončno diferencirane, saj nimajo več sposobnosti celične delitve. Po fazi G₁ sledi faza S, v kateri poteka sinteza DNA in traja približno 7 ur. pride do podvojitve kromosomov in na koncu S faze je kromosom sestavljen iz dveh sestrskih kromatid. Fazi sinteze sledi še faza G₂, zadnja faza pred mitozo. Celice se v tej fazi dokončno pripravijo na delitev, tako da pospešeno sintetizirajo specifične beljakovine za celično delitev. Povprečno po 3 do 4 urah celice vstopijo v fazo M, kjer poteka razdelitev kromosomov, jedra in po končani mitozi se razdeli še celotna celica (citokinez). Mitoza traja od ene do

pol ure. Celotna dolžina cikla je pri različnih celicah različna, povprečno traja 24 ur, kar pa je odvisno predvsem od dolžine interfaze, saj je dolžina faze M razmeroma stalna. V zdravem organizmu so vse faze celičnega cikla natančno regulirane. Celice se za rast organov in njihovo obnavljanje delijo glede na potrebe določenega tkiva. Ob zadostni količini celic je delitev celic zavrta in pospešena v primeru potrebe po novih celicah. V primeru okvarjenih kontrolnih mehanizmov celičnega cikla, se delijo tudi celice s poškodovano ali spremenjeno DNA, kar lahko vodi do nenadzorovane celične delitve in nastanka raznih bolezni (1, 2).

1.2 NASTANEK IN ZNAČILNOSTI RAKAVIH CELIC

Rak je skupina bolezni, za katere je značilna nekontrolirana rast celic v različnih organih, brez fiziološke funkcije za ta organ in je posledica irreverzibilne poškodbe. Danes še vedno ne poznamo vseh podrobnosti, ki bi razkrivale natančen potek procesa nastanka raka, vendar o vzrokih za nastanek raka vemo vedno več, kar nam omogoča razvijanje številnih novih uspešnih načinov zdravljenja. Proses, kjer iz normalne celice nastane rakava, imenujemo karcinogeneza ali onkogeneza. Proses je večstopenjski in dolgotrajen. Začne se z iniciacijo karcinogenih sprememb, vendar po tej fazi še ne govorimo o rakasti celici, kajti potrebna je še faza promocije. V tej fazi se spremenjena celica deli in izraža vse pridobljene lastnosti. Na razvoj vplivajo razni kancerogeni dejavniki, kot so starost, spol, dedni dejavniki, kronična vnetja, kemični, fizikalni (UV sevanje, ionizirajoče sevanje) in biološki dejavniki (virusi). Ti povzročajo mutacije v protoonkogenih, ki skrbijo za rast, smrt in diferenciacijo celic, ter tumor supresorskih genih, ki nadzorujejo celični cikel in sodelujejo pri popravljanju napak v molekuli DNA. Pomembno je, da spremembe nastanejo na obeh skupinah genov. Protoonkogeni so proteini, ki jih kodirajo onkogeni, ter so med karcinogenezo prekomerno izraženi. Spodbudijo delitev celic in preprečijo smrt. Že en mutiran alel je dovolj, da povzroči nekontrolirano celično delitev. Tumorski supresorski geni lahko direktno ali posredno preprečijo delitev celice ali povzročijo smrt celice. V nasprotju s protoonkogeni so med karcinogenezo neaktivni in s tem celica izgubi sposobnost, da prepreči delitev. Za popolno neaktivnost je potrebna mutacija na obeh alelih. Da celica postane rakava in nesmrtna je potrebnih več mutacij v genih, prav tako morajo pridobiti lastnosti, ki jo naredijo razmeroma neodvisno od ustaljenih mehanizmov v normalnih celicah. Ker so mehanizmi, ki uravnavajo življenski cikel celice, odvisni od vrste celice oz. tkiva, iz katerega celica izhaja, so kombinacije lastnosti, ki jih mora rakava

celica pridobiti za različne vrste raka, različne. Vse lastnosti rakavih celic lahko strnemo na šest glavnih kategorij, ki so prikazane na sliki 2 (2-5).



Slika 2: Značilnosti rakavih celic. Prijejeno po (4).

Sprva je za preživetje rakave celice pomembna slabša prepoznavnost za imunski sistem in s tem imunska neodzivnost, kar si rakava celica pridobi s tvorbo različnih antigenov, ki jih imunski sistem ne prepozna ali pa začne izražati molekule, ki uničujejo celice imunskega sistema. Rakave celice so si samozadostne v rastnih signalih za lastno delitev, kar pomeni da je večina potrebnih signalov za podvojitev, reguliranih znotraj same celice, neodvisno od signalov iz okolja. Neodzivne so na protirastne signale, ki natančno uravnavajo celično delitev in se zato nekontrolirano delijo. Na svoji poti maligne transformacije postanejo neodzivne na popravljalne mehanizme, ki ob hujših napakah bodisi popravijo celico ali pa jo preusmerijo v apoptozo. To celici omogoči prenos mutacije in njeno izražanje v hčerinskih celicah. S tem postane celica tudi genetsko nestabilna, zaradi česar je neodzivna za razne spremembe, kar ji omogoča boljše in hitrejše prilagajanje na vplive iz okolja. Poleg vseh omenjenih lastnosti pa je za rast raka pomembna še njihova sposobnost tvorbe angiogenih dejavnikov, ki omogočajo neovaskularizacijo tumorskega tkiva. S tem imajo celice tudi sposobnost večje mobilnosti, invazivnosti in metastaziranja (2-5).

1.3 ŠAPERONI

Nepravilno zvijanje in posledična agregacija proteinov ima škodljive učinke na celice in vodi do mnogih genskih nepravilnosti in bolezni. Šaperoni so raznolika skupina proteinov, ki so vključeni v številne procese za vzdrževanje homeostaze ostalih proteinov, kar ima bistven pomen za preživetje celic. Njihova ključna vloga je ohranjanje proteinov v aktivni in stabilni konformaciji, uravnavanje pravilnega zvitja in razvijanja, prepoznavanje in uničenje napačno zvitih proteinov, ter sodelovanje pri njihovi sintezi in lokalizaciji. Večinoma pri tem porabljajo energijo v obliki ATP. Posebno izraženi so v patoloških okoliščinah, saj ščitijo celice pred stresom in jim tako omogočijo preživetje. Delimo jih na proteine toplotnega stresa (heat shock protein, Hsp), košaperone in šaperonine (6).

1.4 HSP90

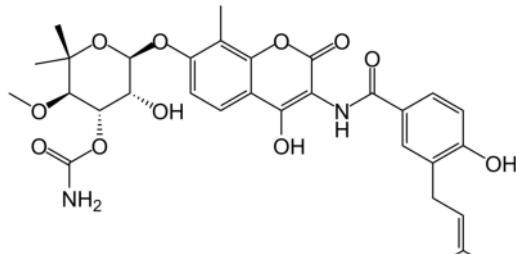
Protein toplotnega stresa 90kDa (Hsp90) spada med molekularne šaperone in je eden najbolj zastopanih in pomembnih proteinov v sesalskih celicah. Odgovoren je za aktivacijo, prenos, pravilno zvijanje, zorenje, razgradnjo in stabilnost več kot 200 klientov, ki imajo pomembno vlogo v različnih signalnih poteh celičnega cikla. Nahaja se v štirih izoformah. V citoplazmi sta pretežno prisotni glavni izoformi; Hsp90 α , ki je inducibilno izražena v stresnih pogojih in konstitutivno izražena Hsp90 β . V mitohondrijih se nahaja izofoma TRAP1, v endoplazmatskem retikulumu pa Grp94. Protein spada v ATP-aze in se nahaja v obliki homodimera, kjer je vsak monomer sestavljen in N-končne, notranje in C-končne enote. N-končna enota je odgovorna za vezavo molekule ATP. Povezana je z notranjo, ki je pomembna za prepoznavanje, vezavo α -fosfata molekule ATP, potencialnih zaviralcev in substratov, ki jih drugače imenujemo tudi蛋白i klienti, ter igra pomembno vlogo pri uravnavanju ATP-azne aktivnosti N-končne enote. C-končna enota, je potrebna za dimerizacijo Hsp90 in usklajevanje interakcij med Hsp90, njegovimi klienti in košaperoni. Prav tako vsebuje majhno ATP vezavno mesto, ki alosterično regulira vezavo molekule ATP na N-končno enoto. Normalno v citosolu Hsp90 obsega 1-2 % celotne količine proteinov, v stresnih okoliščinah pa se njegova količina poveča na 4-6 %. Za doseganje svoje polne aktivnosti sodeluje s številnimi drugimi šaperoni in majhnimi košaperoni (7-10).

1.4.1 HSP90 kot potencialna tarča v terapiji raka

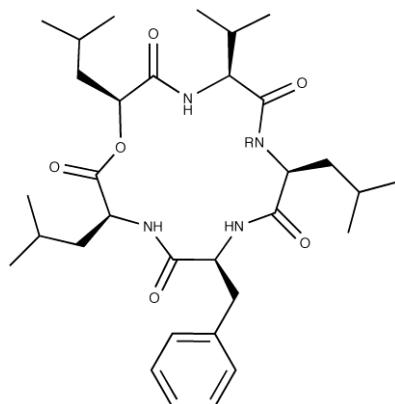
Zaradi njegove zaščitne funkcije je izraženost Hsp90 v rakavih celicah, vključno v celicah raka dojke (MCF-7), 2-10 krat večje kot v zdravih celicah (11). Hsp90 regulira delovanje mnogih klientov, ki so ključni v številnih signalnih poteh, potrebnih za rast in preživetje rakavih celic. Z zaviranjem proteina tako lahko povzročimo hkratno degradacijo več kot 30 protirakavih tarč, kar ima velik vpliv na razvoj vseh šestih značilnosti rakavih celic. Poleg tega, da je izražanje proteina Hsp90 v rakavih celicah povečano, je znano tudi, da se zaviralci Hsp90, vežejo v ATP vezavno mesto rakavih celic z večjo afiniteto, kot v zdrave celice. Zaradi vseh ugotovljenih dejstev, je že dolgo znan kot pomembna tarča v terapiji raka, z možnostjo razvoja novih, selektivnejših protirakavih učinkovin. V zadnjem času predstavlja tudi potencialno tarčo v razvoju novih protivirusnih učinkovin in učinkovin za zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni (8, 10, 11, 12).

1.4.1.1 Znani zaviralci Hsp90

Razvitih je bilo že veliko zaviralcev, ki se vežejo v ATP-vezavno mesto na N-končnem delu, v zadnjem času pa so vse bolj obetavne tudi učinkovine ki se vežejo na C-končni del proteina. Prvi znan C-končni zaviralec, sicer z zelo šibko vezavo je novobiocin (slika 3). Poleg teh dveh skupin, so poznane še spojine, ki zavirajo Hsp90 preko alosterične modulacije, primer je naravni zaviralec sansalvamid A. Njegova struktura je prikazana na sliki 3 (13).



Novobiocin

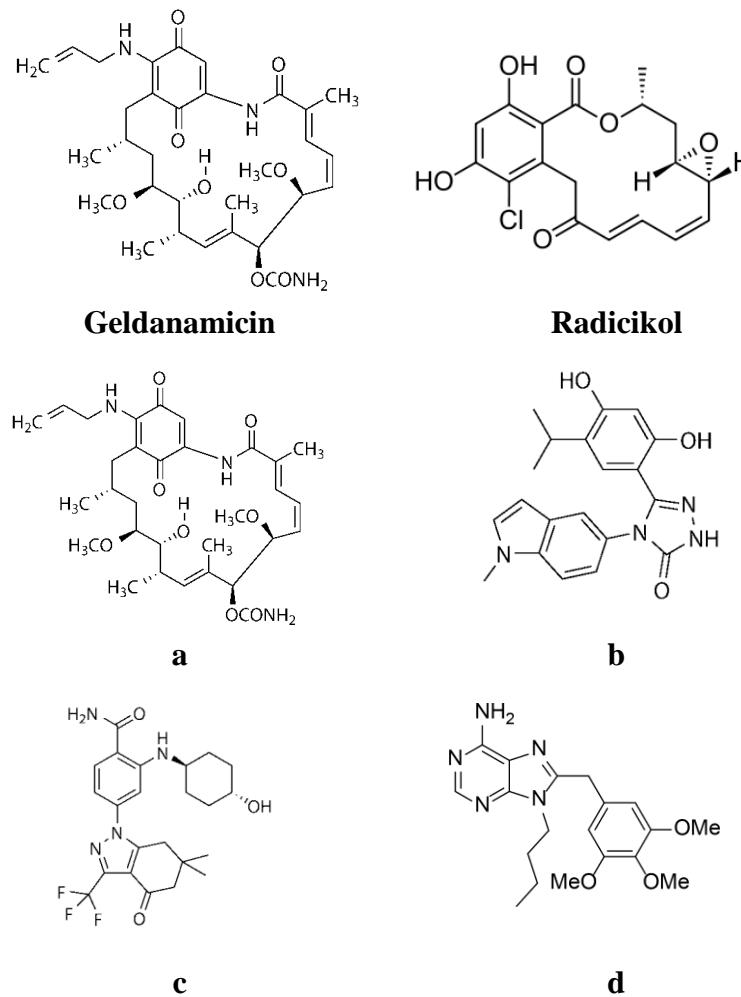


Sansalvamid A

Slika 3: Struktura C-končnega zaviralca in zaviralca Hsp90, ki zavira preko alosterične modulacije. Prirejeno po (13).

Trenutno so znotraj kliničnega razvoja le zaviralci, ki se vežejo na N-končno enoto. Prvi znan N-končni zaviralec, je benzokinonski derivat geldanamicin. Izkazuje znatno protitumororno delovanje, vendar se zaradi slabe topnosti in visoke toksičnosti ne more uporabljati kot učinkovina. Iz te skupine je poznan tudi naravni zaviralec radicikol. In vitro študije so izkazovale dobro protitumororno učinkovitost, vendar je bil in vivo neučinkovit, kar je najverjetneje posledica slabe biološke stabilnosti. Kljub temu, da nobeden od njiju ni primeren za zdravljenje, je njun razvoj znatno pripomogel k načrtovanju novih spojin z izboljšanimi farmacevtskimi lastnostmi. Trenutno so znotraj kliničnih testiranj različni derivati geldanamicina (a), radicikola, resorcinola (b), dihidro-indazolona (c), ter nekateri analogi purina (d). Nobena učinkovina do sedaj še ni prešla iz kliničnih testiranj na trg, kar je najverjetneje posledica njihove omejene učinkovitosti in pojavnosti neželenih učinkov.

Na sliki 4 so prikazani primeri struktur N-končnih zaviralcev Hsp90 (12, 13, 14).



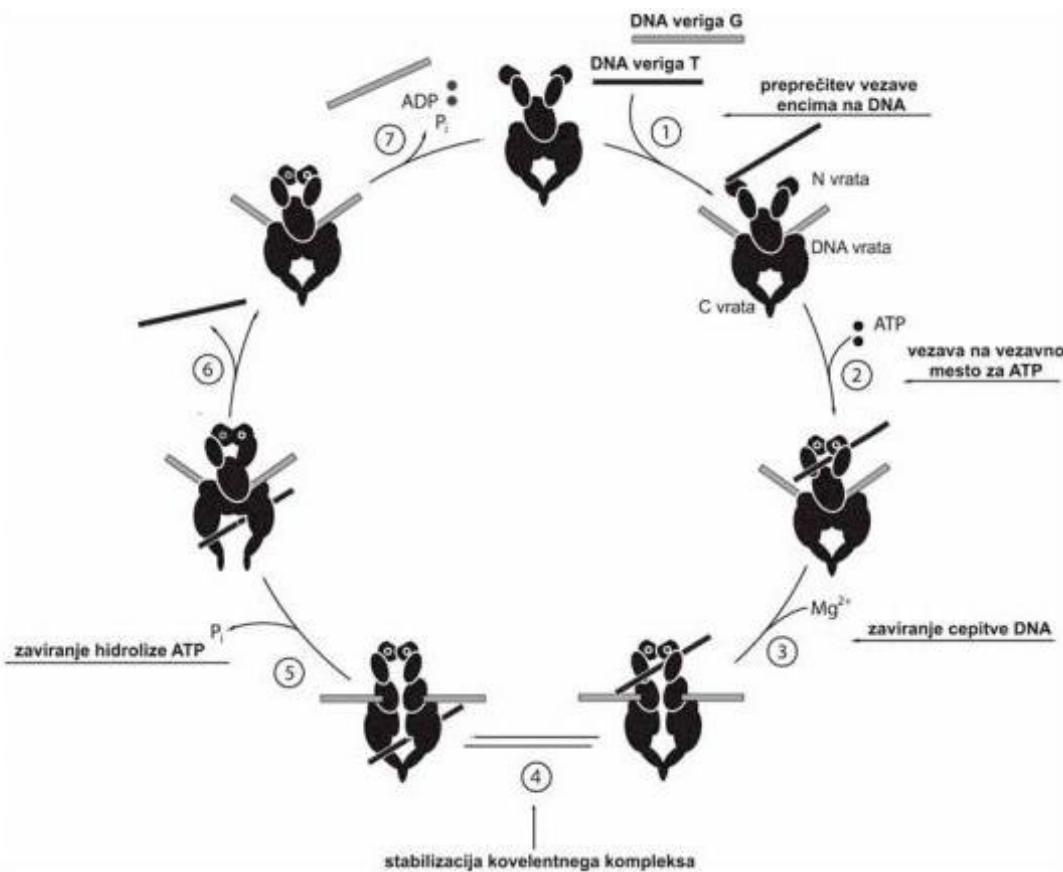
Slika 4: Strukture izbranih N-končnih zaviralcev Hsp90. Prirejeno po (13, 14).

1.5 RAZDELITEV IN FUNKCIJA TOPOIZOMERAZ

Topoizomeraze so velika skupina encimov prisotne v vseh celicah, ki katalizirajo topološke spremembe v molekuli DNA in spreminjajo njeno obliko. Delimo jih v dve glavni skupini: tip I in tip II, te pa glede na organizem, mehanizem cepitve in aminokislinsko zaporedje še na več posameznih družin. Tip I deluje tako, da cepi eno verigo v dvojerižni DNA, tip II pa cepi obe verigi. Topoizomeraze II so preko tvorbe kovalentnega kompleksa z DNA sposobne sproščati dodatne zavoje, razpletanja in razvozlanja, kar je nujno za nemoten potek celične delitve, prepisovanja in navsezadnje preživetje celice (15).

1.5.1 Topoizomeraza II α

Človeška DNA topoizomeraza II α predstavlja že dobro znano in validirano tarčo protirakovih učinkovin, ki jih uporabljamo za zdravljenje raka pljuč, dojk, prostate, sarkoma in hematoloških oblik raka. Do sedaj še ni znana celotna struktura človeške topoizomeraze II α , vendar lahko na prostorsko ureditev sklepamo iz znane in strukturno podobne kvasovkine topoizomeraze II. Protein je homodimer, ki je razdeljen na tri enote. N-končni del sestavlja ATP-azna domena iz družine encimov GHKL (giraza, Hsp90, histidin-kinaza, in MutL protein) in je pomembna za vezavo in hidrolizo molekule ATP. Naslednja je centralna enota, katere funkcija je vezava in cepitev DNA. Tretja enota je C-končni rep, ki vsebuje aminokisline pomembne za fosforilacijo in interakcije s ostalimi proteinimi. Spada v družino topoizomeraz IIA, ki se poleg alfa nahajajo še v beta oblikih. Obliki se medseboj razlikujeta v velikosti, afiniteti do različnih topoloških oblik DNA in izražanju v celicah. Beta oblika je izražena v tkivih sistemsko in prevladuje v nedelečih se in pomitotičnih celicah, medtem ko je alfa izražena v hitrodelečih se tkivih in je njena koncentracija večja v delečih se celicah. Topoizomeraze IIA delujejo preko zapletenega večstopenjskega mehanizma. Slika 5 prikazuje shemo celotnega katalitičnega cikla z označenimi mestii, kjer delujejo že znani zaviralci (15, 16, 17).



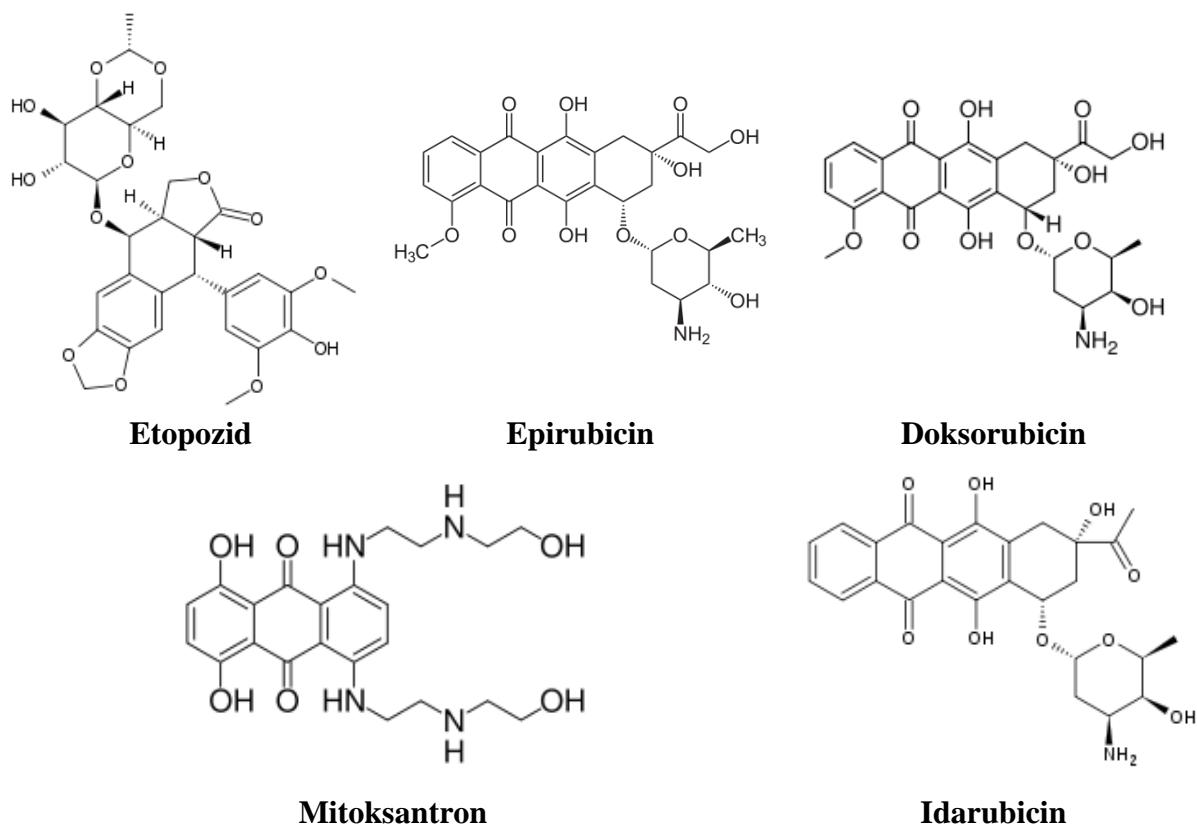
Slika 5: Shema mehanizma delovanja topoizomeraze IIA z označenimi mesti, kjer delujejo znani zaviralci. Prijeljeno po (15).

1.5.1.1 Zaviralci topoizomeraze II α

Protitumorne učinkovine, glede na mehanizem zaviranja delimo na znane, dobro uveljavljene topoizomerazne strupe in novejše katalitične zaviralce. Topoizomerazne strupe podrobnejše delimo na kovalentne in nekovalentne, slednje pa na interkalatorje in neinterkalatorje. Delujejo tako, da stabilizirajo kovalentni kompleks med DNA in encimom, ki nastane pri cepitvi DNA, ter encim spremenijo v močan celični toxin. Posledično pride do trajnih prekinitev v verigi DNA, kar onemogoča normalno delitev celic, povzroči kromosomske prekinitev in celično smrt. V klinični praksi se uporablja kar nekaj takšnih učinkovin, vendar je uporaba omejena predvsem zaradi njihove nizke selektivnosti in kardiotoksičnosti. Eden najbolj znanihstrupov je etopozid, ki zavira delitev celic v fazi S in zgodnji fazi G₂ celičnega cikla. V našem eksperimentalnem delu smo ga uporabili kot pozitivno kontrolo. Učinkovine iz skupine stupov, ki so registrirane v Sloveniji, so zbrane v preglednici I, njihove strukture pa prikazane na sliki 6 (15).

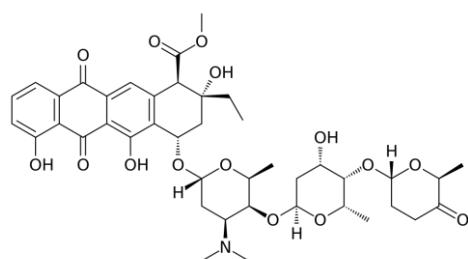
Preglednica I: Topoizomerazni strupi, registrirani v Sloveniji. Pritejeno po (15).

UČINKOVINA	INDIKACIJE	MEHANIZEM
Etopozid	Rak testisov, pluč, limfom, akutna mielotična levkemija, horiokarcinom	Neinterkalator
Doksorubicin	Levkemija, limfom, sarkom	Interkalator
Epirubicin	Sarkom mehkih tkiv,levkemija, hormonsko neodvisni rak prostate	Interkalator
Idarubicin	Akutna nelimfoblastna levkemija (odrasli), akutna limfoblastna levkemija	Interkalator
Mitoksantron	Multipla skleroza, rak dojke, levkemija	Interkalator

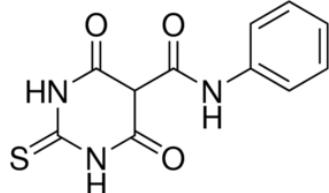


Slika 6: Strukture izbranih topoizomeraznih stupov. Pritejeno po (15).

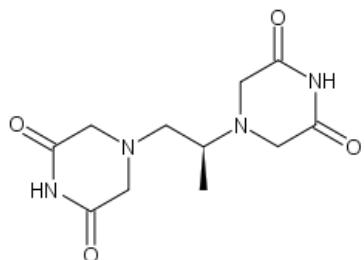
Zaradi toksičnosti topoizomeraznih strupov v zadnjem času poteka intenziven razvoj novih katalitičnih inhibitorjev. Ti predstavljajo obetavno, strukturno raznoliko skupino učinkovin, ki lahko zavirajo številne poti katalitičnega cikla topoizomeraze IIA (slika 5); preprečijo lahko vezavo encima na DNA, tekmujejo za vezavo z ATP in zavirajo cepitev DNA ali hidrolizo ATP. Znana indirektna zaviralca topoizomeraze II α sta akclarubicin, indiciran pri zdravljenju levkemije in limfoma, ter dekrazoksan. Slednji je edini katalitični inhibitor, ki ga uporabljam v Sloveniji, in sicer kot kardioprotektiv pri zdravljenju s antraciklini. V predkliničnih študijah se je kot obetaven zaviralec pokazal še merbaron, vendar zaradi premajhne protitumorne učinkovitosti in nefrotoksičnosti ni prestal kliničnih testiranj. Mnoga mesta v ciklu še niso dobro izkoriščena kot prijemališča učinkovin, kar ponuja še veliko možnosti za razvoj novih, do pacienta prijaznejših zdravil. V zadnjem času potekajo številne raziskave učinkovin, ki bi se vezale v ATP-vezavno mesto topoizomeraze II α . Predstavniki teh so derivati pirazolopiramidina, triazina, triazinona, ter gambojske kislina. Strukture izbranih katalitičnih inhibitorjev so prikazane na sliki 7 (15, 18).



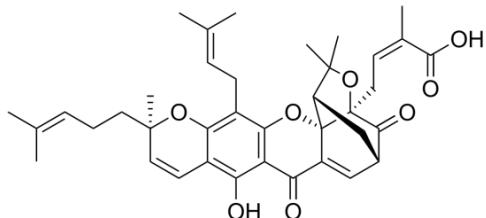
Akclarubicin



Merbaron



Deksrazoksan



Gambojska kislina

Slika 7: Kemijske strukture izbranih katalitičnih zaviralcev. Prirejeno po (15).

1.6 METODE DOLOČANJA CELIČNE PROLIFERACIJE

Celična proliferacija pomeni hitro nekontrolirano delitev celic in je ena glavnih značilnosti rakavih celic. Testi proliferacije se uporablajo v mnogih *in vitro* in *in vivo* študijah kot pomembno orodje za vrednotenje citostatične aktivnosti potencialnih protitumornih učinkovin. *In vitro* tehnike so prav tako uporabne za vrednotenje citotoksičnih, mutagenih in karcinogenih učinkov učinkovin na človeške celice. Celično proliferacijo določimo z merjenjem števila delečih se celic v kulturi. Ena izmed metod je test klonogenosti, kjer nasadimo znano število celic na ustrezno gojišče in po določenem času prestejemo število nastalih kolonij. Metoda je dolgotrajna in ni primerna za testiranje večjih količin vzorcev. Prav tako ni primerna za počasi deleče celice, saj so kolonije premajhne, da bi jih videli in tako lahko dobimo napačen rezultat. Bolj pogosto se uporablajo testi, s katerimi merimo sintezo DNA, metabolno aktivnost celic ali določimo antogene povezane s celično delitvijo. Izbor metode je odvisen od sredstev in aparatur, ki jih imamo na voljo, vrste celične linije in priporočil za posamezno celično linijo. Ne glede na to, katero metodo uporabimo, je za dobro ponovljivost in natančnost rezultatov treba izvesti več neodvisnih bioloških ponovitev (19, 20).

1.6.1 Merjenje sinteze DNA

Je ena izmed najbolj zanesljivih in točnih metod, kjer merimo količino novo nastale DNA. Merjenje temelji na inkubaciji celic s označenim analogom timidina, ki se namesto timidina med podvojitvijo DNA vključi v novo nastalo DNA hčerinske celice. Tako lahko natančno določimo odstotek celic, ki se nahajajo v G1, S in G2 fazi celične delitve. Glavna slabost metode je, da timidinski analogi lahko vodijo do mutacij, poškodujejo DNA in vplivajo na potek samega celičnega cikla. Najpogosteje se uporablja timidinski analog 5-bromo-2-deoksiridin (BrDU), ter kombinacija 5-jodo-2-deoksiridina (IdU) in 5-kloro-2-deoksiridina (CldU). Vezavo v novo nastalo DNA določimo zobarvanjem z BrdU in IdU protitelesi. Še ena možnost določitve novo nastale DNA je z uporabo 5-etinil-2-deoksiridina (EdU). Vezavo se določi kemično z fluorescenčnim azidom, ki se kovalentno veže z etinilno skupino EdU. Pri tem ni potrebna denaturacija DNA, saj je majhna molekula, ki prosto prehaja do Edu. Metoda je precej dražja, kar omejuje njeno uporabo (19, 21).

1.6.2 Merjenje metabolne aktivnosti celic

Merjenje metabolne aktivnosti je indirekten, dobro uveljavljen in enostaven način merjenja viabilnosti celic. Metoda je primerna za testiranje večjih količin vzorcev. V ta namen se uporablajo tetrazolijeve soli, ki se v prisotnosti mitohondrijske reduktaze (NADH, NADPH) reducirajo v formazan, ki je topen v gojišču in absorbira pri 490 nm. Nastali formazan je sorazmeren številu metabolno aktivnih celic v kulturi. Določimo ga sprekrofotometrično s čitalcem mikrotitrskih ploščic. Poznamo tri vrste tetrazolijevih soli: MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid), XTT (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolijev-5-karboksanilid) in MTS 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol. Slabost MTT reagenta je, da je netopen v mediju in ga je potrebno pred meritvijo raztopiti v DMSO ali izopropanolu, kar zahteva dodaten čas in stres za celice. Vse bolj se namesto njega uporabljo preostale soli, ki so topne v mediju in netoksične za celice (19-21).

1.6.3 Določevanje proteinov povezanih s celično delitvijo

Določevanje specifičnih antigenov, ki so povečano izraženi v proliferativnih celicah, je ena izmed natančnih in zanesljivih metod za preučevanje celične proliferacije. Ti antigeni so tipično izraženi v vseh fazah celičnega cikla, razen v fazi G₀. Za določevanje antigenov se uporabljo specifična monokolonska protitelesa. Eden izmed protiteles je Ki-67, ki prepozna istoimenski protein, ki je povečano izražen v fazi celičnega cikla S, G2, in M. Uporablja se tudi označevalec PCNA, vendar dosedanje študije kažejo, da je Ki-67 bolj občutljiv in specifičen pri oceni raka iz različnih vzrokov. Vse bolj pomemben je tudi označevalec MCM-2, ki se pri nekaterih vrstah rakah kaže kot najbolj občutljiv in specifičen. Metoda je primerna za testiranje proliferacije tumorskih celic *in vivo* in ne za testiranje večjih količin vzorcev (20, 21).

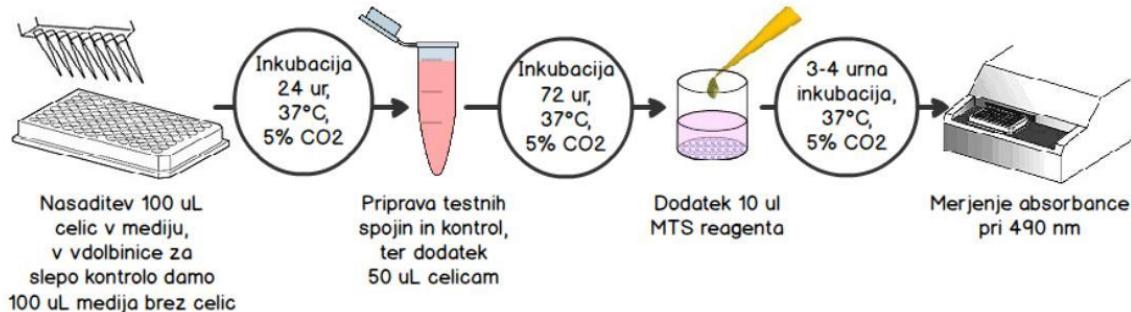
2 NAMEN DELA

Proteini topotnega stresa 90kDA (Hsp90) in topoizomeraza II α predstavljajo v zadnjem času, zaradi svoje zaščitne funkcije in vpletenosti v različne signalne poti, ki so nujno potrebne za preživetje celic, vse bolj pomembno tarčo v razvoju novih protirakovih učinkovin. Na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani, so skozi leta odkrili in sintetizirali veliko spojin, ki so bili načrtovani kot Hsp90 in DNA girazni B zaviralci. Spojine so zbrane v knjižnici spojin na Fakulteti za farmacijo.

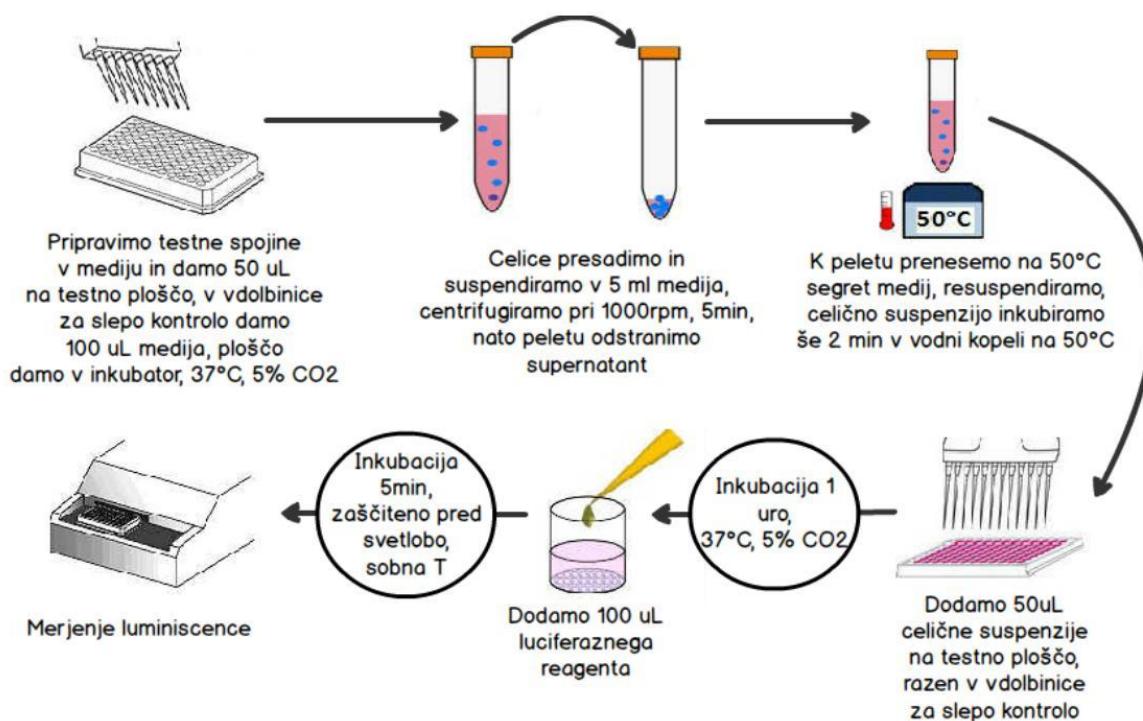
Cilj našega eksperimentalnega dela je ovrednotiti vpliv potencialnih zaviralcev Hsp90 in DNA giraze B na proliferacijo rakovih celic. V ta namen bomo kot *in vitro* model uporabili celično linijo raka dojke (MCF-7), ki se v literaturi pogosto pojavlja kot testni sistem za *in vitro* določanje zaviralne aktivnosti tovrstnih zaviralcev na proliferacijo celic. Z MTS testom proliferacije bomo testirali več skupin zaviralcev iz banke spojin, primerjali odnos med strukturo in delovanjem, ter povezali rezultate celičnega testiranja z rezultati encimskega testiranja, ki so ga opravili na Katedri za farmacevtsko kemijo. Načrt vrednotenja izbranih zaviralcev na celični liniji MCF-7 je prikazan na sliki 8. Na celični liniji raka prostate (PC3 MM2 luc) bomo po koncu testiranja na MCF-7 z novo testno metodo za identifikacijo in vrednotenje zaviralcev Hsp90 testirali najbolj obetavne zaviralce Hsp90 (slika 9). Naš glavni cilj testiranja bo vzpostavitev metode in potrditev hipoteze, da spojine zavirajo proliferacijo celic preko zaviranja Hsp90. Zbrane rezultate bomo računalniško obdelali in določili vrednosti IC₅₀. Glede na rezultate bomo podali končno oceno antiproliferativne aktivnosti vseh spojin, kar bo skupaj s strukturami podalo informacijo o strukturnih elementih, pomembnih za delovanje spojine.

Na celični liniji MCF-7 bomo najprej z MTS testom pri 50 μ M koncentraciji določili zaviralno aktivnost učinkovin glede na kontrolo (0,5-1% DMSO). Kot pozitivno kontrolo bomo uporabili etopozid. Učinkovine ki bodo zavirale rast celic v zadostnem deležu (delež proliferacije <30 %), bomo ponovno testirali v širšem koncentracijskem območju in jim določili IC₅₀. Potencialne zaviralce proteina Hsp90, ki bodo na celični liniji MCF-7 najbolj učinkovito zavirale rast celic, bomo s testom aktivnosti luciferaze testirali še na drugi celični liniji (PC3 MM2 luc). S tem testom inaktiviramo luciferazo. Ker proteini topotnega šoka omogočijo obnovitev inaktivirane luciferaze, je izmerjena luciferazna aktivnost

označevalec uspešnosti zaviranja Hsp90. Kot pozitivni kontroli bomo vzeli geldanamicin in C-terminalni zaviralec, ki so nam ga skupaj s PC3 MM2 luc celicami poslali iz Univerze v Indiani.



Slika 8: Načrt vrednotenja izbranih zaviralcev na celični liniji MCF-7.



Slika 9: Načrt vrednotenja izbranih zaviralcev na celični liniji PC3 MM2 luc.

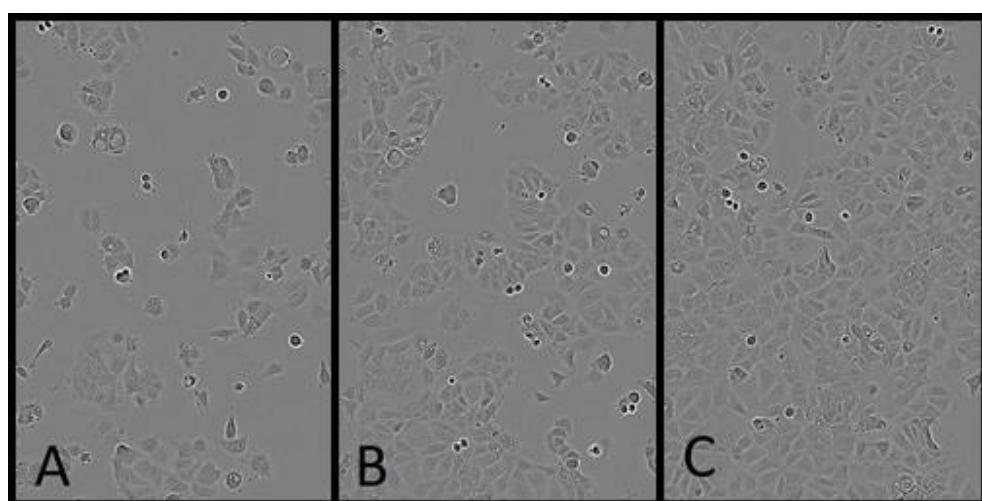
3 MATERIALI

3.1 CELIČNE LINIJE

Izbrane učinkovine smo testirali na celični liniji MCF-7, katero smo dobili na Fakulteti za farmacijo, iz Katedre za farmacevtsko biologijo. Po končanem testiranju smo najbolj aktivne potencialne zaviralce Hsp90 testirali na celični liniji PC3 MM2 luc. To linijo smo dobili od raziskovalne ekipe iz Univerze v Indiani, oddelek za farmacevtsko kemijo. Celice smo vzdrževali v ustrezном rastnem mediju, obogatenemu s dodatki, v inkubatorju pri temperaturi 37 °C, 100 % vlažnosti in 5 % atmosferi CO₂. Medij smo pripravili po ustremnem postopku, ga hrаниli pri 2-8 °C in ga pred dodatkom k celicam segreli na 37 °C.

3.1.1 Celična linija MCF-7

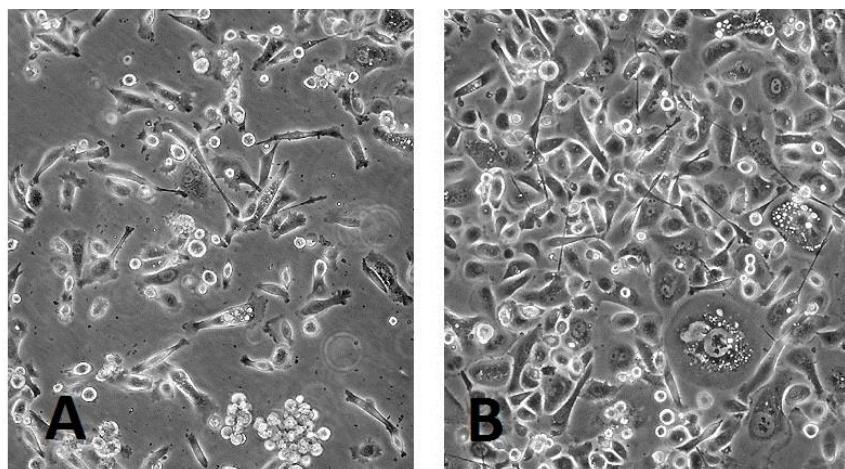
Je najbolj raziskana človeška linija raka dojke. Prvič je bila izolirana iz celic raka dojke 69 letne belke leta 1970. Kratica MCF-7 (Michigan Cancer Foundation - 7) se nanaša na inštitut, kjer so ustvarili to linijo. Celice so tipične velikosti (20-25 mikronov), znane kot zelo enostavne za gojenje in počasi rastoče, saj je njihov čas podvojitve 30-40 ur (22, 23). Rast celic v odvisnosti od časa je prikazana na sliki 10. Dokazano je, da celična linija vsebuje povečano koncentracijo Hsp90 in na podlagi tega dejstva smo se odločili, da je primerna za testiranje (12). Eksperimentalni rezultati so bili določeni na celicah do 20. pasaže in v manj kot treh mesecih kontinuiranega gojenja iz ene kulture.



Slika 10: Rast MCF-7 celic; A: predstavlja gostoto celic po 24 urah od nasaditve, B: gostoto celic po 48 urah in C: gostoto celic po 72 urah od nasaditve (24).

3.1.2 Celična linija PC3 MM2 luc

Je celična linije raka prostate, ki so jo razvili v M.D. Anderson Cancer Center (Houston, Texas). Izhaja iz celične linije PC3, ki je bila prvič izolirana iz kostne metastaze raka prostate 62 letnega belca. Rast PC3 celic je prikazana na sliki 11 (25). Celice smo dobili od prof. dr. Brian Blagg, oddelek za farmacevtsko kemijo, Univerza Notre dame, Indiana, ZDA. So hitro rastoče, adherentne in stabilno transducirane z lentivirusnim vektorjem, ki vsebuje luciferazni gen kresničke (*Luc2/mCherry*) in gen za rezistenco na puromicin (*pac*). Z dodatkom puromicina v gojitveni medij omogočimo selektivno rast celic z vstavljenim vektorjem. Povečana ekspresija luciferaznega gena, pa se kaže kot porast v sintezi encima luciferaze, kar zaznamo s merjenjem luminiscence. Eksperimentalni rezultati so bili določeni na celicah do 10. pasaže in v manj kot treh mesecih kontinuiranega gojenja iz ene kulture. Celice so stabilne do 20. pasaže, kar pomeni, da se njihova aktivnost ne bi smela zmanjšati (26).



Slika 11: Rast PC3 celic. Slika **A** prikazuje nizko gostoto, slika **B** pa visoko gostoto rasti celic (25).

3.2 TESTIRANE SPOJINE IN POZITIVNE KONTROLE

Testirane spojine smo izbrali na podlagi rezultatov encimskega testiranja na Hsp90 in topoizomerazo II α iz DNA girazne knjižnice spojin Fakultete za farmacijo. Spojine so bile raztopljene v dimetilsulfoksidu (DMSO), s končno koncentracijo 10 mM, shranjene v kriovialah na -20 °C in pripravljene tako, da so ustrezne za biološka testiranja. Kot pozitivno kontrolo pri testu na MCF-7, smo uporabili etopozid, ki je bil raztopljen v

DMSO, s končno koncentracijo 100 mM, shranjen v krioviali na -20 °C. Pri testiranju na PC3 MM2 luc smo za standard uporabili znan N-terminalni zaviralec geldanamicin in neznani C-terminalni zaviralec, ki so nam ga poslali iz Univerze v Indiani. Za testiranje smo natehtali 2-3 mg spojine in pripravili raztopino s končno koncentracijo 10 mM v DMSO. Pripravljene raztopine smo shranili na -20 °C.

3.3 REAGENTI

- Medij za MCF-7 celice: Minimum Essential Medium Eagle (MEM) (Sigma aldrich, Velika Britanija) z dodanimi reagenti:
 - 10 % fetalni goveji serum (FBS) (Gibco, Južna Amerika)
 - L-glutamin 2 mM (Gibco, Brazilija)
 - inzulin 10 µg/mL (Sigma aldrich, USA)
 - penicilin 100 UI/mL in 100 µg/mL streptomycin (Sigma aldrich, Izrael)
- Medij za PC3 MM2 celice: Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (DMEM) (Sigma aldrich, Velika Britanija) z dodanimi reagenti:
 - puromicin 5 µg/mL (InvivoGen, San Diego, Velika Britanija)
 - 10 % fetalni goveji serum (FBS) (Gibco, Južna Amerika)
 - penicilin 100 UI/mL in 100 µg/mL streptomycin (Sigma aldrich, Izrael)
- Dimetil sulfoksid (DMSO), C_2H_6OS , odprt v sterilnih pogojih (Merck, Nemčija)
- 1 x PBS (fosfatni pufer) (Gibco, Velika Britanija)
- Barvilo tripan modro, $C_{34}H_{28}N_6O_{14}S_4$ (Sigma aldrich, ZDA)
- Tripsin (Gibco, Danska)
- MTS reagent, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol (Promega, ZDA)
- Luciferazni reagent: ONE-Glo Luciferase Assay System (Promega, ZDA)

3.4 LABORATORIJSKE APARATURE:

- komora s sterilnim pretokom zraka, LaminAir scan, (Iskra PIO, Šentjernej, Slovenija)
- centrifuga Centric 322A (Tehnica, Železniki, Slovenija)
- centrifuga z vibracijskim mešalnikom Combi-spin FVL-2400N (Biosan, Latvija)
- inkubator MCO-18AIC (Sanyo, Osaka, Japonska)
- invertni svetlobni mikroskop Olympus CKX41 (Olympus, Japonska)

- vibracijski mešalnik, Vibromix 10 (Tehnica, Železniki, Slovenija)
- vibracijski mešalnik, Yellowline TTS 2, tip 21 (IKA, Wilmington, ZDA)
- hemocitometer (Brand, Wertheim, Nemčija)
- čitalec mikrotitrskih ploščic - Synergy H4 Hybrid Reader (Biotek, Vermont, ZDA)
- aspirator (IntegrA, Švica)
- hladilnik 4 °C in zamrzovalnik -20 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- zamrzovalna omara -80 °C (Sanyo, Osaka, Japonska)
- avtomatski števec celic Countess (Invitrogen, Kalifornija, ZDA)
- analitska tehника AG 245 (Mettler Toledo, ZDA)
- magnetno mešalo z gretjem RH basic (IKA, Wilmington, ZDA)
- elektronski kontaktni termometer ETS-D5 (IKA, Wilmington, ZDA)

3.5 OSTALA LABORATORIJSKA OPREMA IN PRIPOMOČKI

- sterilna gojivna posoda s površino 75 cm² in 25 cm² (TPP, Trasadingen, Švica)
- krioviale 1 mL (TPP, Trasadingen, Švica)
- mikrotitrská prázdná ploščica typu 92096 s 96 vdolbinicami (TPP, Trasadingen, Švica)
- mikrotitrská biela ploščica typ Nunclon Delta Surface s 96 vdolbinicami (Thermo Fisher Scientific, Dánsko)
- centrifugálne epruvety 15 mL in 50 mL (TPP, Trasadingen, Švica)
- plastické epruvety alebo mikrocentrifugálky, 1,5 mL in 2 mL (ISOLAB, Wertheim, Nemčija)
- avtomatská večkanalna pipeta (Biohit, Helsinki, Fínsko)
- pipetor (IntegrA, Švica)
- polautomatská pipeta 10 -100 µL, 100-1000 µL (Biohit, Helsinki, Fínsko)
- polautomatská pipeta 20-200 µL (Gilson, Francúzsko)
- polautomatská pipeta 0,5 - 10 µL (Eppendorf Research plus, Nemčija)
- serološke pipete za enkratno uporabo - 5, 10, 25 in 50 mL (TTP, Trasadingen, Švica)
- nastavki za pipete (Biohit, Helsinki, Fínsko)
- sklenene pipete, Pasteur (Brand, Wertheim, Nemčija)
- Ostalo: spatula, čaša, magnet za mešanje, kovinsko stojalo, mufa, prižema



Slika 12: Improvizirana vodna kopel pri testiranju aktivnosti luciferaze. Kopel smo nastavili na 55°C, kar zagotavlja temperaturo medija v centrifugirni epruveti 50 °C.

4 METODE

4.1 OSNOVE DELA S CELICAMI

Delo s celicami smo izvajali v aseptičnih pogojih v LAF komori, ki zagotavlja sterilnost s stalnim laminarnim pretokom prečiščenega zraka skozi HEPA filtre in s tem tudi varuje raziskovalca pred aerosolom. Za delovni prostor velja strožji režim čistoče, zato vanj vstopamo oblečeni v zaščitno obleko in obutev, ki jo uporabljam le v tem prostoru (27). Ves čas uporabljam rokavice, ki jih pred vsakim vstopom v komoro razkužimo s 70 % etanolom. Pred in po zaključenem delu smo komoro pol ure sterilizirali z obsevanjem z UV svetlobo, očistili delovno površino s 70 % etanolom in prav tako predhodno razkužili vse material in aparature, ki smo jih vnesli v komoro. V nesterilnih pogojih smo opazovali celice pod mikroskopom, jih šteli, merili absorbanco pri testu za določevanje proliferacije in luminiscenco pri testiranju aktivnosti luciferaze. Posebno pazljivi smo bili z odpadki. Vse pripomočke in laboratorijsko opremo za enkratno uporabo, ki je prišla v stik z biološkim materialom, smo zavrgli v posebne rumene zabojnike za kontaminirane odpadke, ki grejo nato v sežig.

4.2 GOJENJE CELIC

Celične kulture zahtevajo dobro kontrolirano okolje za gojenje. V ta namen smo uporabili specializirani inkubator, ki zagotavlja potrebne pogoje za rast, kot je temperatura 37 °C, 100 % vlažnost in 5 % raven CO₂. Postopek gojenja poteka pri obeh celičnih linijah enako, le da pri vsaki uporabimo ustrezen gojitveni medij, obogaten z dodatki. Celice so bile shranjene v zamrzovalniku pri -80 °C. Vialo s celicami smo hitro odtalili na vodni kopeli s 37 °C, vsebino prenesli v sterilno posodo za gojenje s površino 25 cm² in dodali na 37 °C segret medij. Posodo smo rahlo premikali v krogu, da so se celice enakomerno razporedile po celotni površini. Po enem dnevu smo medij zamenjali s svežim in tako odstranili tudi DMSO, ki je bil dodan celicam kot krioprotектант med zamrznitvijo. Po 48 urah smo celice odlepili od podlage in prestavili v sterilno gojitveno posodo s površino 75 cm² in za vse nadaljnje pasaže uporabljali posodo s to površino. Ko so celice zasedle 75-85 % površine gojišča, smo jih presadili.

Postopek presaditve:

Vse uporabljene reagente smo pred uporabo segreli na 37 °C, izjemoma tripsin, saj s segrevanjem izgubi svojo aktivnost. Z aspiratorjem smo odstranili medij iz gojitvene posode in preostanek medija iz celic previdno sprali s 5 mL PBS. Tega smo odstranili in dodali 2 mL encima tripsina, ki celice odlepi od podlage. Celice smo inkubirali s tripsinom 5 minut in nato pod mikroskopom preverili, če so se odlepile. V kolikor se celice niso odlepile, smo posodo nežno stresli in če so bile še vedno pritrjene, smo jih dali še za nekaj minut v inkubator. Celice tripsinu nismo izpostavljali skupno več kot 10 min, saj je toksičen za celice. Delovanje tripsina smo ustavili tako, da smo površino sprali s 8 mL medija in s tem tudi mehansko odlepili še pritrjene celice. Celično suspenzijo smo prestavili v 15 mL centrifugirno epruveto in centrifugirali na 1000 obratih na minuto, 5 min. Po končanem centrifugiranju, smo z aspiratorjem celicam previdno odstranili supernatant in jih resuspendirali v svežem mediju. 40 µL tako pripravljene suspenzije smo vzeli, dodali 40 µL barvila tripan modro in s hemocitometrom prešteli celice. Preračunali smo ustreznou koncentracijo in jih nasadili v novo posodo (naslednjo pasažo). Ker so se MCF-7 celice razmnoževale zelo počasi, smo jih presajali v razmerju 1:6, 1-krat tedensko. PC-3 MM2 luc so rastle zelo hitro, tako da smo jih presajali v razmerju 1:5, 2-krat tedensko. Obema celičnima linijama smo menjali medij prvi dan po presaditvi in nato na vsake 2 do 3 dni.

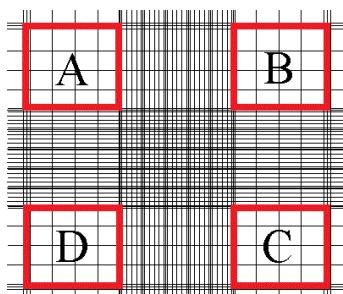
4.3 ŠTETJE CELIC

Celice smo šteli v nesterilnih pogojih po vsaki presaditvi. S pomočjo števila živih celic smo lahko zagotovili priporočeno koncentracijo celic za gojenje in testiranje. Uporabili smo barvilo tripan modro, ki prodre v mrtve celice in jih obarva temno modro, žive celice pa vidimo kot svetlejše. Samo barvilo je citotoksično, zato pazimo, da mu celice niso predolgo izpostavljene. Po centrifugiraju smo celice resuspendirali v svežem mediju, odvzeli 40 µL celične suspenzije in jo homogeno premešali s 40 µL barvila tripan modro (razmerje 1:1). Nanesli smo 10 µL pripravljeni suspenzije na hemocitometer in s svetlobnim mikroskopom prešteli žive celice znotraj vseh štirih kvadratov: A, B, C in D (slika 13). K celotnemu številu smo vključili tudi celice na zgornjem in levem robu posameznega kvadrata (slika 14). Izračunali smo njihovo koncentracijo po enačbi 1 (28).

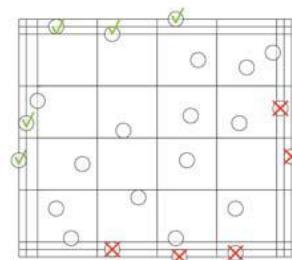
$$\text{število celic/mL} = \left(\frac{A+B+C+D}{4} \right) \times 2 \times 10^4$$

Enačba 1: Računanje koncentracije celic.

- A, B, C, D - število celic v posameznem kvadratu,
- 4 - število kvadratov, v katerih preštajemo celice,
- 2 - faktor redčenja celične suspenzije z barvilm,
- 10^4 - faktor s katerim pomnožimo, da dobimo število celic na mL, saj je volumen merilne komore 10^{-4} mL ($1 \text{ mm} * 1 \text{ mm} * 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4}$ mL).



Slika 13: Celotno polje hemocitometra z označenimi kvadrati, v katerih preštajemo celice (29).



Slika 14: Prikaz enega od štirih kvadratov s celicami (na sliki prikazane s krogci), katere vključimo v štetje (28).

4.4 ZAMRZOVANJE CELIC

Glavni namen zamrzovanja je shranjevanje celičnih linij za kasnejša testiranja, da jih ni treba stalno gojiti. Da uspešno zamrznemo celice, je pomembno, da jih zamrznemo postopoma, odtalimo pa jih hitro. Celice so primerne za krioprezervacijo ko ni prisotne kontaminacije in so v logaritemski fazi rasti, in sicer ko dosežejo 90 % konfluentnost. Pri nadzorovani zamrznitvi v prisotnosti krioprotekranta, v našem primeru je bil to DMSO, lahko celične linije zamrzujemo v suspenzijskem stanju za nedoločen čas, če je temperatura shranjevanja manjša od -135 °C (27). Celice smo po presaditvi prešteli in jih glede na izračunano koncentracijo resuspendirali v ustreznem volumnu medija. Zamrznili smo 1,5 mL celične suspenzije s priporočeno koncentracijo $2-3 \times 10^6$ celic/mL z dodanim 5,0 % DMSO. Kriovialo smo označili s številom celic, imenom celične linije, številko pasaže in datumom. Tako pripravljeno kriovialo smo le na hitro premešali s pomočjo vibracijskega mešalnika in shranili v zamrzovalnik, ki zagotavlja -80 °C.

4.5 PRIPRAVA RAZTOPIN

4.5.1 Priprava raztopin testnih spojin

Testne spojine s koncentracijo 10 mM v DMSO smo odtalili in redčili z medijem do ustrezne koncentracije, pod sterilnimi pogoji v LAF komori, sveže, tik pred tretiranjem celic. Redčenja smo načrtovali tako, da je bila končna koncentracija DMSO v mikrotitrski ploščici največ 1,0 %, saj je DMSO v višjih koncentracijah za celice toksičen. Pri tretiraju celic smo v vdolbinico s 100 µL celične suspenzije dodali 50 µL raztopine učinkovin. Da smo na ploščici dobili ustrezeno končno koncentracijo testne spojine, smo v epice pripravili raztopine s 3-krat višjo koncentracijo. Pred dodatkom raztopine celicam smo jih vedno dobro premešali s vibracijskim mešalnikom in bili pozorni na topnost. V kolikor so bile spojine netopne, smo pripravili in testirali nižje koncentracije.

4.5.1.1 Določevanje topnosti spojin v NMR cevki

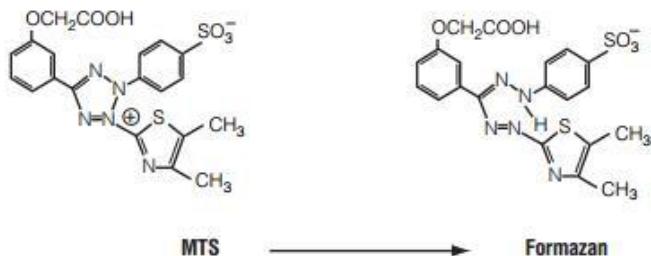
Testnim spojinam, pri katerih smo pri redčenju z medijem opazili obarjanje ali pa smo na to sklepali iz oblike krivulje, smo preverili njihovo topnost v NMR cevki. Pripravili smo spojine pri najvišji testirani koncentraciji v mediju (100 µM) in prenesli 100 µL pripravljene raztopine v NMR cevko. S prostim očesom smo v cevki opazovali, če je bila prisotna oborina.

4.5.2 Priprava 1,5 do 3,0% DMSO v gojitvenem mediju

Za redčenje spojin in kot kontrolo 100 % proliferacije celic, smo pripravili od 1,5 %-3,0 % DMSO v mediju, sveže, tik pred testiranjem. Dodali smo 50 μL pripravljene raztopine v 100 μL celične suspenzije, tako da je bila končna koncentracija na mikrotitrski ploščici od 0,5 % do 1,0 % DMSO v mediju. Za kontrolo 100 % proliferacije smo uporabili enak delež DMSO, kot je bil v raztopini testne spojine.

4.6 MTS TEST PROLIFERACIJE

Testnim spojinam smo v izbranih koncentracijah za določitev antiproliferativne aktivnosti na celični liniji MCF-7 uporabili MTS test, podjetja Promega (CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay). Test je enostavna in hitro izvedljiva kolorimetrična metoda, pri kateri lahko na podlagi določitve števila metabolno aktivnih celic, določimo njihovo rast ali citotoksičnost spojine. Rumeno obarvan reagent vsebuje 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol (MTS) in elektron prenašalni reagent PES (fenazin etosulfat), ki poveča občutljivost metode in ima hkrati tudi vlogo kemičnega stabilizatorja, kar omogoča, da skupaj tvorita stabilno raztopino, ki je obstojna več mesecev. Pripravljena sta v obliki enega reagenta, ki ga shranjujemo pri -20 °C. Pri dodajanju reagenta in merjenju moramo paziti, da ga ne izpostavljamo svetlobi, saj lahko to povzroči povišano absorbanco ozadja. Reagent prehaja v metabolno aktivne celice, kjer se z encimom dehidrogenaze tvorijo NADPH. pride do prenosa elektronov na PES in tako reducirana PES direktno reducira MTS do intenzivno vijolično obarvanega formazana (slika 15). Nastali formazan je topen v gojitvenem mediju, kar nam omogoča direktno merjenje absorbance iz testne mikrotitrsko plošče pri 490 nm. Izmerjena absorbanca nam pove količino nastalega formazana, ki je sorazmerna deležu živih celic (29).



Slika 15: Strukturi MTS reagenta in njegovega obarvanega produkta formazana, ki nastane v metabolno aktivnih celicah (29).

Celice smo gojili v inkubatorju pri temperaturi 37 °C in 5 % atmosferi ogljikovega dioksida. Ko smo celice odmrznili, smo jih pred testiranjem 2-krat presadili, da so se prilagodile na okolje in se začele normalno razmnoževati. Ko so dosegle vsaj 80 % konfluentnost smo jih presadili, prešteli in izvedli test.

Postopek:

Na prozorne mikrotitrskie ploščice s 96 vdolbinicami z večkanalno pipeto nasadimo v vsako vdolbinico 100 µL celične suspenzije s koncentracijo 2×10^4 celic/mL, razen v tri vdolbinice za slepo kontrolo damo 100 µL medija brez celic. Pri testiranju smo opazili problem robnega efekta, zato v robne in preostale prazne vdolbinice ne nasadimo celic, vendar v njih nanesemo 100 µL medija ali PBS. S tem omogočimo enakomerno izhlapevanja medija preko vseh luknjic. Po nasaditvi ploščico inkubiramo 24 ur v inkubatorju pri 37 °C in 5 % atmosferi CO₂. Celice po 24 urah tretiramo, tako da dodamo 50 µL izbrane koncentracije spojin v gojitvenem mediju, ki si jih pripravimo sveže, tik pred tretiranjem. Kot kontrolo 100 % proliferacije celic uporabimo DMSO v enaki koncentraciji kot v vdolbinicah s testirano spojino (največ 1,0 % DMSO), kot pozitivno kontrolo pa topoizomeraznistrup etopozid, z znano antiproliferativno aktivnostjo, pri koncentraciji 50 µM in 100 µM. V vdolbinice za slepo kontrolo damo 50 µL medija, v robne in prazne pa 50 µL medija ali PBS. Testiramo v triplikatih. Ploščico ponovno inkubiramo 72 ur v inkubatorju pri 37 °C in 5 % atmosferi CO₂. Po inkubaciji dodamo 10 µL MTS reagenta in inkubiramo 3-4 ure v inkubatorju. S čitalcem mikrotitrskih ploščic Synergy H4 Hybrus Reader po končani inkubaciji izmerimo absorbanco pri 490 nm. Dobljene rezultate statistično obdelamo s programom Excel in izračunamo IC₅₀ vrednosti z računalniškim programom GraphPad Prism. Delež proliferacije izračunamo tako, od absorbance vzorcev odštejemo absorbanco slepe kontrole (ozadja) ter normaliziramo na kontrolo 100 % proliferacije (DMSO s končno koncentracijo največ 1,0 %) z odšteto slepo kontrolo (enačba 2).

$$\% \text{ proliferacije} = \frac{A(\text{vzorec}) - A(\text{slepa})}{A(\text{DMSO}) - A(\text{slepa})} \times 100$$

Enačba 2: Računanje deleža proliferacije celic.

Na začetku smo testirali etopozid, ter mu določili IC_{50} vrednost. Nato smo začeli s testiranjem testnih spojin. Sprva smo izvedli meritve pri koncentraciji 50 μM . Primer testne ploščice je prikazan na sliki 16. V kolikor je spojina izkazovala ustrezeno aktivnost (delež proliferacije <30 %), smo testiranje ponovili v širšem koncentracijskem območju od 75,0 do 0,01 μM in iz krivulje spojinam določili IC_{50} vrednost. Primer testne plošče drugega testiranja je prikazan na sliki 17. Za najbolj aktivne spojine smo izvedli dve neodvisni biološki ponovitvi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SPOJINA 1 50 μM		SPOJINA 7 50 μM		SPOJINA 13 50 μM						
C		SPOJINA 2 50 μM		SPOJINA 8 50 μM		SPOJINA 14 50 μM						
D		SPOJINA 3 50 μM		SPOJINA 9 50 μM		SPOJINA 15 50 μM						
E		SPOJINA 4 50 μM		SPOJINA 10 50 μM		SPOJINA 16 50 μM						
F		SPOJINA 5 50 μM		SPOJINA 11 50 μM		100 μM ETOPOZID						
G		SPOJINA 6 50 μM		SPOJINA 12 50 μM		50 μM ETOPOZID						
H												

Slika 16: Primer načrta testne plošče, kjer smo preverjali antiproliferativno aktivnost spojin pri koncentraciji 50 μM .

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		0,75% DMSO	SPOJINA 75 μM		SPOJINA 75 μM		SPOJINA 75 μM					
C			1 50 μM		2 50 μM		3 50 μM					
D			30 μM		30 μM		30 μM					
E			15 μM		15 μM		15 μM					
F			10 μM		10 μM		10 μM					
G			1 μM		1 μM		1 μM					
H												

Slika 17: Primer načrta testne plošče za določitev IC_{50} aktivnim spojinam (delež proliferacije <30 %) pri razširjenih koncentracijah.

4.7 TEST AKTIVNOSTI LUCIFERAZE

Je nova testna metoda specifična za odkrivanje in vrednotenje zaviralcev Hsp90, ki so jo razvili in validirali na Univerzi v Indiani, na oddelku za farmacevtsko kemijo, in sicer na celični liniji A549, HCT116 in celični liniji raka prostate z luciferazo (PC3 MM2 luc). Podarili so nam celično linijo PC3 MM2 luc, ki smo jo pri testiranju uporabili kot in vitro model, test pa smo izvedli po njihovem protokolu. S testom povzročimo denaturacijo luciferaze, tako da celice izpostavimo povišani temperaturi (50 °C). V študijah je bilo dokazano, da se topotno inaktivirana luciferaza obnovi, kar omogočijo proteini topotnega

šoka. Aktivnost ponovno zvite luciferaze izmerimo po dodatku ustreznega luciferaznega reagenta, ki vsebuje luciferin (slika 18). Kot posledico aktivnega encima detektiramo luminescenco z luminometrom. V prisotnosti inhibitorja Hsp90 je onemogočeno ponovno zvitje luciferaze in posledično izmerimo nižjo luminescenco (26, 31).



Slika 18: Bioluminescenčna reakcija, katalizirana z encimom luciferaze (31).

Testno metodo smo prvič izvedli na katedri za farmacevtsko kemijo. Zaradi omejenih sredstev in časa smo metodo le vzpostavili, ter testirali potencialne zaviralce Hsp90, ki so se pri testu na MCF-7 izkazali kot najbolj obetavne pri končni koncentraciji 100 in 50 µM. Vrednost IC₅₀ smo določili le najboljšim zavircem. Za pozitivno kontrolo smo uporabili N-terminalni zaviralec Hsp90 (geldanamicin) in neznani C-terminalni zaviralec Hsp90 pri končni koncentraciji 100 in 50 µM in slednjemu določili IC₅₀.

Celice smo gojili v inkubatorju pri temperaturi 37 °C in 5 % atmosferi ogljikovega dioksida. Ko smo celice odmrznili, smo jih pred testiranjem 2-krat presadili, da so se prilagodile na okolje in se začele normalno razmnoževati. Ko so dosegle popolno konfluentnost, smo jih presadili, prešteli in izvedli test.

Postopek:

Vsaj 2 uri pred testiranjem vklopimo vodno kopel (55 °C), ter vzamemo iz zamrzovalnika luciferazni reagent (ONE-Glo Luciferase Assay System). Reagent zaščitimo pred svetlobo, v nasprotnem primeru dobimo nižje rezultate, saj je reagent zelo občutljiv na svetlobo. V 15 mL centrifugirko damo 5 mL medija in ga postavimo v vodno kopel. V epice si pripravimo spojine želene koncentracije v mediju (končna koncentracija DMSO največ 1,0 %) in jih dobro premešamo z vibracijskim mešalnikom. Na bele mikrotitrski ploščice z 96 luknjicami z večkanalno pipeto nanesemo 50 µL pripravljenih testnih spojin, kontrol in ustrezni delež DMSO v mediju. V dve luknjici za slepo kontrolo nanesemo 100 µL medija, v dve luknjici za zdrave celice pa 50 µL medija. Testiramo v triplikatih. Ko napolnimo celo ploščico, jo postavimo v inkubator (37 °C, 5 % CO₂). Celice presadimo, centrifugiramo pri

1000 obratih na minuto, 5 min, resuspendiramo v 5 mL medija in preštejemo. Izračunamo ustrezen volumen celične suspenzije, da zagotovimo 5×10^6 celic, prenesemo v novo centrifugirko in dopolnimo z medijem do 5 mL. 50 μL pripravljene celične suspenzije damo v 3 vdolbinice namenjene za testiranje zdravih celic. Preostanek suspenzije centrifugiramo pri 1000 obratih na minuto, 5 min. Med centrifugiranjem si v komori pripravimo vse potrebno, saj so naslednji koraki časovno zelo pomembni. Pripravimo si aspirator, tipse, iz inkubatorja vzamemo testno ploščo in jo odkrijemo, 5 mL serološko pipeto in nastavljeno multikanalko na 3 x 50 μL . Po centrifugiranju celičnemu peletu odstranimo supernatant, iz vodne kopeli vzamemo segret medij (50°C), ga prenesemo k peletu, ter resuspendiramo. Za točno 2 min postavimo celično suspenzijo nazaj v vodno kopel (55°C). V tem času in pri temperaturi v zadostnem deležu denaturiramo luciferazo in ne vplivamo na viabilnost celic. Po natanko dveh minutah vzamemo celice iz kopeli, z obračanjem suspenzijo resuspendiramo in z večkanalno pipeto nanesemo 50 μL celic v vse luknjice, razen v vdolbinice s slepo kontrolo in z zdravimi celicami. Ploščo postavimo v inkubator za točno 1 uro, da omogočimo ponovno zvitje encima. Po končani inkubaciji pri merilcu v nesterilnih pogojih dodamo 100 μL luciferaznega reagenta, na rahlo premešamo, pokrijemo s folijo, ter počakamo 5 min, da se celice lizirajo. Po končani lizi pomerimo luminiscenco s čitalcem mikrotitrskih ploščic Synergy H4 Hybrus Reader (protokol LUCI-MDA kb2).

Za izračun aktivnosti luciferaze smo od izmerjene luminiscence vzorcev odšteli slepo kontrolo in normalizirali na izmerjeno luminiscenco celic inkubiranih v DMSO z odstetom slepo (enačba 3).

$$\% \text{ Aktivnosti luciferaze} = \frac{\text{Lum (vzorec)} - \text{Lum (slepa)}}{\text{Lum (DMSO)} - \text{Lum (slepa)}}$$

Enačba 3: Izračun aktivnosti luciferaze.

4.8 Statistična analiza rezultatov

Dobljene rezultate smo statistično obdelali v programu Excel. Rezultate celic inkubiranih s testno spojino smo s pomočjo programa GraphPad Prism 5.0 primerjali z rezultati celic inkubiranih v 0,5 - 1,0 % DMSO. Aktivnim spojinam (delež proliferacije <30 %) smo iz

rezultatov celic po izpostavitvi pri šestih koncentracijah, z nelinearno regresijo določili IC₅₀ vrednosti. Rezultate testnih spojin smo grafično podali kot povprečje treh tehničnih replikatov s standardnim odklonom.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 TESTIRANJE NA CELIČNI LINIJI MCF-7

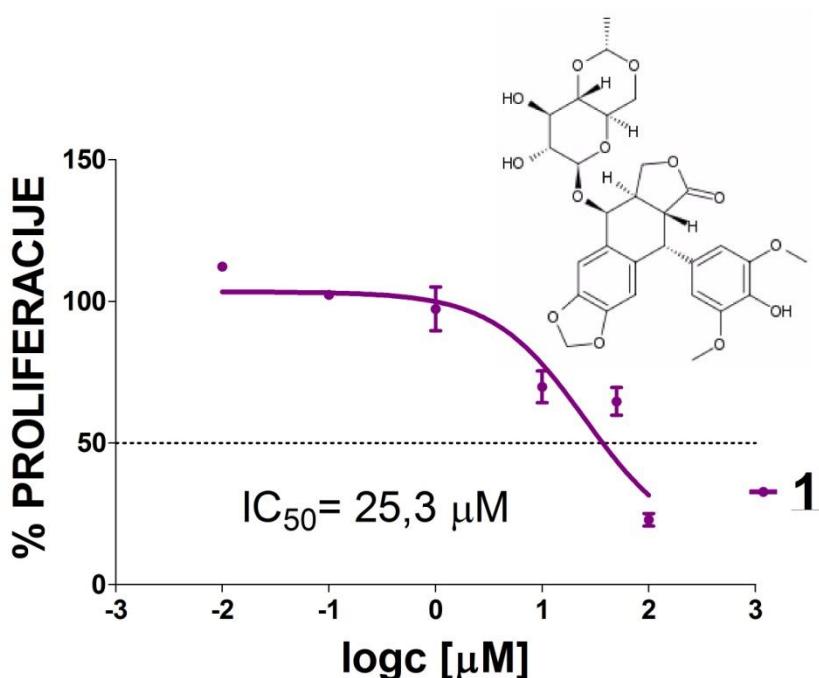
Testne spojine in etopozid smo na celični liniji raka dojke (MCF-7) testirali s MTS testom proliferacije. Na začetku testiranja smo opazili problem robnega efekta. Na robu se je v primerjavi z ostalimi luknjicami tekom inkubacije celična viabilnost znatno zmanjšala in je bila zelo raznolika. Imeli smo tako večjo variabilnost med rezultati in lažno pozitivne rezultate na robu. Primer ploščice, kjer je viden robni efekt, je prikazan na sliki 19. Prikazan je lažno pozitiven rezultat za spojino (57), ki je posledica robnega efekta. Iz rezultatov za 0,5 % DMSO vidimo znatno odstopanje rezultata robne luknjice od ostalih in raznoliko celično viabilnost v netretiranih robnih luknjicah. V nadaljnjih testih robnih luknjic nismo uporabili za testiranje, v njih smo dali le 150 µL medija, da smo omogočili enakomerno izhlapevanje.

A		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B			0,50% DMSO	6	75 uM	7	75 uM	48	50uM				
C					50 uM		50 uM	33	50uM				
D				30 uM		30 uM		35	50uM				
E					15 uM		15 uM	53	50uM				
F			SLEPA		10 uM		10 uM		50µM ETOPOZID				
G					1 uM		1 uM	57	50uM				
H								57	50uM				
B		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,223	0,094	0,252	0,337	0,366	0,386	0,268	0,263	0,331	0,415	0,248	0,196	
B	0,266	0,611	0,162	0,163	0,16	0,309	0,29	0,279	0,709	0,729	0,611	0,323	
C	0,418	0,734	0,185	0,186	0,191	0,423	0,517	0,512	0,653	0,677	0,7	0,258	
D	0,406	0,889	0,333	0,306	0,327	0,587	0,625	0,658	0,525	0,573	0,575	0,261	
E	0,363	0,173	0,436	0,405	0,436	0,65	0,73	0,677	0,162	0,162	0,161	0,32	
F	0,321	0,172	0,447	0,429	0,477	0,645	0,69	0,668	0,585	0,511	0,542	0,321	
G	0,262	0,174	0,709	0,7	0,713	0,681	0,725	0,657	1,107	1,121	1,13	0,259	
H	0,223	0,289	0,214	0,217	0,222	0,74	0,649	0,42	0,214	0,217	0,222	0,217	

Slika 19: Prikaz robnega efekta na eni izmed testnih ploščic. A prikazuje načrt tretiranja celic. V robne netretirane luknjice, ki so obarvane rdeče je celicam dodan le medij. B prikazuje izmerjene absorbance po 72 urni inkubaciji. Večja absorbanca pomeni večje število celic in obratno.

5.1.1 Eksperimentalna določitev zaviralne aktivnosti etopozida

Etopozid (**1**) je topoizomerazni strup, ki ima dokazano antiproliferativno delovanje. Najprej smo za vzpostavitev testne metode etopozid testirali v koncentracijah 100, 50, 10, 1, 0,1 in 0,01 μM . Kot kontrolo 100 % proliferacije smo uporabili 0,1 % DMSO. Iz inhibicijske krivulje smo določili IC_{50} (25,3 μM) (slika 20). Literaturna vrednost za etopozid je 60,3 μM , vendar je bila določena z drugo testno metodo in na druge celične liniji, zato težko primerjamo vrednosti med seboj. V nadalnjih testih smo ga uporabili kot standard pri koncentraciji 50 μM in 100 μM in s tem potrdili veljavnost testa. Ponovljivost rezultatov procenta proliferacije je bila dobra. V kolikor etopozid ni kazal aktivnosti pri 50 in 100 μM koncentraciji, smo test označili kot neveljaven in ga ponovili, saj bi lahko prišlo do napačnih rezultatov. Možni razlogi za to so številni. Lahko pride do napak zaradi nenatančnosti instrumentov, nenatančnosti pri delu, možne kontaminacije pri pipetiranju in neprevidnega ravnanja s celicami. Iz krivulje smo opazili, da nismo dosegli popolne inhibicije proliferacije pri 100 μM koncentraciji. Za boljšo določitev IC_{50} vrednosti, bi bilo treba testirati pri še višjih koncentracijah, vendar zaradi težav s topnostjo višjih koncentracij nismo uspeli pripraviti.



Slika 20: Krivulja odnosa med učinkom in logaritmom koncentracije etopozida **1**.

5.1.2 Eksperimentalno ovrednotenje zaviralne aktivnosti testnih spojin

Testirali smo 79 spojin iz DNA-girazne knjižnice, in sicer spojine **2 - 79**. Spojine smo po strukturi razdelili v štiri glavne skupine; tetrahidrobenzotiazole, benzotiazole, benzen pirolamide in ostale spojine. Najprej smo spojine testirali pri koncentraciji 50 μM . Kot kontrolo 100 % proliferacije smo uporabili celice inkubirane v DMSO s končno koncentracijo največ 1,0 %, za slepo kontrolo pa medij brez celic. Spojinam smo določili delež zaviranja rasti celic, kjer 0 % pomeni popolno inhibicijo proliferacije in 100 %, da inhibicije proliferacije ni. Nižji delež proliferacije torej pomeni, da je spojina boljši inhibitor. Spojine, pri katerih je bil delež proliferacije manjši od 30 %, smo ponovno testirali v širšem območju koncentracij od 75 μM do 0,1 μM in jim določili IC_{50} , ki nam pove, pri kateri koncentraciji inhibitor uspe zavreti proliferacijo celic za polovico. Na podlagi rezultatov preliminarnega testiranja smo dobro napovedali IC_{50} vrednost za večino spojin in jim pričakovane vrednosti v ponovnem testiranju tudi določili.

Vrednosti IC_{50} smo skušali določiti tudi spojinam, ki so imele delež proliferacije med 30 in 50 %, vendar so izračunane vrednosti le okvirne, saj smo imeli težave z določanjem vrednosti. Pri teh spojinah nismo uspeli doseči popolne inhibicije proliferacije pri najvišji koncentraciji. Imeli smo pripravljeni 10 mM spojine v DMSO in zato koncentracij višjih od 100 μM zaradi toksičnosti DMSO nismo mogli testirati. Prav tako spojine pri 100 μM koncentraciji niso bile povsem raztopljene. Spojine z deležem proliferacije nad 30 %, smo kasneje določili kot neaktivne in jim IC_{50} nismo določali. Testiranja smo izvedli pri eni biološki ponovitvi, le za najbolj aktivne spojine smo izvedli dve neodvisni biološki ponovitvi. Pri teh smo rezultate prikazali kot povprečno vrednost s standardnim odklonom. Rezultati testiranj so prikazani v preglednici II. Ugotovili smo, da je za dobro določitev IC_{50} nujno potrebno testiranje v treh tehničnih replikatih. Da bi lažje in bolj natančno določili IC_{50} , pa bilo dobro testirati pri več kot šestih koncentracijah.

Pripravljeni spojini v DMSO so bile videti bistre s čistostjo nad 95 %. Pri pripravi redčitev do 75 μM koncentracije težav s topnostjo nismo imeli. Močno obarvane spojine so bile spojina **36, 42, 43, 47**. Obarvanost spojine lahko moti merjenje absorbance in tako dobimo lažno negativne rezultate, kar pomeni da izmerimo višjo absorbanco, kot je v resnici živih celic.

Preglednica II: Zaviralna aktivnost spojin na rast celic MCF-7 podana v obliki deleža proliferacije pri koncentraciji inhibitorja 50 μM , in določene vrednosti IC_{50} . Spojine s deležem proliferacije 30 % in manj so obarvane oranžno.

TETRAHIDROBENZOTIAZOLI			
Oznaka spojine	Koda spojine	Delež proliferacije pri 50 μM	$\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$
<u>2</u>	TLK-5	51,0 %	$59,1 \pm 4,2$
<u>3</u>	TLK-11	30,0 %	31,0
<u>4</u>	TLK-16	62,0 %	$61,8 \pm 8,6$
<u>5</u>	TLK-6	0,6 %	$13,74 \pm 0,02$
<u>6</u>	TLK-13	16,0 %	17,8
<u>7</u>	TLK-15	35,1 %	56,0
<u>8</u>	TZS-13	7,3 %	28,8
<u>9</u>	TZS-17	2,2 %	28,5
<u>10</u>	TZS-27	55,0 %	83,1
<u>11</u>	TZS-26	2,4 %	23,7
<u>12</u>	TZS-30	15,0 %	38,7
<u>13</u>	TZS-32	11,0 %	48,8
<u>14</u>	TZS-33	2,4 %	27,3
<u>15</u>	TZS-36	2,0 %	12,0
<u>16</u>	TZS-39	89,0 %	/
<u>17</u>	TTM7	22,1 %	33,6
<u>18</u>	KSK2	63,0 %	86,4
<u>19</u>	KSK15	81,0 %	/
<u>20</u>	KSK6	46,0 %	60,5
<u>21</u>	TAL14	114,0 %	/
<u>22</u>	TAL15b	116,0 %	/
<u>23</u>	TAN6	107,0 %	/
BENZOTIAZOLI			
Oznaka spojine	Koda spojine	Delež proliferacije pri 50 μM	$\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$
<u>24</u>	KMG13	75,2 %	/

<u>25</u>	KMG15	130,0 %	/
<u>26</u>	KMG8	109,0 %	/
<u>27</u>	KMG9	97,0 %	/
<u>28</u>	KMG10	103,0 %	/
<u>29</u>	KMG11	114,0 %	/
<u>30</u>	KMG14	101,0 %	/
<u>31</u>	KMG16	130,0 %	/
<u>32</u>	KMG17	106,0 %	/
<u>33</u>	KMG48	71,0 %	/
<u>34</u>	KMB21	98,0 %	/
<u>35</u>	ZSR5	55,0 %	64,2
<u>36</u>	KMB-12	11,7 %	16,0
<u>37</u>	LDN-9	96,1 %	/

BENZEN PIROLAMIDI

Oznaka spojine	Koda spojine	Delež proliferacije pri 50 µM	IC ₅₀ [µM]
<u>38</u>	MDN35	70,0 %	171,5 ± 13,7
<u>39</u>	MDN101	45,0 %	46,0 ± 16,0
<u>40</u>	NNS18	115,0 %	/
<u>41</u>	NNS21	126,0 %	/
<u>42</u>	NNS17	117,0 %	/
<u>43</u>	NNS19	75,0 %	88,5
<u>44</u>	NNS23	113,0 %	/
<u>45</u>	NNS24	73,0 %	58,8
<u>46</u>	NNS30	107,0 %	/
<u>47</u>	NNS32	125,0 %	/
<u>48</u>	NHM80	87,0 %	/
<u>49</u>	NAS37	109,0 %	/
<u>50</u>	NAS39	110,0 %	/
<u>51</u>	NFM26	91,0 %	/
<u>52</u>	NFM33	134,0 %	/
<u>53</u>	DBT126	0,3 %	8,2 ± 1,0
<u>54</u>	DBT127	66,2 %	/

<u>55</u>	DBT129	124,0 %	/
<u>56</u>	IZS26	143,0 %	/
<u>57</u>	IZS27	132,0 %	/
<u>58</u>	DBT30	99,4 %	/
<u>59</u>	DBT84	65,0 %	90,5
<u>60</u>	IZS31	107,0 %	/
<u>61</u>	MDN50	0,1 %	13,0
<u>62</u>	MDN51	72,2 %	/
<u>63</u>	DBT121	126,0 %	/
<u>64</u>	DBT108	0,3 %	8,9 ± 0,8
<u>65</u>	MDN104	25,3 %	/
<u>66</u>	MDN47	0,2 %	9,0
<u>67</u>	MDN-32	92,0 %	/
<u>68</u>	MDN-33	4,8 %	5,0
<u>69</u>	MDN-34	88,0 %	/
<u>70</u>	NHM-77	78,0 %	/
<u>71</u>	NFF-49	80,1 %	/

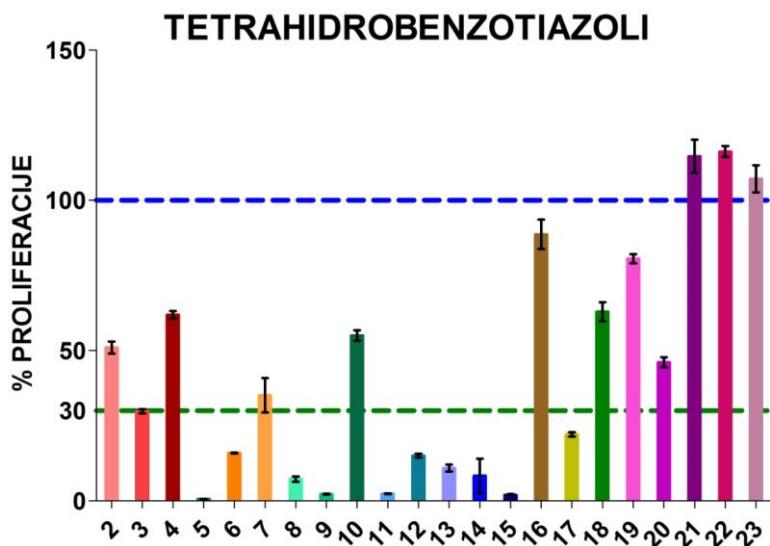
OSTALE SPOJINE

Oznaka spojine	Koda spojine	Delež proliferacije pri 50 µM	IC ₅₀ [µM]
<u>72</u>	TMM9	99,0 %	/
<u>73</u>	ATN-11	42,0 %	/
<u>74</u>	FCT-59	0,8 %	10,5
<u>75</u>	FCT-61	0,4 %	4,8
<u>76</u>	KAZ-11	15,0 %	2,7
<u>77</u>	FCT-88	75,0 %	/
<u>78</u>	FCT-104T	11,8 %	30,8
<u>79</u>	KAZ-30	91,7 %	/

/ = IC₅₀ ni bila določena

5.1.2.1 Tetrahidrobenzotiazoli

Iz skupine tetrahidrobenzotiazolov smo testirali 22 spojin (slika 21), od katerih so spojine **3, 5, 6, 8, 9, 11 - 15** in **17** pri koncentraciji $50 \mu\text{M}$ izkazovale ustrezen zaviralni učinek na rast celic. Grafi z določenimi IC_{50} vrednostmi so prikazani na sliki 22.

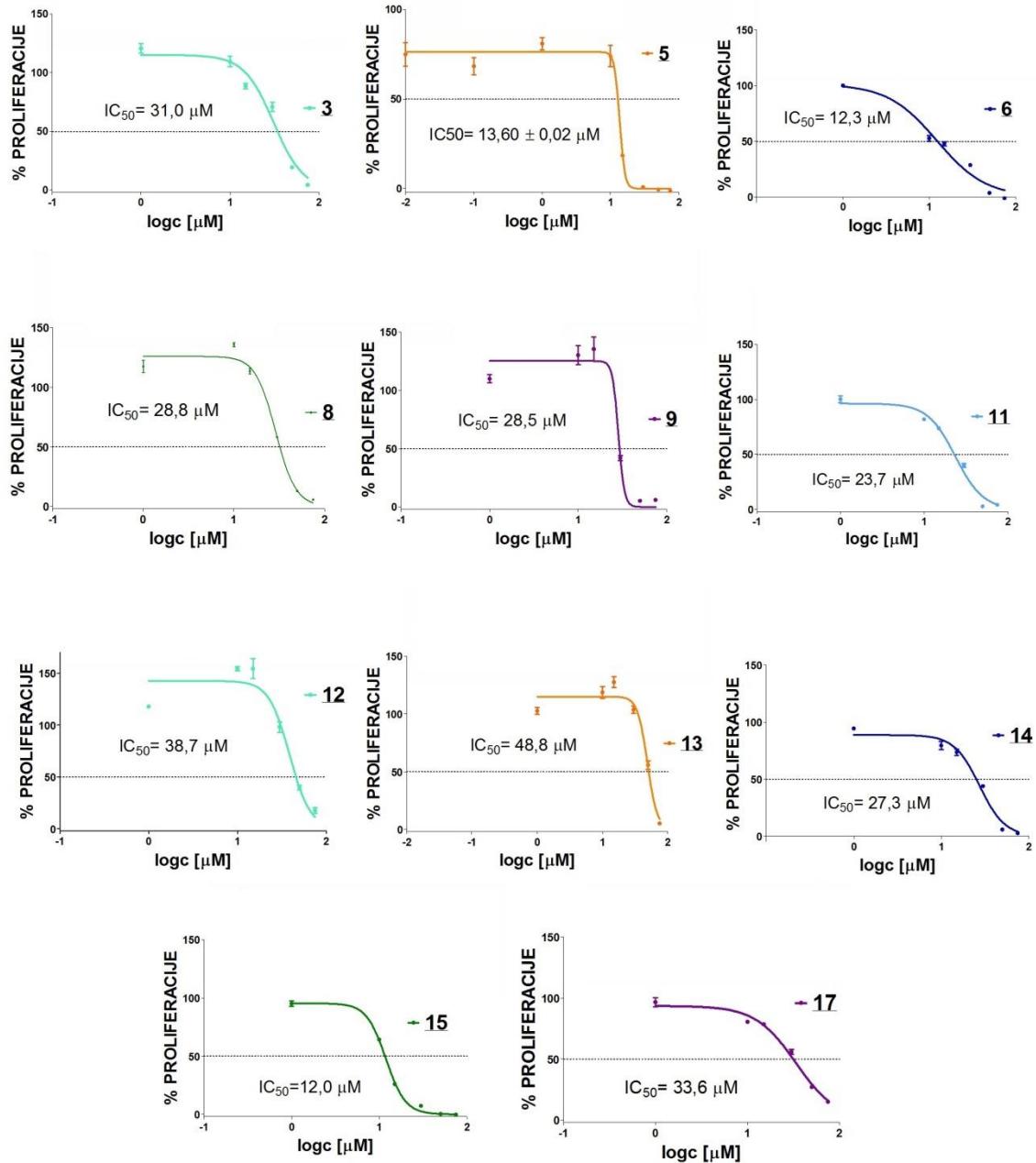


Slika 21: Delež proliferacije po izpostavitvi spojinam **2 - 23** pri koncentraciji $50 \mu\text{M}$.

Najbolj aktivne spojine s primerljivimi IC_{50} vrednostmi okoli $13,0 \mu\text{M}$ so bile spojina **5, 6** in **15**. Spojino **5** smo testirali v dveh neodvisnih bioloških ponovitvah. IC_{50} prve biološke ponovitve je bila $13,75 \mu\text{M}$, druge $13,72 \mu\text{M}$, povprečna vrednost pa $13,74 \pm 0,02 \mu\text{M}$. Iz same oblike krivulje te spojine smo sklepali na morebitne težave s topnostjo, zato smo z NMR cevko preverili topnost pri končni koncentraciji $100 \mu\text{M}$. Pripravljena raztopina je bila videti bistra, prav tako pri pripravi redčitev s prostim očesom ni bilo videti težav s topnostjo. Spojine **3, 8, 9, 12** in **13** dajejo rezultat večji kot 100%, kar bi bilo lahko zaradi same variabilnosti biološkega testa, slabe izvedbe testa ali možne pozitivne interference zaradi obarvanosti spojine.

Iz danih rezultatov lahko glede na strukture spojin sklepamo, da tetrahidrobenzotiazoli s prosto alifatsko karboksilno skupino ne kažejo aktivnosti na celicah. Kot zelo ugodno se kaže prisotnost bazične aminske skupine na ustrezeni razdalji vsaj dveh C-atomov od amida. To dobro vidimo iz primerjave spojin **2** in **5**, ki se razlikujeta le v tem delu molekule in v enem dodatnem C-atomu pri spojini **5**. Na aktivnost ugodno vplivajo tudi dikloropirolna in dibromopirolna skupina, ter dajejo v večini primerljive rezultate. Spojina

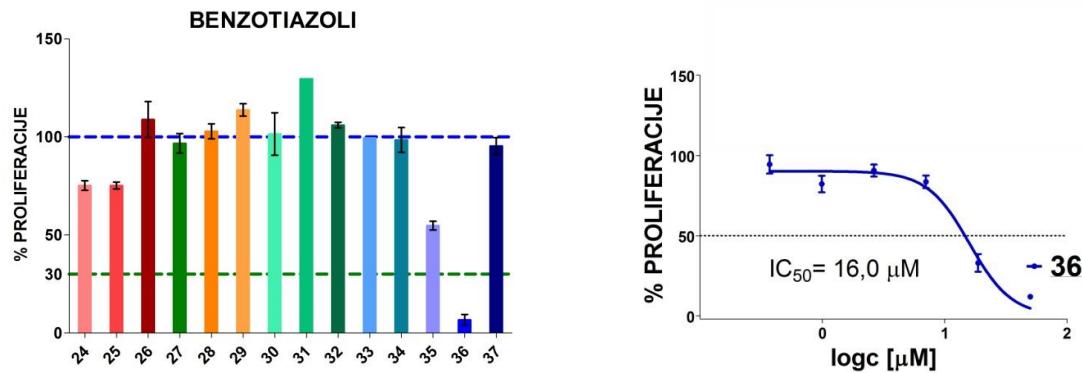
16 z monoklorovim substituentom na pirolu je neaktivna, prav tako sklepamo, da njen neaktivnost povečuje tudi kot že omenjen krajši distančnik med amidom in aminsko skupino.



Slika 22: Krivulje odnosa med učinkom in logaritmom koncentracije za spojine 3, 5, 6, 8, 9, 11- 15 in 17.

5.1.2.2 Benzotiazoli

V skupini benzotiazolov smo kot aktivno spojino med 14 testiranih (slika 23) identificirali le spojino **36** in ji določili IC_{50} 16,0 μM (slika 24). Meritev smo izjemoma pri tej spojini izvedli po 24 urah in ne po 72 urni inkubaciji, da bi zmanjšali vpliv robnega efekta, zato ne moremo zagotovo trditi v pravilnost določene IC_{50} vrednosti.

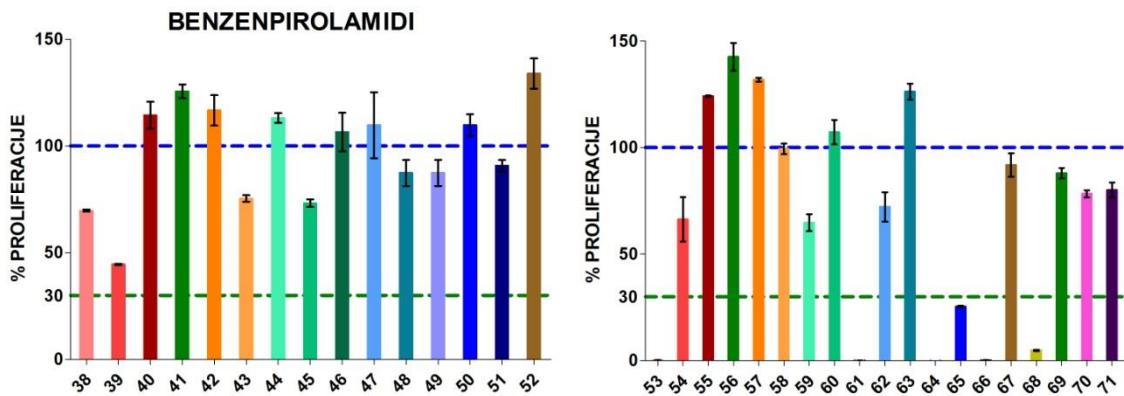


Spojine s karboksilno skupino se tudi v tej skupini kažejo kot neaktivne. Iz strukture spojine **36** v primerjavi z ostalimi benzotiazoli lahko sklepamo, da na aktivnost ugodno vpliva obrnjen centralni del molekule, kjer je pirolamidni substituent vezan na benzenov obroč. Verjetno tudi substitucija s diklorometilpirolnim fragmentom ugodno vpliva na aktivnost.

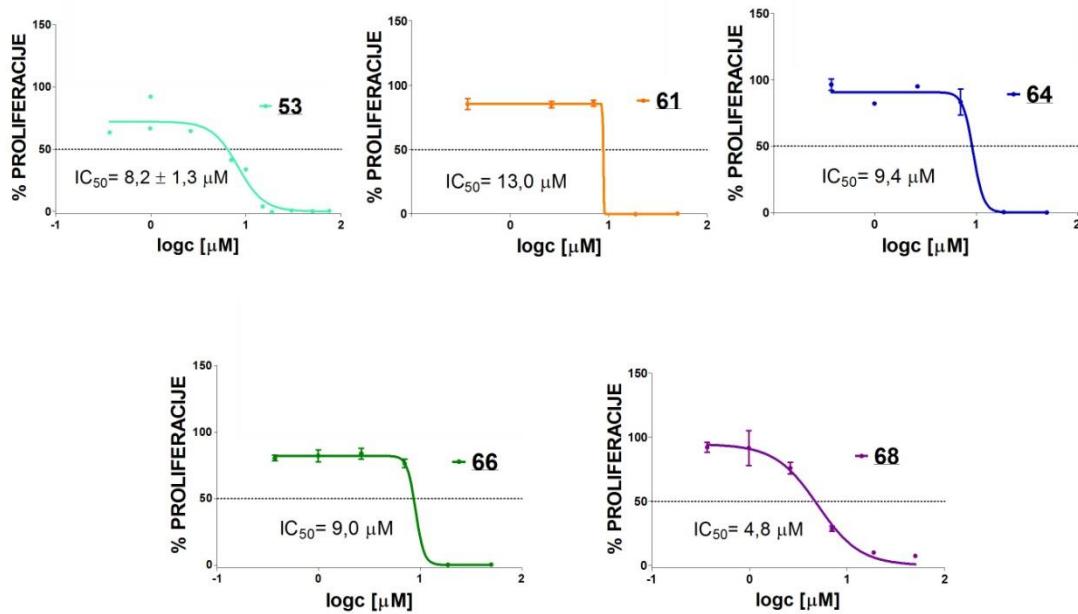
5.1.2.3 Benzen pirolamidi

Iz strukturnih pirolamidnih derivatov benzena smo testirali 32 spojin (slika 25), od tega so bile aktivne spojine **53**, **61**, **64**, **65**, **66** in **68** in jim določili IC_{50} (slika 26). Spojine **53**, **61**, **64**, in **68** so bile izmed vseh testiranih najboljši zaviralci z IC_{50} pod 10 μM . Spojini **68** smo določili IC_{50} izjemoma po 24 urni inkubaciji in ne po 72 urni, zato je določena IC_{50} le okvirna. Rezultati spojin **41**, **52**, **55**- 57 in **63** dosežejo skoraj 150 % proliferacijo, kar bi bilo lahko zaradi same variabilnosti biološkega testa, slabe izvedbe testa ali možne pozitivne interference zaradi obarvanosti ali netopnosti spojine. Iz rezultatov smo tudi v tej skupini opazili, da so bile spojine s karboksilno kislino neaktivne. Na aktivnost ugodno vpliva prisotnost bazične aminske skupine ali benzilnega substituenta. Spojina **61** vsebuje tako benzilni substituent, kot bazično aminsko skupino, zaradi česar sklepamo, da ima

spojina toliko boljšo aktivnost, vendar je naklon krivulje pri tej spojni zelo strm. Za boljšo določitev bi bilo treba testirati v ožjem območju koncentracij.



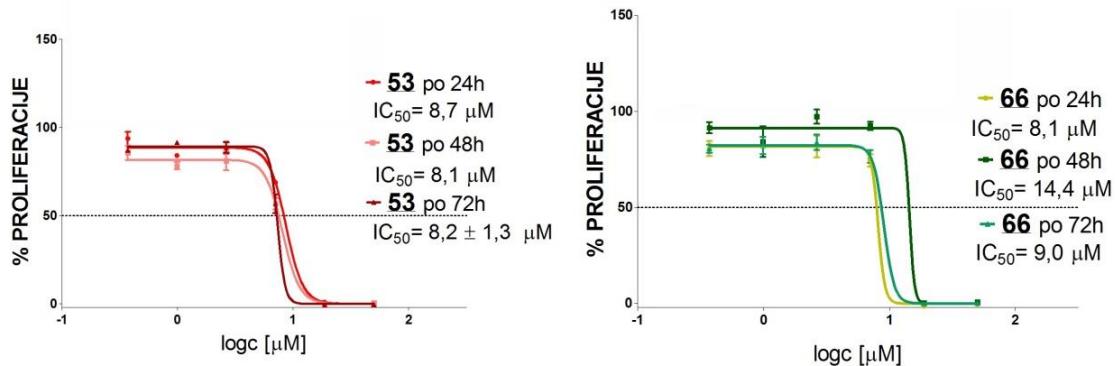
Slika 25: Delež proliferacije po izpostavitvi spojinam 38 - 71 pri koncentraciji 50 μM .



Slika 26: Krivulje odnosa med učinkom in logaritmom koncentracije za spojine 53, 61, 64, 65, 66 in 68.

Spojini 53 in 66 smo za primerjavo testirali v različnih časovnih intervalih, in sicer po 24, 48 in 72 urni inkubaciji. Izmerjene IC₅₀ vrednosti so prikazane na sliki 27. Vrednosti IC₅₀ so med seboj dobro primerljive. Na podlagi dejstva, da so celice MCF-7 zelo počasi

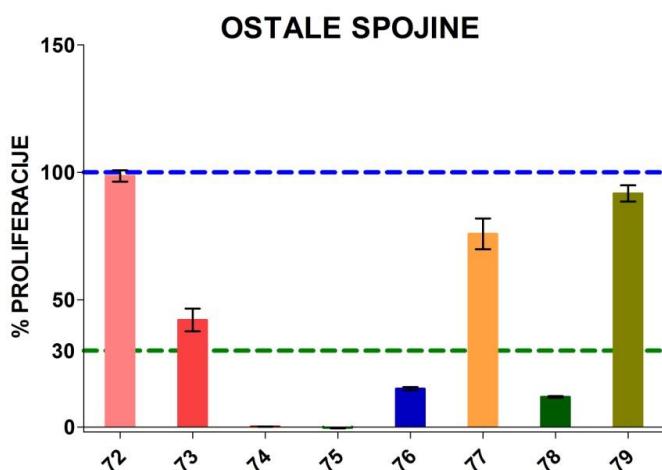
rastoče in je njihov podvojvitveni čas 30-40 ur, smo kot pravo IC_{50} vrednost vzeli meritev po 72 urah.



Slika 27: Krivulje odnosa med učinkom in logaritmom koncentracije za spojine **53** in **66** po 24, 48 in 72 urni inkubaciji.

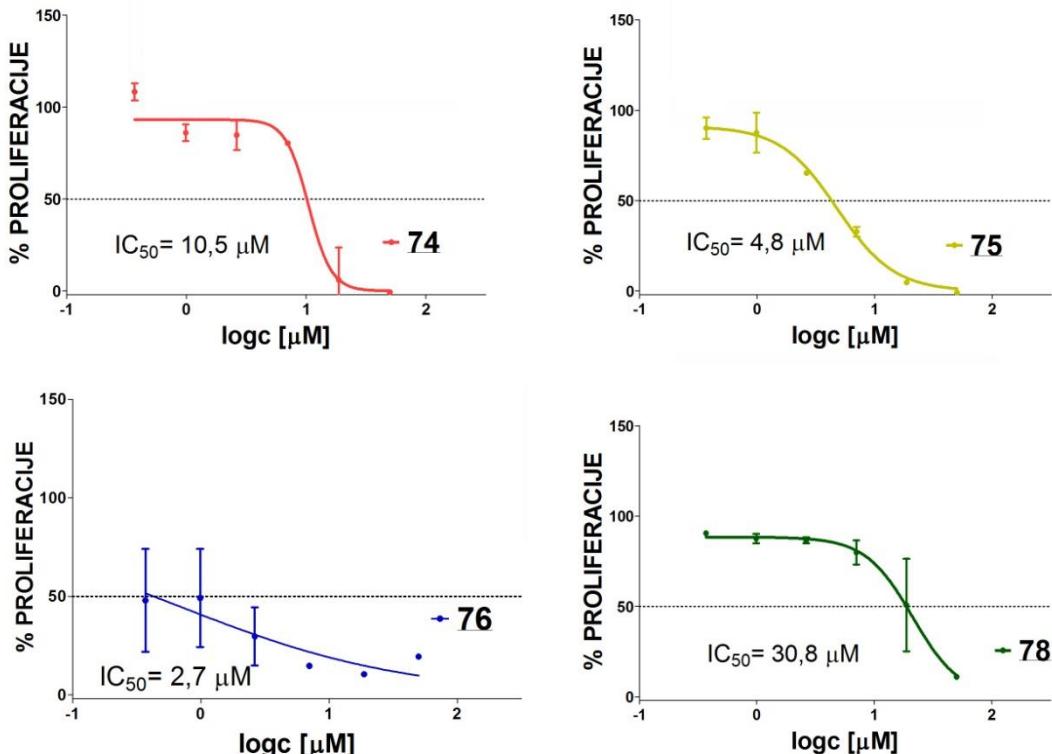
5.1.2.4 Ostale spojine

Pod ostale spojine smo razvrstili 8 različnih spojin, ki so bile prav tako načrtovane kot girazni inhibitorji (slika 28). Kot zelo dobro aktivne so se izkazale spojine **74**, **75**, **76**, in **78** (slika 29). Kisline so bile neaktivne. Oblika krivulje za spojino **76** se vidno razlikuje od ostalih. Na podlagi tega sklepamo, da gre lahko pri tej spojini za druge še neznane interakcije, prav tako ne uspemo doseči 100 % proliferacije. Za boljšo določitev bi bilo treba testirati pri koncentracijah pod $1\mu M$. Zaradi raznolikosti struktur težko sklepamo kateri fragment ugodno vpliva na aktivnost. Testirati bi bilo potrebno večjo serijo spojin podobnih struktur.



Slika 28: Delež proliferacije po izpostavitvi spojinam **72** - **79** pri koncentraciji $50\mu M$

Pri redčenju spojin sicer nismo opazili težav s topnostjo, vendar smo glede na nenavadno obliko krivulj za spojine **74**, **75**, **76** in **78** vseeno preverili topnost pri končni koncentraciji $100 \mu\text{M}$ v mediju z NMR cevko. Vse pripravljeni redčitve so bile s prostim očesom videti bistre.

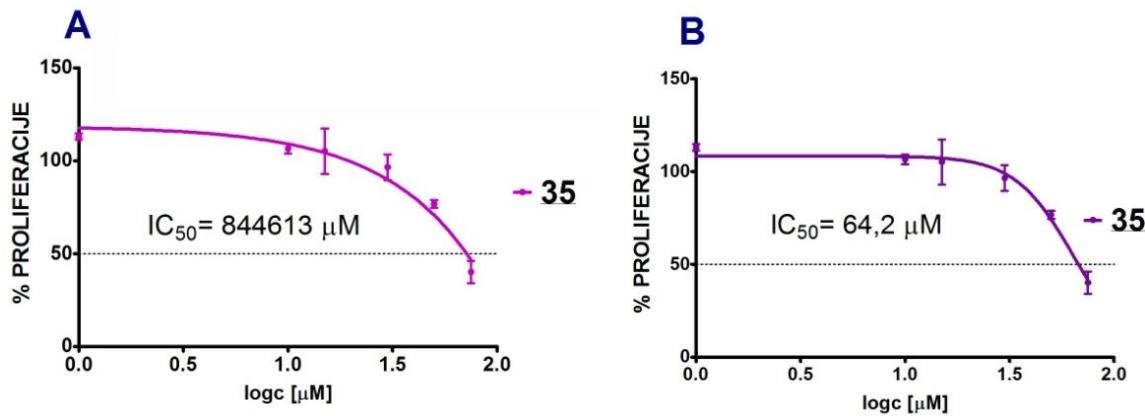


Slika 29: Krivulje odnosa med učinkom in logaritmom koncentracije za spojine **74**, **75**, **76** in **78**.

5.1.3 Težave pri testiranju slabše aktivnih spojin

Na začetku testiranja smo želeli določiti IC_{50} tudi spojinam, ki zavirajo rast celic vsaj za 50 %. Pri teh spojinah nismo uspeli doseči popolne inhibicije proliferacije. Testirati bi morali pri višjih koncentracij, kar zaradi slabe topnosti spojin in toksičnosti DMSO ni bilo mogoče. Zaradi nepopolne koncentracijske krivulje program sam ni mogel predvideti konca krivulje, zaradi česar smo imeli težave pri določitvi IC_{50} . Pričakovali smo IC_{50} okoli $50 \mu\text{M}$. Da smo dobili približno pričakovano vrednost, smo v programu nastavili dno krivulje na 0, saj je bila brez te nastavitev vrednost IC_{50} previsoka. Razliko v določeni IC_{50}

pri testiranju spojine 35, ki je posledica različnih nastavitev v programu GraphPad Prism, je prikazana na sliki 30. Na podlagi teh rezultatov smo nato IC_{50} določili le spojinam, ki so zavirale rast celic vsaj za 30 %, ostale pa smo označili za neaktivne.



Slika 30: Razlika v določeni IC_{50} vrednosti za spojino 35. **A** prikazuje določeno IC_{50} brez dodatnih nastavitev v programu. **B** prikazuje IC_{50} vrednost, določeno s pomočjo dodatne nastaviteve v programu GraphPad Prism, in sicer dno krivulje je nastavljen na 0.

5.1.4 Primerjava rezultatov s testiranjem na encimih

Večje povezave med rezultati celičnega testiranja in testiranja na encimih nismo opazili. Kot aktivna na MCF-7 celicah in na topoizomerazi II je bila le spojina 39, za katero smo določili tudi primerljivo IC_{50} . Rezultati encimskega testiranja so podani v obliki rezidualne aktivnosti (RA) encima pri koncentraciji 50 μM , ki nam pove, kolikšna je izguba aktivnosti encima zaradi prisotnosti zaviralca. Rezidualna aktivnost 100 % pomeni popolno aktivnost encima, 0 % pa pomeni, da je delovanje encima popolnoma zavirano. Primerjava rezultatov za spojino 39 je prikazana v preglednici III.

Preglednica III: Zaviralna aktivnost spojine **39** na rast celic MCF-7 (podana v obliki deleža proliferacije) in na topoizomerazo II (podana v obliki rezidualne aktivnosti encima) pri koncentraciji inhibitorja 50 µM z določenimi vrednostmi IC₅₀.

		TESTIRANJE NA MCF-7		TESTIRANJE NA TOPOIZOMERAZO II	
Oznaka spojine	Koda spojine	Delež proliferacije pri 50 µM	IC ₅₀ [µM]	Rezidualna aktivnost encima pri 50 µM	IC ₅₀ [µM]
39	MDN101	45,0 %	46,0 ± 16,0	34,0 %	45,1 ± 12,4

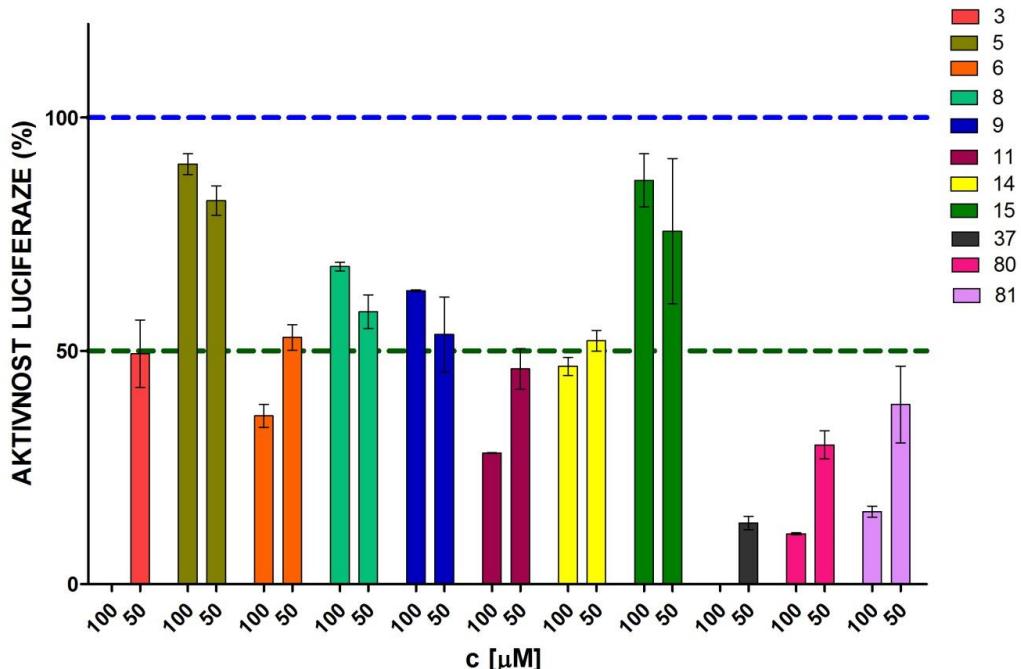
V nasprotju z rezultati testiranja na girazi, so bile na celicah MCF-7 vse spojine s prisotno karboksilno kislino neaktivne. Predvidevamo, da je kislinam zaradi njihovih lastnosti onemogočen prehod skozi celično membrano. Iz rezultatov na girazi je znano, da so dikloro substituirane spojine bolj aktivne od dibromo substituiranih spojin, kar se pri nekaterih spojinah kaže tudi na celicah. Za potrditev te domneve bi morali testirati večjo serijo spojin. Glede na to, da nismo dobili primerljive rezultate z encimskimi testi, težko trdimo, da spojine zavirajo proliferacijo celic preko zaviranja Hsp90 ali topoizomeraze II α.

Da spojine zavirajo proliferacijo celic najverjetneje preko drugih, do zdaj neznanih interakcij, lahko predvidimo tudi iz rezultatov IC₅₀, ki se gibljejo v območju med 5 in 20 µM.

5.2 TESTIRANJE NA CELIČNI LINIJI PC3 MM2 luc

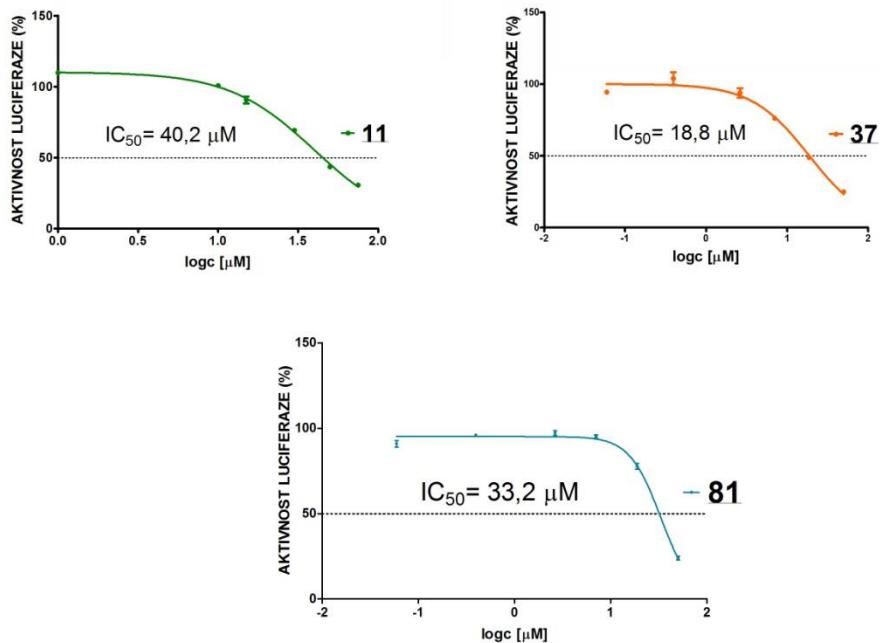
Na celični liniji raka prostate s povečano izraženim encimom luciferaze smo iz skupine tetrahidrobenzotiazolov testirali spojine **3**, **5**, **6**, **8**, **9**, **11**, **14**, **15** in spojino **37**, ki spada v skupino benzotiazolov. Testirali smo pri 100 in 50 µM koncentraciji, izjemoma spojino **3** in **37** le pri 50 µM. Kot kontrolo 100 % aktivne luciferaze smo uporabili celice inkubirane v 1,0 in 0,5 % DMSO, za slepo kontrolo pa medij brez celic. Kot pozitivni kontroli smo testirali znan N-terminalni Hsp90 zaviralec geldanamicin (**80**) in C-terminalni zaviralec (**81**) pri koncentracijah 100 in 50 µM. Spojinam smo iz izmerjene luminiscence določili delež ponovno zvite ozr. aktivne luciferaze, kjer 0 % pomeni popolno inhibicijo ponovnega zvitja luciferaze in 100 % popolno regeneracijo luciferaze brez inhibicije. Nižji delež

aktivne luciferaze pomeni, da je spojina boljši inhibitor Hsp90. Rezultati so prikazani na sliki 31.



Slika 31: Delež aktivne luciferaze po izpostavitvi spojinam **3, 5, 6, 8, 9, 11, 14, 15, 37, 80** in **81** pri 100 μM in 50 μM koncentraciji.

Spojine **11**, **37** in **81** smo ponovno testirali v širšem koncentracijskem območju in jim določili IC₅₀, ki nam pove pri kateri koncentraciji inhibitor uspe zavreti ponovno zvitje luciferaze za polovico. Grafi z določeno IC₅₀ so prikazani na sliki 32. Spojina **81** je bila po odmrznitvi v DMSO netopna, kar bi lahko vplivalo na rezultate. Pri določitvi IC₅₀ nismo dosegli popolne inhibicije ponovnega zvitja luciferaze. Spojino **11** smo testirali v območju koncentracij od 75 μM do 1 μM in višje koncentracije zaradi slabe topnosti spojine in toksičnosti DMSO nismo uspeli pripraviti. Spojini **37** in **81** pa smo testirali v območju od 50 μM do 0,1 μM . Za boljšo določitev krivulje bi bilo treba testirati še pri 75 μM koncentraciji.



Slika 32: Inhibicijske krivulje ponovnega zvitja luciferaze v odvisnosti od logaritma koncentracije za spojine **11**, **37** in **81**.

Spojine **3**, **6**, **11** in **14** inhibirajo ponovno zvitje luciferaze za vsaj 50 %, iz česar lahko sklepamo, da spojine zavirajo proliferacijo MCF-7 celic preko delovanja na Hsp90, vendar je delovanje zelo šibko. Verjetno je posledica zaviranja tudi vezava na druge tarče. Med seboj imajo zelo primerljive rezultate, kar je pričakovano, saj so tudi IC₅₀ vrednosti določene na MCF-7 primerljive. Za spojini **6** in **15** smo glede na dobro aktivnost na celični liniji MCF-7 pričakovali pozitiven rezultat na Hsp90, vendar sta se izkazali za neaktivni. Sklepamo, da lahko zavirajo proliferacijo MCF-7 celic zaradi vezave na drugo tarčo ali pa je težava v samih lastnostih spojine. V nasprotju z rezultati na MCF-7, se je spojina **37**, ki vsebuje karboksilno kislino in je bila na MCF-7 celicah neaktivna, v tem testu izkazala kot dober inhibitor Hsp90 z IC₅₀ 18,8 μM. Določena IC₅₀ spojine **81** (33,2 μM) je primerljiva z določeno vrednostjo na Univerzi v Indiani (40 μM). Primerjava rezultatov na celični liniji PC3 MM2 luc z IC₅₀ določenimi na celični liniji MCF-7 je prikazana v preglednici IV.

Preglednica IV: Zaviralna aktivnost spojin na ponovno zvitje encima luciferaze podana v obliki deleža aktivne luciferaze pri koncentraciji inhibitorja 50 μM in 100 μM , ter določene vrednosti IC_{50} na celični liniji MCF-7. Spojine z deležem aktivne luciferaze manj od 50 % so obarvane oranžno.

Oznaka spojine	Koda spojine	Dlež aktivne luciferaze		$\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$ določena na MCF-7
		pri 50 μM	pri 100 μM	
<u>3</u>	TLK-11	49,4 %	/	31,0
<u>5</u>	TLK-6	82,2 %	90,0 %	$13,74 \pm 0,02$
<u>6</u>	TLK-13	52,8 %	36,1 %	17,8
<u>8</u>	TZS-13	58,4 %	68,1 %	28,8
<u>9</u>	TZS-17	53,5 %	62,9 %	28,5
<u>11</u>	TZS-26	46,1 %	28,1 %	23,7
<u>14</u>	TZS-33	52,2 %	46,7 %	27,3
<u>15</u>	TZS-36	75,6 %	86,7 %	12,0
<u>37</u>	LDN-9	13,1 %	/	/
<u>80</u>	/	30,0 %	10,8 %	/
<u>81</u>	/	38,5 %	15,5 %	/

/ = IC_{50} ni bila določena

6 SKLEP

V okviru magistrske naloge smo na celični liniji MCF-7 testirali 79 spojin iz DNA-girazne FFA knjižnice spojin. Glede na strukture smo jih razdelili na tetrahidrobenzotiazole, benzotiazole, benzen pirolamide, ter ostale spojine. Test proliferacije na MCF-7 celični liniji smo najprej izvedli po 24, 48 in 72 urni inkubaciji celic s testnimi spojinami in ugotovili, da je za natančnejšo določitev zaviralne aktivnosti nujna določitev po 72 urni inkubaciji, saj se celice razmnožujejo zelo počasi. V primeru krajše inkubacije lahko dobimo lažno negativne rezultate. Kot pozitivno kontrolo smo na vseh testnih ploščah uporabili znan topoizomerazni zaviralec etopozid in mu določili IC_{50} 25,3 μM . Pri preliminarnem testiranju smo odkrili 22 spojin, ki so zavirale proliferacijo za več kot 70%.

Iz primerjave dobljenih rezultatov s strukturami smo ugotovili, da na celično aktivnost vpliva prisotnost bazične aminske skupine na ustrezni razdalji vsaj dveh C-atomov od amida. Prav tako je ugodna prisotnost dikloropirolne in dibromopirolne skupine, kar se kaže tudi na encimskih testih. Spojine s prosto alifatsko karboksilno skupino so se pri vseh strukturnih skupinah pokazale kot neaktivne. Sklepamo, da jim je zaradi njihovih lastnosti onemogočen prehod skozi celično membrano in tako ne uspejo priti do tarče. Najboljši zaviralci z vrednostmi IC_{50} pod 10 μM so bili zaviralci iz skupine benzen pirolamidov, kjer na aktivnost ugodno vpliva prisotnost bazične aminske skupine ali benzilnega substituenta. Dobljene vrednosti IC_{50} so bile v območju med 5 in 20 μM .

Pri primerjavi rezultatov celičnega testiranja s testiranjem na encimih večje povezave nismo opazili. Aktivna v obeh testih je bila le spojina **39**. Glede na slabo povezavo s encimskimi testi sklepamo, da spojine zavirajo proliferacijo celic preko vezave še na druge tarče ali pa je težava v slabosti topnosti spojin.

Na celični liniji PC3 MM2 luc smo vzpostavili novo metodo za specifično odkrivanje in vrednotenje potencialnih zaviralcev Hsp90. Testirali smo najbolj potencialne zaviralce Hsp90 iz skupine tetrahidrobenzotiazolov. Spojinam **3**, **6**, **11** in **14** smo določili vsaj 50 % aktivnost, iz česar sklepamo, da šibko zavirajo proliferacijo MCF-7 preko delovanja na Hsp90 in da je aktivnost posledica vezave tudi na druge tarče. Ostalim spojinam nismo dokazali pričakovane aktivnosti.

Pri nadalnjih raziskavah je pomembno, da bi za natančnejšo določitev IC₅₀ testirali v večjem koncentracijskem območju in testiranje ponovili v treh neodvisnih paralelah. Da bi se izognili lažno negativnim rezultatov, bi v prihodnje morali biti bolj pazljivi pri sami obarvanosti spojine in rešiti težave s topnostjo. Pomembno je, da bi spojine imele ustrezne fizikalno kemijske lastnosti, da bi se uspešno prebile do tarče v celicah in bile netoksične za zdrave celice.

7 LITERATURA

1. Kreft E. M, Erman A, Hudoklin S, Romih R.: Celična biologija z genetiko. Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice, Ljubljana, 2011; 1: 77-104.
2. Serša G.: Biološke in molekularne značilnosti malignih celic ter njihove tarče pri zdravljenju raka. Farmacevtski vestnik 2009; 60: 43-47.
3. Ribarič S.,[et.al.]: Temelji patološke fiziologije. Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2014; 3: 115-134.
4. Douglas H, Weinberg A. R.: The Hallmarks of Cancer. Cell 2000; 100: 57-70.
5. Novaković S.: Karcinogeneza - nastanek rakastih celic. Onkologija 2006; 2; 99-102.
6. Saibil H.: Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. Nature Reviews Molecular Cell Biology 2013; 14: 630-642.
7. Li J, Buchner J.: Structure, Function and Regulation of the Hsp90 Machinery. Biomed Journal 2013; 36(3): 106-117.
8. Peterson B. L.: Investigation of the Hsp90 C-terminal Binding Site, Novel Inhibitors and Isoform-Dependent Client Proteins, doctor diseration, Faculty of the University of Kansas, program Medicinal Chemistry, 2012.
9. Taipale M, Jarosz F. D, Lindquist S.: Hsp90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. Molecular cell biology 2010; 11: 515-528.
10. Byrd M. K, Subramanian C, Sanchez J, Motiwala F. H, Liu W, Cohen S. M, Holzbeierlein J, Blagg S. J. B.: Synthesis and Biological Evaluation of Novobicin Core Analogues as Hsp90 Inhibitors. Journal of Medicinal Chemistry 2016; 22: 6921-6931.
11. Wang M, Shen A, Zhang C, Song Z, Ai J, Liu H, Sun L, Ding J, Geng M, Zhang A.: Development of Heat Shock Protein (Hsp90) Inhibitors To Combat Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors though Hsp90-Kinase Interactions. Journal od Medicinal Chemistry 2016; 59: 5563-5586.
12. Soo T. L. E, Yip W. C. G, Lwin ZM, Kumar D. S, Bay B.: Heat Shock Proteins as Novel Therapeutic Targets in Cancer. In vivo 2008; 22: 311-316.
13. Bhat R, TummalaPalli R. S, Rotella P. D.: Progress in the Discovery and Development of Heat Shock Protein 90 (Hsp90) Inhibitors. Journal of Medicinal Chemistry 2014; 57 (21), 8718-8728.

14. Jhaveri K, Taldone T, Modi S, Chiosis G.: Advances in the clinical development od heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors in cancer. Biochimica et Biophysica Acta 1823 2012; 742-755.
15. Pogorelčnik B, Janežič M, Perdih A.: Zaviralci DNA topoizomeraze II α - pomembne tarče protirakovih učinkovin. Farmacevtski vestnik 2015; 66: 326-333.
16. Pogorelčnik B, Brvar M, Žeruga B, Filipič M, Solmajer T, Perdih A.: Discovery of Mono- and Disubstituted 1H-Pyrazolo[3,4]pyrimidines and 9H-Purines as Catalytic Inhibitors of Human DNA Topoisomerase II α . ChemMedChem 2015; 10: 345-359.
17. Janežič M, Pogorelčnik B, Brvar M, Solmajer T, Perdih A.: 3-substituted-1H-indazoles as Catalytic Inhibitors of the Human DNA Topoisomerase II α . ChemistrySelect 2017; 2: 480-488.
18. Nitiss L. J.: Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. Nat Rev Cancer 2009; 9(5): 338-350.
19. Wyllie A, Donahue V, Fischer B, Hill D, Keesey J, Manzow S.: Apoptosis and Cell proliferation. Boehringer Mannheim GmbH, Germany, 1998; 2: 64-100.
20. Metode določevanja celične proliferacije:
<http://www.biocompare.com/Editorial-Articles/117892-Cell-Proliferation-Assays/>, Dostop: 20.9.2017.
21. Metode določevanja celične proliferacije:
<http://www.abcam.com/primary-antibodies/the-cell-proliferation-guide>, Dostop: 20.9.2017.
22. Celična linija MCF-7:
<http://www.mcf7.com/>, Dostop: 20.7.2017.
23. Thawing, Propagating, and Cryopreserving Protocol, MCF-7 Breast adenocarcinoma, iz: https://physics.cancer.gov/docs/bioresource/breast/NCI-PBCF-HTB22_MCF7_SOP-508.pdf, Dostop: 20.7.2017.
24. Prikaz rasti celične linije MCF-7:
https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=86012803&collection=ecacc_gc, Dostop: 20.7.2017.
25. Celična linija PC3:
https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1435.aspx?geo_country=si#generalinformation, Dostop: 10.8.2017.

26. Sadikot T, Swink M, Eskew D. J, Brown D, Zhao H, Kusuma R. B, Rajewski A. R, Blagg J. S. B, Matts L. R, Holzbeierlein M. J, Vielhauer A. G.:Development of a High-Throughput Screening Cancer Cell-Based Luciferase Refolding Assay for Identifying Hsp90 Inhibitors. *Assay and Drug Development Technologies* 2013; 11; 8: 478-488.
27. Fonović P. U, Obermajer N, Jevnikar Z, Mirković B, Rojnik M, Pišlar A, Kos J.: Vaje iz farmacevtske biokemije, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko biokemijo, Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana, 2014: 97-101.
28. Fundamental Techniques in Cell Culture, Laboratory Handbook 2nd Edition, iz: https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/101902/ecacc_lab_handbook.pdf, Dostop: 20.7.2017.
29. Hemocitometer:
<https://home.cc.umanitoba.ca/~adam/lab/Haemocytometer.htm>, Dostop: 20.7.2017.
30. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega. Dostop: 21.7.2017, iz: <https://www.promega.com.br/~/media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/0/CellTiter%2096%20AQueous%20One%20Solution%20Cell%20Proliferation%20Assay%20System%20Protocol.pdf>
31. Luciferase Assay System, Promega. Dostop: 21.7.2017, iz: <https://www.promega.com/~/media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/0/Luciferase%20Assay%20System%20Protocol.pdf>