

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA OVEN

VREDNOTENJE L-AMINOOKSIDAZ KOT INDUKTORJEV APOPTOZE

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



MAJA OVEN

VREDNOTENJE L-AMINOOKSIDAZ KOT INDUKTORJEV APOPTOZE
EVALUATION OF L-AMINO ACID OXIDASES AS INDUCERS OF
APOPTOSIS

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Oven M. Vrednotenje L-aminooksidaz kot induktorjev apoptoze.
Magistrska naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa, univ. diplom. kem. in somentorstvom doc. dr. Anje Pišlar, mag. farm.. Eksperimentalno delo sem opravljala v laboratorijih na Katedri za farmacevtsko biologijo.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Janku Kosu, univ.dipl. kem. za omogočeno opravljanje magistrskega dela in za izkazano zaupanje, potrpežljivost ter strokovno vodenje pri nastajanju magistrske naloge.

Iskreno se zahvaljujem tudi somentorici doc. dr. Anji Pišlar, mag. farm., za neprecenljivo strokovno in tehnično pomoč. Hvala za ves trud, vsestransko podporo in potrpežljivost.

Posebna zahvala gre ob tej priložnosti staršema, partnerju Lenartu in vsem prijateljem, ki so me skozi študij neprestano spodbujali, mi stali ob strani in verjeli vame. Hvala vsem!

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa, univ. dipl. kem. in somentorstvom doc. dr. Anje Pišlar, mag. farm..

Maja Oven

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	I
KAZALO SLIK	III
KAZALO PREGLEDNIC.....	IV
KAZALO ENAČB.....	IV
POVZETEK	V
ABSTRACT.....	VI
KLJUČNE BESEDE (KEYWORDS).....	VII
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1 UVOD	1
1.1 APOPTOZA.....	1
1.1.1 Ekstrinzična signalna pot apoptoze.....	3
1.1.2 Intrinzična signalna pot apoptoze	5
1.2 L-AMINOKISLINSKE OKSIDAZE (LAO)	7
1.2.1 Predstavitev in vloga.....	7
1.2.2 Mehanizem delovanja LAO	9
1.2.3 LAO iz kačjega strupa	9
1.2.4 LAO izolirane iz gliv	11
2 NAMEN DELA	14
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 MATERIALI.....	15
3.1.1 Reagenti	15
3.1.2 Standardi	17
3.1.3 Protitelesa.....	17
3.1.4 Laboratorijska oprema	18
3.1.5 Pufri	20
3.1.6 Gojišča	22
3.1.7 Biološki material.....	22
3.1.7.1 Celične kulture.....	22
3.1.7.2 Citotoksična proteina ApLAO in CgLAO	25
3.2 METODE.....	26
3.2.1 Spektrofotometrija	26
3.2.1.1 Vrednotenje celičnega preživetja z MTS testom	26
3.2.1.2 Merjenje aktivnosti kaspaz	28
3.2.2 Pretočna citometrija	30

3.2.2.1 Določitev deleža apoptotičnih celic	30
3.2.2.2 Merjenje mitohondrijskega transmembranskega potenciala.....	31
3.2.2.3 Merjenje količine znotrajcelično nastalih reaktivnih kisikovih spojin	32
3.2.3 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS PAGE).....	33
3.2.4 Prenos western	36
3.2.5 Statistično vrednotenje rezultatov	38
4 REZULTATI.....	39
4.1 VREDNOTENJE CITOTOKSIČNOSTI ApLAO IN CgLAO NA CELIČNIH KULTURAH JURKAT IN MCF7.....	39
4.1.1 Celice tretirane z ApLAO in CgLAO izkazujejo koncentracijsko-odvisno citotoksičnost	39
4.1.2 Celice tretirane z ApLAO in CgLAO izkazujejo časovno-odvisno citotoksičnost.....	40
4.2 VREDNOTENJE APOPTOZE CELIC, TRETIRANIH Z ApLAO IN CgLAO	41
4.2.1 ApLAO in CgLAO sprožita apoptozo	41
4.2.2 ApLAO in CgLAO sprožita apoptozo, posredovano s H ₂ O ₂	42
4.3 OPREDELITEV MEHANIZMA APOPTOZE, POVZROČENE Z ApLAO IN CgLAO....	43
4.3.1 Vrednotenje kaspazno odvisne apoptoze s kaspaznim inhibitorjem z-VAD-fmk	44
4.3.2 Vrednotenje aktivnosti kaspaz-3, -8 in -9	46
4.4 ApLAO IN CgLAO SPROŽITA INTRINZIČNO POT APOPTOZE.....	48
4.4.1 Vrednotenje mitohondrijskega transmembranskega potenciala (MTP).....	48
4.4.2 Vpliv ApLAO in CgLAO na izražanje proteinskega nivoja apoptotičnih signalnih molekul	50
5 RAZPRAVA	53
6 SKLEP.....	57
7 LITERATURA.....	58

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema sprožitve poti, ki vodijo v apoptozo (3).....	2
Slika 2: Shema ekstrinzične signalne poti apoptoze (10).....	4
Slika 3: Intrinzična signalna pot apoptoze (3).....	5
Slika 4: Shematki prikaz povezave ekstrinzične in intrinzične poti apoptoze preko Bid (4).....	6
Slika 5: Shema reakcije, ki jo katalizirajo LAO (12).....	8
Slika 6: Zelena mušnica (<i>Amanita phalloides</i>) (26).....	12
Slika 7: Pozna livka (<i>Clitocybe geotropa</i>) (26).....	12
Slika 8: Strukturna formula MTS soli in njenega derivata formazana (32).....	26
Slika 9: Shema pretočnega citometra (38).....	30
Slika 10: Shematski prikaz sistema za elektroforezo (47).....	34
Slika 11: Sestava aparature za prenos western.....	36
Slika 12: Prikaz NaDS PAGE (a), prenosa western (b) in detekcije proteinov (c) (48, 49).....	38
Slika 13: Učinki ApLAO (a) in CgLAO (b) na preživetje Jurkat in MCF7 celic.....	39
Slika 14: Učinki ApLAO (a) in CgLAO (b) na preživetje Jurkat in MCF7 celice v odvisnosti od časa.....	40
Slika 15: ApLAO (a) in CgLAO (b) sprožita apoptozo na celični kulturi Jurkat.....	42
Slika 16: ApLAO (a) in CgLAO (b) povzročita povišano nastajanje ROS.....	43
Slika 17: Delež celičnega preživetja celic Jurkat (a) in MCF7 (b) tretiranih z ApLAO in CgLAO v prisotnosti in odsotnosti inhibitorja z-VAD-fmk.....	44
Slika 18: ApLAO in CgLAO sprožita od kaspaz odvisno pot apoptoze.....	45
Slika 19: Časovna odvisnost aktivnosti kaspaze-3 na celicah Jurkat, tretiranih z ApLAO in CgLAO.....	47
Slika 20: Relativna aktivnost kaspaze-8 in kaspaze-9 v Jurkat celicah, tretiranih z ApLAO in CgLAO.....	48
Slika 21: Padec MTP ($\Delta\psi_m$) v odvisnosti od časa tretiranja Jurkat celic z ApLAO in CgLAO.....	49
Slika 22: Proteinski nivo izražanja signalnih proteinov Bax in Bcl-2 v odvisnosti od časa tretiranja Jurkat celic z ApLAO.....	51
Slika 23: Proteinski nivo izražanja signalnih proteinov Bax in Bcl-2 v odvisnosti od časa tretiranja Jurkat celic s CgLAO.....	52

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Seznam uporabljenih reagentov in topil z navedenim proizvajalcem.....	15
Preglednica II: Seznam uporabljenih standardov, z navedenim proizvajalcem.	17
Preglednica III: Seznam uporabljenih primarnih in sekundarnih protiteles z navedenim proizvajalcem.	17
Preglednica IV: Seznam uporabljene laboratorijske opreme z navedenim proizvajalcem.	18
Preglednica V: Uporabljeni pufri in njihova sestava.....	20
Preglednica VI: Uporabljena gojišča in njihova sestava.	22
Preglednica VII: Sestava separacijskega in koncentracijskega gela za izvedbo NaDS PAGE.....	35

KAZALO ENAČB

<i>Enačba 1</i>	25
<i>Enačba 2</i>	27

POVZETEK

Mnoge novejšje raziskave so pokazale, da so induktorji apoptoze lahko kot terapevtiki uporabni pri zdravljenju raka. Mednje sodijo L-aminooksidazni encimi (LAO), flavoencimi, ki katalizirajo reakcijo nastanka H_2O_2 . Slednjega uvrščamo med reaktivne kisikove zvrsti (ROS), ki v organizmu povzročajo stanje t.i. oksidativnega stresa. Oksidativni stres je eden izmed dražljajev, ki povzroči poškodbe DNK in motnje delovanja mitohondrijev, kar posledično sproži proces apoptoze. Vendar mehanizmi, ki jih LAO sprožijo, še vedno niso vsi natančno poznani. Najobširneje so proučili LAO, izolirane iz različnih kačjih strupov; slednje povzročijo vrsto bioloških in farmakoloških učinkov, med drugim sprožijo apoptozo in ovirajo procese proliferacije rakavih celic. Vendar so LAO iz kačjih strupov temperaturno neobstoje, zato se pozornost usmerja na LAO mikrobnega izvora. Nedavne raziskave so pokazale, da LAO izolirane iz nekaterih vrst gob, izkazujejo protitumorne učinke na različnih sesalskih, tudi človeških celičnih kulturah.

V magistrski nalogi smo proučili toksične učinke toksogeina, izoliranega iz gobe pozne livke (*Clitocybe geotropa*) (CgLAO) v primerjavi z učinki toksofalina, izoliranega iz zelene mušnice (*Amanita phalloides*) (ApLAO), na človeških tumorskih celičnih kulturah Jurkat in MCF7. Ugotovili smo, da L-aminokislinski oksidazi delujeta toksično na celični kulturi Jurkat in MCF7, vendar je citotoksični učinek bolj izrazit pri Jurkat celicah. Jakost toksičnega delovanja toksofalina (ApLAO) in toksogeina (CgLAO) je odvisna tako od koncentracije kot tudi od časa tretiranja celic z oksidazama, pri čemer je višjo citotoksičnost pokazal toksofalin. V magistrski nalogi smo pokazali, da sta toksofalin in toksogein sprožila od kaspaz odvisno intrinzično signalno pot apoptoze, ki povzroči motnje v delovanju mitohondrijev; povišalo se je nastajanje znotrajceličnih ROS, pri čemer se je posledično depolarizirala mitohondrijska membrana. Slednje se je pokazalo z zmanjšanjem mitohondrijskega potenciala in povečalo se je razmerje proapoptotičnih in antiapoptotičnih proteinov, natančneje razmerje Bax/Bcl-2 proteinov. Pri tem se je posledično aktivirala kaspaza-9 ter nato kaspaza-3, ki je izvršila proces apoptoze. Pri magistrskem delu smo ugotovili tudi zvišano aktivnost kaspaze-8, ki nakazuje udeležnost ekstrinzične poti aktivacije celične smrti, povzročene s tretiranjem z ApLAO in CgLAO. V magistrski nalogi smo tako potrdili, da lahko ApLAO in CgLAO izkazujejo podobno citotoksično delovanje na celicah tumorskega izvora in preko intrinzične poti sprožita proces apoptoze. Proučevani L-aminooksidazi lahko uvrstimo med možne induktorje apoptoze ter v potencialne zdravilne učinkovine v razvoju novih učinkovitejših protitumorih terapij.

ABSTRACT

Many recent studies have shown that inducers of apoptosis may be useful as therapeutics in the treatment of cancer. These include L-amino acid oxidase enzymes (LAO), flavoenzymes, that catalyze the oxidative deamination of L-amino acids along with the production of H₂O₂. H₂O₂ belongs to a group of molecules and free radicals named reactive oxygen species (ROS) and causes in the organism a state called oxidative stress. The latter is one of the stimuli that causes DNA damage and altered mitochondrial functions, which in turn triggers the process of apoptosis. However, the mechanisms of cell death triggered by LAO, remains poorly understood. Extensively examined are LAOs isolated from various snake venoms which cause a variety of biological and pharmacological effects, that include inducing apoptosis and inhibiting the processes of proliferation of cancer cells. However, the LAOs from snake venoms are termolabile proteins and therefore the increasing attention is drawn towards the LAOs of microbial origin. Recent studies have shown that LAOs, isolated from certain types of fungi exhibit antitumor effects in different mammalian, including human cell lines.

The purpose of the study was to examine and evaluate the toxic effects of toxogein, isolated from fungi *Clitocybe geotropa* (CgLAO) compared the effects of toxophallin, isolated from *Amanita phalloides* (ApLAO) on human tumor cell cultures Jurkat and MCF7. We have found that both L-amino acid oxidases exhibited cytotoxic effects to the cell cultures Jurkat and MCF7, with more pronounced cytotoxic effect on Jurkat cells. The potency of cytotoxic effects of toxophallin (ApLAO) and toxogein (CgLAO) are both, concentration- and time-dependant, with higher toxophallin cytotoxicity. In this master thesis we have shown that toxophallin and toxogein trigger caspase-dependent intrinsic signaling pathway of apoptosis, which resulted in malfunctioning of mitochondria; the formation of intracellular ROS increased, whereby consequently the mitochondrial membrane was depolarized. That was shown by the decrease of mitochondrial transmembrane potential and increased ratio of proapoptotic and antiapoptotic proteins, specifically the ratio of Bax/Bcl-2 proteins. Consequently caspase-9 and caspase-3 were activated and the process of apoptosis was induced. In this research, we also observed increased activity of caspase-8, indicating the involvement of extrinsic pathway activation of cell death caused by treatment with ApLAO and CgLAO. In our study, we therefore confirmed that ApLAO and CgLAO exhibit similar cytotoxic effects on tumor cell cultures and initiate the process of apoptosis via the intrinsic pathway. We can classify the two examined L-amino acid oksidases as potential inducers of apoptosis in the development of new and more effective anti-cancer therapies.

KLJUČNE BESEDE

KEYWORDS

ApLAO, L-aminokislinska oksidaza (LAO), izolirana iz gobe zelene mušnice	»ang. <i>Amanita phalloides</i> L-amino acid oxidase«
CgLAO, L-aminokislinska oksidaza (LAO), izolirana iz gobe pozne livke	»ang. <i>Clitocybe geotropa</i> L-amino acid oxidase«
Apoptoza	»ang. apoptosis«
Kaspazna kaskada	»ang. caspase cascade«
Rak	»ang. cancer«

SEZNAM OKRAJŠAV

Ac-DEVD-AFC	»ang. N-Acetyl-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-trifluoromethylcoumarin«, N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-trifluorometilkumarin
Ac-LEHD-AFC	»ang. N-Acetyl-leu-Glu-His-Asp-7-amido-4-trifluoromethylcoumarin«, N-acetil-Leu-Glu-His-Asp-7-amido-4-trifluorometilkumarin
Ac-IETD-AFC	»ang. N-Acetyl-Ileu-Glu-Thr-Asp-7-amido-4-trifluoromethylcoumarin«, N-Acetyl-Ileu-Glu-Thr-Asp-7-amido-4-trifluorometilkumarin
ApLAO	L-aminokislinska oksidaza (LAO), izolirana iz gobe <i>A. phalloides</i>
Bcl-2	»ang. B-cell lymphoma protein 2«, protein 2B-celičnega limfoma
BSA	»ang. Bovine Serum Albumin«, goveji serumski albumin
CgLAO	L-aminokislinska oksidaza (LAO), izolirana iz gobe <i>C. geotropa</i>
CD8+	citotoksični T-limfociti, celice »ubijalke«
DMEM	»ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium«, gojišče za celične kulture
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	»ang. deoxyribonucleic acid«, deoksi-ribonukleinska kislina
DR	»ang. death receptor«, receptor smrti
DTT	ditiotreitol
EDTA	»ang. ethylenediaminetetraacetic acid«, etilendiaminotetraocetna kislina
EGF	»ang. epidermal growth factor«, epidermalni rastni dejavnik
ERK	»ang. extracellular signal-regulated protein kinase«, z zunajceličnim signalom regulirana proteinska kinaza
FADD	»ang. Fas-associated death domain«, s Fas povezana domena smrti
FBS	»ang. fetal bovine serum«, fetalni goveji serum
H ₂ DCF-DA	»ang. 2'7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate«, 2'7'-diklorodihidrofluorescein diacetat
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
HRP	»ang. horseradish peroxidase«, encim hrenova peroksidaza
JNK	c-Jun N-terminalna kinaza
LAF	»ang. laminar air flow«, laminarni pretok zraka

LAO	L-aminokislinska oksidaza
MAPK	»ang. mitogen-activated protein kinase«, z mitogenom aktivirana proteinske kinaze
MTP	mitohondrijski transmembranski potencial
MTS	»ang. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium«, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol
NFkB	»ang. nuclear factor kappa B«, jedrni faktor kapa B
NaDS	natrijev dodecilsulfat
PAGE	»ang. polyacrylamide gel electrophoresis«, poliakrilamidna gelska elektroforeza
PBS	»ang. phosphate buffered saline«, fosfatni pufer z NaCl
PI	»ang. propidium iodide«, propidijev jodid
RPMI 1640	»ang. Roswell Park Memorial Institute medium«
TBS	»ang. Tris-buffered salne«, Tris pufer
TTBS	Tris pufer z dodanim Tween 20
TEMED	»ang. tetramethylethylenediamine«, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
z-VAD-fmk	»ang. benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (O-methyl)-fluoromethylketone«, karbobenzoksil-Val-Ala-Asp (O-metil)-fluorometilketon

1 UVOD

1.1 APOPTOZA

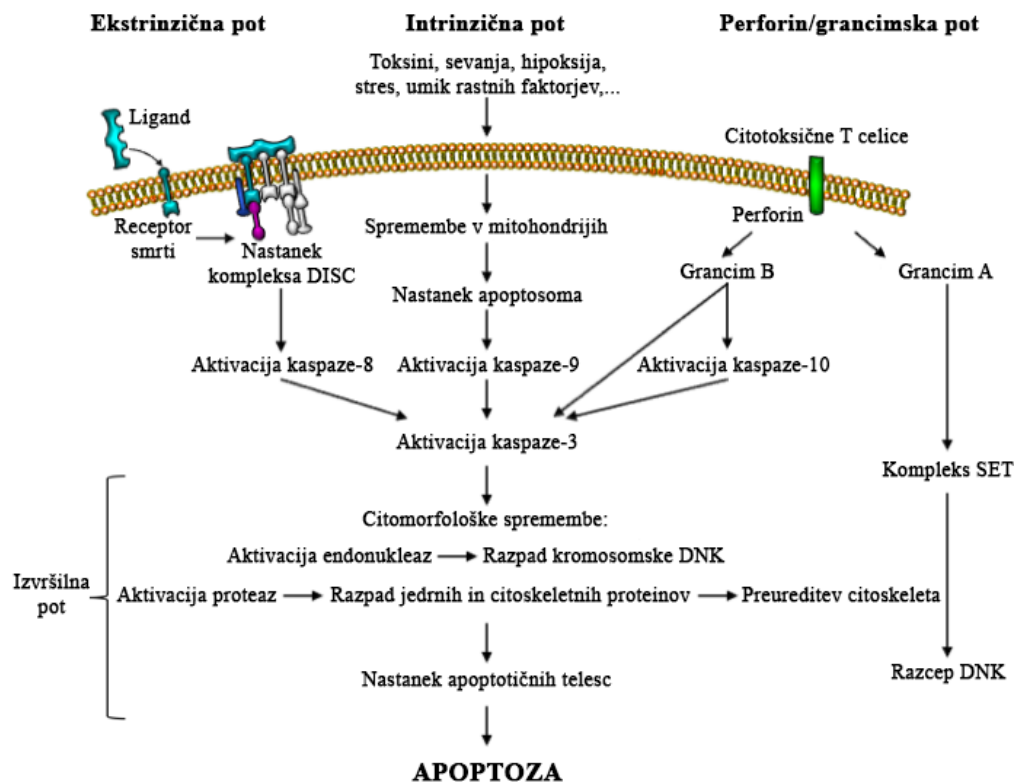
Celična smrt označuje proces odmiranja na celičnem nivoju. Razvrstimo jo v različne vrste, ki jih lahko določimo na podlagi morfoloških lastnosti, encimoloških meril (z in brez sodelovanja nukleaz ali prepopoznavnih razredov proteaz, kot so kaspaze, kalpaini, transglutaminaze), funkcionalnih vidikov (programirana/naključna ali fiziološka/patološka) in imunoloških značilnosti (imunogena, neimunogena celična smrt) (1). V zadnjem času želimo določiti tip celične smrti tudi glede na biokemijska merila, kot so podrobnosti in značilnosti na molekularnem nivoju, ker na podlagi morfoloških lastnosti ne moremo natančno opredeliti in ločiti med spečim stanjem celice in celično smrtjo (2). Kljub temu je še vedno najbolj uveljavljena delitev celične smrti glede na morfologijo celic, pri čemer ločimo apoptozo, nekrozo, avtofagocitozo in t.i. mitotično katastrofo («ang. mitotic catastrophe») (1).

Apoptoza, oziroma programirana celična smrt, je strogo nadzorovan in urejen fiziološki proces, ki ima ključno vlogo pri kontroli rasti, razvoju in uravnavanju homeostaze višjih organizmov. Udeležena je pri uravnavanju imunskega sistema, hormonsko odvisne atrofije, embriogenezi in odstranjevanju kemično poškodovanih celic (3). Označujejo jo apoptotične celice z značilnimi morfološkimi in biokemičnimi spremembami, kot so izguba stika z okoliškimi celicami, krčenje celice, zgoščevanje citoplazme, nabrekanje plazemske membrane («ang. blebbing»), kondenzacija kromatina, razpad jedrne DNK, prečno povezovanje proteinov in nastanek apoptotičnih telesc, ki vsebujejo citoplazmo z ali brez jedrnih fragmentov (2,4). Nasprotno je nekroza večinoma naključna, nenadzorovana celična smrt, pri kateri celice značilno nabreknejo, celična membrana se poškoduje in prekine, iz celice se sprosti citoplazma, ponavadi je pridruženo vnetje v okoliškem tkivu (1,2). Oba procesa sta lahko medsebojno neodvisna in se lahko sprožita zaporedno ali sočasno (3).

Potek apoptoznih poti usmerja in določa vrsta sprožilnih dejavnikov, vendar nemalokrat mehanizem ni točno definiran. Ireverzibilna poškodba DNK in drugih pomembnih molekul je najpogostejši sprožilni dogodek, ki spodbudi celični odziv na stres. Signalne molekule povzročijo celični stres in širijo signal za sprožitev apoptoze. Mednje uvrščamo c-Jun N-terminalno kinazo (JNK), proteinske kinaze MAPK («ang. mitogen-activated protein

kinase») in ERK (»ang. extracellular signal-regulated protein kinase«), jedrni faktor kapa B (NF- κ B) ter ceramid (4). V kaspazno odvisni apoptozi imajo pri uravnavanju in izvršitvi celične smrti osrednjo vlogo endoproteaze kaspaze. Z aktivacijo le-teh se sproži vrsta zaporednih proteoliznih reakcij, ki vodijo v celično smrt (2).

Kaspaze so aspartatne proteaze, ki v prisotnosti katalizatorja cisteina cepijo peptidne vezi. V organizmu so prisotne v obliki proencimov (cimogenov); neaktivnih monomernih prokaspaz. Razdelimo jih v več skupin. V glavni dve spadajo sprožilne kaspaze, ki apoptozne procese spodbudijo (kaspaze-2, -8, -9 in -10) ter izvršilne kaspaze, ki apoptozo izvršijo (kaspaze-3, -6 in -7); poznamo pa še vnetne (kaspaze-1, -4, -5 in -12) in druge. V apoptozni kaskadi sprožilne kaspaze, ki so se zaradi specifične avtokatalitične afinitete do lastnega peptidnega zaporedja sposobne same aktivirati, aktivirajo izvršilne kaspaze, kar vodi v proces apoptoze (6). Pri tem pa aktivacija kaspazne poti lahko poteka po ekstrinzični oz. receptorski poti preko t.i receptorjev smrti DR (»ang. death receptor«) in nastanka kompleksa DISC (»ang. death-inducing signalling complex«) bodisi po intrinzični oz. mitohondrijski poti preko mitohondrijskih sprememb in nastanka apoptosoma, kot prikazuje Slika 1 (4).



Slika 1: Shema sprožitve poti, ki vodijo v apoptozo (3).

Poleg že omenjenih dveh poti apoptoze danes poznamo tudi perforin-grancimsko pot. Pri slednji gre za imunski odziv organizma na rakave ali z virusi okužene celice, ki se odstranijo preko posredovanja citotoksičnih CD8⁺ celic ubijalk. Citotoksični T-limfociti namreč izločajo perforin, ki se vgradi v membrano, kjer tvori poro, skozi pa prehajajo v tarčno celico citoplazmatske granule, ki vsebujejo serinski proteazi, grancim A in B. Grancim B sproži od kaspaz odvisno apoptozo celic, grancim A pa od kaspaz neodvisno (3).

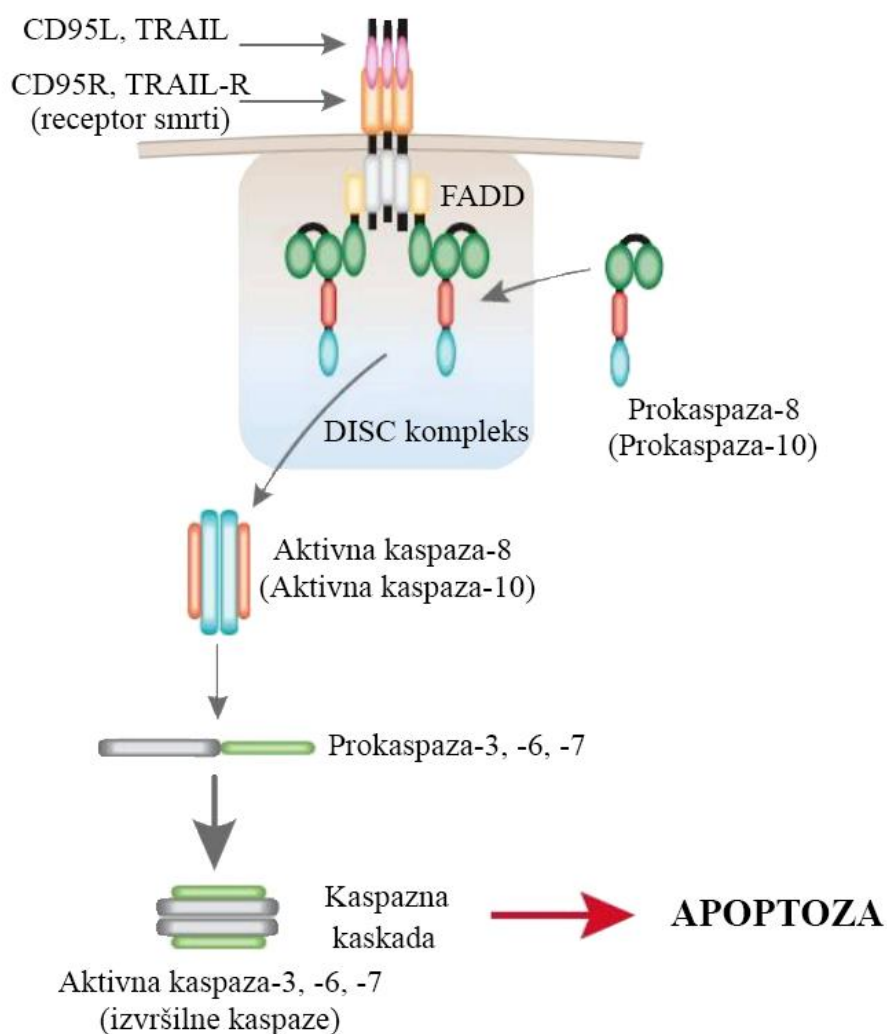
V končnem delu procesa programirane celične smrti, ki se sproži po zgoraj omenjenih treh poteh, se aktivira izvršilna kaspaza-3. Slednja z aktivacijo citoplazemskih endonukleaz in proteaz povzroči citomorfološke in biokemične spremembe, kot so fragmentacija DNK, kondenzacija kromatina, razpad jedrnih in citoskeletnih proteinov ter preureditev citoskeleta. Te spremembe vodijo v tvorbo z membrano obdanih delcev s celičnimi komponentami, kar imenujemo apoptotična telesca, ki so odstranjena v procesu fagocitoze s pomočjo makrofagov. Tako odmrle celice ne morejo škodovati okoliškim celicam in ne pride do vnetnih procesov (6).

Smrt celice lahko nastopi tudi samostojno in brez predhodne aktivacije kaspaz; po kaspazno-neodvisnih poteh apoptoze. Tudi te se aktivirajo ob prisotnosti citotoksičnih dejavnikov in signalov za celično smrt. Kaspazno neodvisne poti imajo pomembno vlogo v obrambi organizma pred nezaželenimi, potencialno nevarnimi celicami, ko kaspazno odvisne odpovejo. V procesu celične smrti tako lahko sodelujejo tudi druge proteaze, kot so katepsini (papainu podobne lizosomske proteaze), kalpain (od kalcija odvisna cisteinska proteaza) in serinske proteaze (tripsinu podobna proteaza Omi/HtrA2, kimotriptična apoptotična proteaza AP24) (5).

1.1.1 Ekstrinzična signalna pot apoptoze

Ekstrinzično oz. receptorsko signalno pot apoptoze sproži vezava ligandov na specifične transmembranske receptorje s skupnim imenom receptorji smrti (DR). To je poddružina receptorjev dejavnika tumorske nekroze (TNF/NGF), ki jo zajema skupina več kot 20 proteinov (CD95 (APO-1/FasR), TNFR 1, TRAIL-R1, TRAIL-R2, DR3, idr.) in sodelujejo v mnogih bioloških procesih: pri regulaciji apoptoze, uravnavanju celičnega preživetja, celični diferenciaciji in uravnavanju imunskega odziva. Receptorji smrti imajo poleg zunajceličnih domen tudi značilne citoplazemske domene, ki jih sestavlja okoli 80 do 100

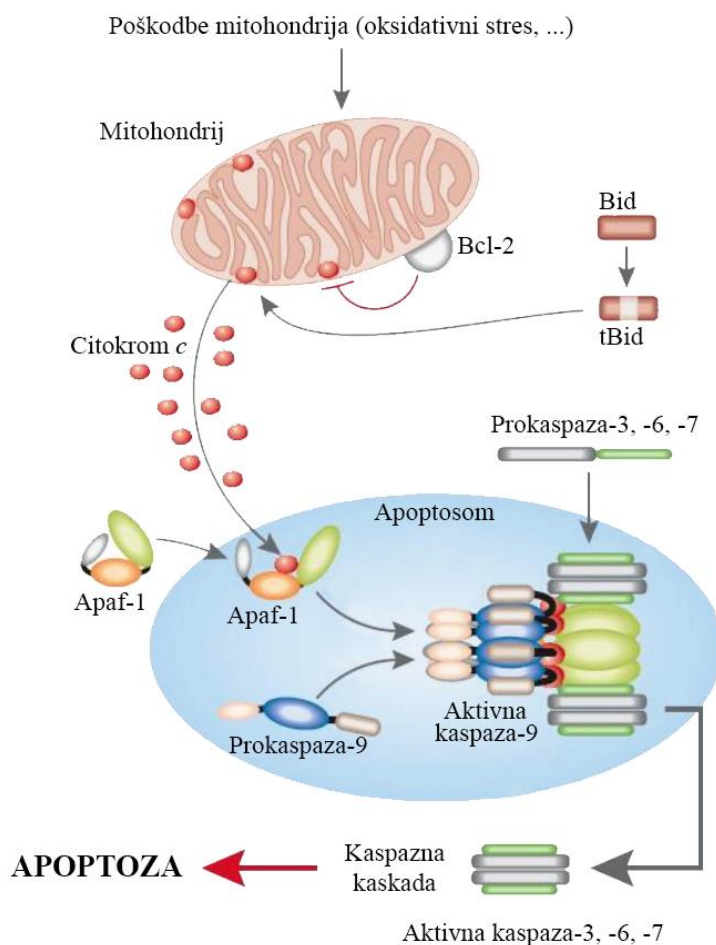
aminokislin (3). Te, t.i. domene smrti (»ang. death domain«, DD), prenašajo signale za celično smrt s površine celice v notranjost. Ob vezavi ligandov, kot sta TNF in Fas ligand, na ustrezen receptor smrti, se prenesejo citoplazemske adapterske molekule, kot je FADD (»ang. Fas-associated death domain«) in združijo z znotrajceličnimi domenami receptorjev. S konformacijskimi spremembami in dimerizacijo efektorske smrtne domene (»ang. death effector domain«, DED) se FADD veže s prokaspazo-8 in nastane kompleks DISC, ki naprej posreduje signal za apoptozo, s katerim se sproži kaskada kaspaznih reakcij. Prokaspaza-8 se avtokatalizira in aktivira v kaspazo-8, ta pa v nadaljevanju aktivira kaspazo-3, ki izvrši dokončni proces apoptoze, kot je prikazano v shemi na Sliki 2 (7).



Slika 2: Shema ekstrinzične signalne poti apoptoze (10).

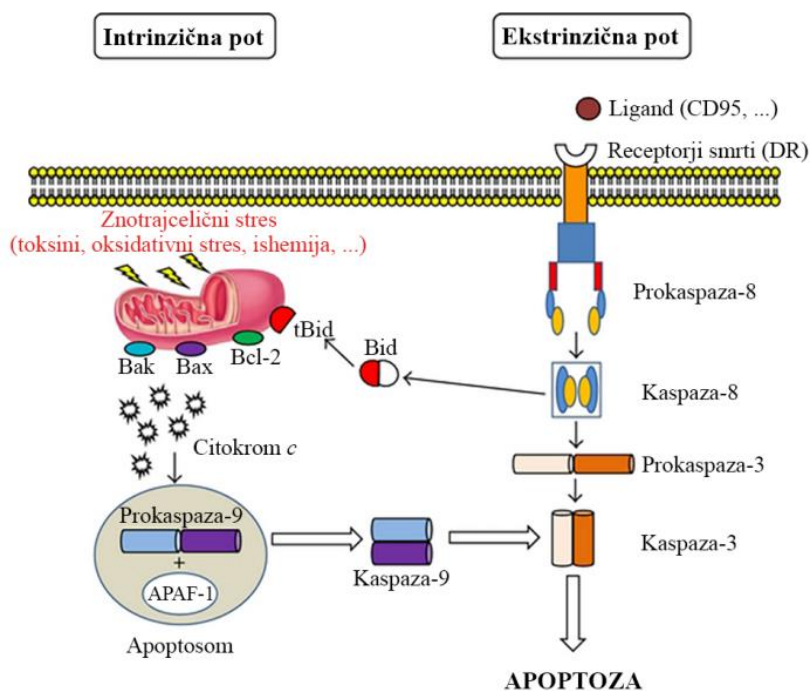
1.1.2 Intrinzična signalna pot apoptoze

Intrinzično oz. mitohondrijsko pot apoptoze lahko sproži vrsta stresnih dražljajev, ki lahko neodvisno od receptorjev, aktivirajo signale za celično smrt. Glede na izvor jih ločimo v dve skupini: notranje dražljaje, kot so pomanjkanje specifičnih rastnih dejavnikov, hormonov ali citokinov in zunanje dražljaje, kot so toksini, sevanje, radikali, virusne infekcije ali hipoksija (3). Vsi ti dražljaji aktivirajo znotrajcelične signale smrti, ki povzročijo mitohondrijske spremembe. Zniža se mitohondrijski transmembranski potencial (MTP), iz membranskega prostora pa se v citosol sprostita glavni dve skupini proapoptotičnih proteinov. V prvo skupino uvrščamo proteine, ki aktivirajo od kaspaz odvisno intrinzično pot (Smac/DIABLO, serinska proteaza ter citokrom *c*). Citokrom *c* se veže s proteinom Apaf-1 (»ang. apoptotic protease activating factor 1) in prokaspazo-9 ter tvori apoptosom. Kompleks aktivira prokaspazo-9, s tem se izvrši kaskada reakcij aktivacije kaspaz, ki vodi v apoptozo kot prikazuje Slika 3 (4).



Slika 3: *Intrinzična signalna pot apoptoze (3).*

Osrednji regulatorji intrinzične poti apoptoze so proteini družine B-celičnega limfoma 2 (Bcl-2), ki jih nadzira tumorsupresorski protein p53. Bcl-2 proteini se nahajajo na zunanji membrani mitohondrija in sodelujejo pri uravnavanju permeabilnosti membrane. Ob signalih za apoptozo vplivajo na padec mitohondrijskega transmembranskega potenciala in sproščanje citokroma *c*. Za Bcl-2 proteine je značilna vsaj ena Bcl-2 homologna (BH) domena. Glede na delovanje jih ločimo v dve funkcionalni skupini. V prvo uvrščamo anti-apoptotične proteine, kot so Bcl-2, Bcl-x, Bcl-xl in BAG. Druga skupina so pro-apoptotični proteini, kamor spadajo Bax, Bak, Bcl-10, Bad, Bik, Bid, Bim, Noxa in Puma. Slednji sprožijo signale za apoptozo s prekinitvijo celovitosti membrane direktno s tvorjenjem por ali z vezavo na proteine v mitohondrijskih kanalih. Posledično se iz mitohondrija sprostijo proteini (citokrom *c*, APAF-1, DIABLO, i.dr.), ki sprožijo celično smrt po od kaspaz odvisni in neodvisni poti. Razmerje med pro- in anti-apoptotičnimi proteini tako dokončno določi bodisi celično smrt bodisi njeno preživetje, zato je nivo izražanja proteinov Bcl-2 družine ključnega pomena (8). Ekstrinzična in intrinzična pot nista popolnoma neodvisni in ločeni ena od druge. Preko ekstrinzične poti aktivirana kaspaze-8 lahko aktivira protein Bid (pripadnik Bcl-2 družine). Ta se preko domene BH3 translocira na mitohondrij in sproži intrinzično pot (4). Povezavo obeh poti prikazuje Slika 4 (4).



Slika 4: Shematki prikaz povezave ekstrinzične in intrinzične poti apoptoze preko Bid (4).

Kot že omenjeno, je apoptoza fiziološki proces, ki ima ključno vlogo pri kontroli rasti, razvoju in uravnavanju homeostaze višjih organizmov. Nepravilnosti v delovanju apoptoze in porušenem ravnovesju med celično proliferacijo in celično smrtjo vodijo v mnoga patološka stanja kot so: razvojne napake, avtoimune bolezni, nevrodegenerativne bolezni in rakava obolenja (10). Poznavanje fiziološke apoptoze in apoptoznih procesov v rakavih celicah ter odzivov rakavih celic na protitumorne učinkovine omogoča načrtovanje novih, učinkovitejših terapij v boju proti raku (10).

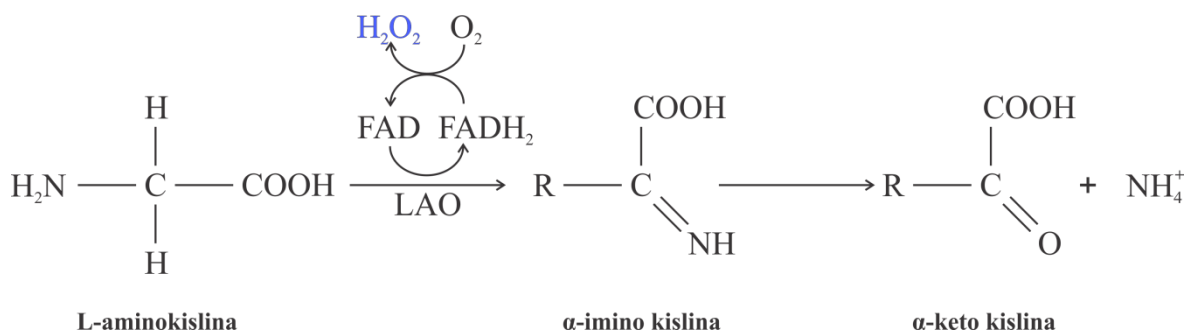
Mnoge novejšje raziskave so pokazale, da nosijo v boju proti kancerogenim procesom terapevtsko uporabnost induktorji apoptoze. Mednje sodijo tudi L-aminokislinske oksidaze (LAO), ki delujejo kot induktorji apoptoze, kar so potrdili na različnih celičnih linijah in so zaradi slednjega možne učinkovine v protirakavih terapijah (11,12).

1.2 L-AMINOKISLINSKE OKSIDAZE (LAO)

1.2.1 Predstavitev in vloga

LAO so encimi, razširjeni v mnogih vrstah organizmov v naravi. Najdemo jih v številnih kačjih strupih, insektih, bakterijah, glivah, algah, školjkah, ribah, polžih in sesalcih (12). Čeprav LAO večinoma sodelujejo v celičnem aminokislinskem katabolizmu, imajo tudi številne druge fiziološke funkcije, kot je antibakterijsko delovanje in varovanje organizma pred infekcijami. Povezujejo jih tudi z nastajanjem penicilina, sintezo violaceina in razvojem biofilma. Zaradi svoje stereospecifičnosti so praktične v biokemijskih in kemijskih raziskavah kot biosenzorji za določitev posameznih L-aminokislin in priprave D-izomerov. Ker so jih izolirali tudi v fizioloških tekočinah pri pacientih z določenimi boleznimi in motnjami, so uporabne kot biomarkerji. LAO, izolirane iz kačjih strupov, v veliki meri raziskujejo zaradi sposobnosti sprožitve apoptoze, agregacije trombocitov, povzročitve krvavitev in edemov (13).

L-aminokislinske oksidaze, znane tudi kot L-aminooksidaze (EC 1.4.3.2), so enantioselektivni flavoproteini, ki stereospecifično katalizirajo oksidativno deaminacijo L-aminokislina, preko iminokislinskega intermediata, ki se hidrolizira v ustrezno keto kislino, vodikov peroksid (H_2O_2) in amoniak (NH_3), kot prikazuje Slika 5 (12).



Slika 5: Shema reakcije, ki jo katalizirajo LAO (12).

Z biokemično karakterizacijo so z vidika substratne specifičnosti ugotovili obsežno raznolikost tako med vrstami kot znotraj posameznih vrst. LAO prednostno delujejo na bazične, aromatske in alifatične L-aminokisliline. Encimi kačjega izvora kažejo široko oksidoreduktivno aktivnost proti aromatskim hidrofobnim L-aminokislilinam, kot so levcin, fenilalanin in izolevcin (13).

LAO kot biološko aktivni encimi katalizirajo reakcijo, pri kateri nastaja H_2O_2 , ki ga uvrščamo med reaktivne kisikove zvrsti (ROS). ROS sicer nastajajo v fizioloških procesih; znotrajcelično v procesu mitohondrijske dihalne verige. Povišano nastajanje ROS v organizmu povzroči stanje t.i. oksidativnega stresa. Slednji je eden izmed dražljajev, ki povzroči poškodbe DNK in spremembe v mitohondrijski membrani ter s posledično sprostitvijo citokroma *c* izzove signale za izvajitev intrinzične poti apoptoze (9). Vendar nekatere L-aminokislinske oksidaze (LAO) lahko sprožijo apoptozo tudi preko ekstrinzične poti z vezavno na receptorje smrti (10, 11).

Zaradi zgornjih ugotovitev so raziskave mehanizma delovanja živalskih strupov pomemben korak k razumevanju njihovega delovanja in potencialne uporabe kot protitumornih antiproliferativnih učinkovin. Najpodrobneje so v zadnjem desetletju proučevali mehanizmem LAO iz različnih kačjih strupov. Manj raziskane so LAO, izolirane iz mikrobov ter rastlinskih in drugih živalskih virov (14).

1.2.2 Mehanizem delovanja LAO

Kot že zgoraj omenjeno, LAO katalizirajo stereospecifično oksidoreduktazno reakcijo, pri kateri nastaja H_2O_2 (12). Vodikov peroksid kot predstavnik ROS sproži oksidativni stres in poškodbe DNK, ki z značilnimi biokemijskimi in citološkimi spremembami vodijo v apoptozo. Povečano nastajanje ROS povzroči večjo prepustnost mitohondrijev in porušenje mitohondrijske redoks homeostaze. Slednje povzroči spremembe v mitohondrijskem transmembranskem potencialu, v citosol se sprosti citokrom *c*, ki s proteinom Apaf-1 in kaspazo-9 aktivira kaspazo-3 ter sproži intrinzično oz. mitohondrijsko pot apoptoze. Slednje regulirajo anti- in pro-apoptotični proteini družine Bcl-2 proteinov. Apoptotični signali sprožijo translokacijo Bax ali Bak na mitohondrijsko zunanjo membrano, kjer lahko tvorita heterooligomere z Bcl-2 oziroma Bcl-xL; v tem primeru se preprečijo signali za apoptozo. Če pa tvorita pro-apoptotična Bax ali Bak homooligomere, se sprožijo signali za apoptozo (15, 16).

Proces apoptoze lahko nastopi tudi z aktivacijo preko Fas/APO-1 receptorjev, pri čemer vezava LAO na receptorje smrti (CD95) pošlje signal za celično smrt. Pri tem se sproži ekstrinzična pot apoptoze, kar vodi v aktivacijo sprožilne kaspaze-8, ki nadalje aktivira izvršilno kaspazo-3. LAO lahko delujejo apoptotično z vplivanjem na transport kalcija v citoplazmo, povečanjem aktivnosti citosolnih nevtralnih proteaz ali preko vezave na DNK (kot dimer myc-max proteinov), z izražanjem genov za proteine Bcl-2 družine (18,19), vendar točen mehanizem do dandanes ni popolnoma razjasnjen (17).

1.2.3 LAO iz kačjega strupa

LAO, biološko aktivni proteini, so prisotni v kačjem strupu različnih rodov in vrst kač. Izkazujejo raznovrstne biološke in farmakološke učinke, kot je sprožitev apoptoze, citotoksičnost, inhibicija in sprožitev agregacije trombocitov, krvavitve, hemoliza, edem, kot tudi mikrobicidno, antiparazitično in anti-HIV delovanje (14).

Do sedaj znane in izolirane LAO kačjega izvora so v splošnem flavoproteini z molekulsko maso med 120 in 150 kDa v nativni obliki, v monomernih oblikah pa se masa spreminja med 50 in 70 kDa. Večinoma so hkrati tudi glikoproteini z vezanimi karbohidrati (3-4 %). Glikozilacija ima pomembno vlogo pri izločanju in topnosti proteina ter njegovem sidranju na celično površino. LAO kačjega izvora imajo homodimerno strukturo, vsaka podenota

vsebuje tri domene: domeno za vezavo substrata, spiralno domeno in FAD vezavno domeno, na katero je pogosteje nekovalentno vezana 1 molekula, lahko pa tudi 2 molekuli FAD. Flavini dajejo kačjemu strupu značilno rumeno barvo. Kot kofaktorji posledično prispevajo k toksičnosti zaradi oksidativnega stresa, ki se sproži zaradi nastajanja H_2O_2 . Ta nastane ob sterespecifični oksidoreduktazni reakciji, ki jo katalizirajo LAO. LAO kačjega izvora so večinoma termolabilni encimi, najbolj obstojni v nevtralnem pufru pri temperaturi $4^{\circ}C$, nekateri tudi na sobni temperaturi. Izoelektrična točka se giblje med 4.4 in 8.12. V kačjem strupu lahko najdemo sočasno kislo, nevtralno in bazično obliko LAO, ki pa lahko izkazujejo različne farmakološke lastnosti (18).

LAO so ena od glavnih komponent kačjega strupa, običajno okoli 10 %, v nekaterih strupih pa se nahaja do 30 % FAD-vsebujoče oksidoreduktaze. Številne raziskave so pokazale, da se sprožijo procesi apoptoze in nekroze kot posledica tvorbe vodikovega peroksida (H_2O_2), ki se kopiči na površini celičnih membran. V splošnem povečano nastajanje ROS povzroča mitohondrijske spremembe, ki sprožijo procese celične smrti (19).

LAO iz kačjih strupov so v mnogih raziskavah izkazale antiproliferativno in protirakavo delovanje na številnih človeških rakavih celičnih linijah: Jurkat (celice T-limfoblastne levkemije), MCF-7 (adenokarcinom dojke), HeLa (celice raka materničnega vratu), K562 (celice kronične mielogene levkemije), HL-60 (celice akutne mieloidne levkemije), EAT (celice Erlichovega ascitesnega tumorja), A549 (celice pljučnega karcinoma), SKBR3 (adenokarcinom dojke), AGS (celice gastričnega adenokarcinoma) ter na makrofagih in monocitih (17). Pokazali so, da LAO izkazujejo selektivno citotoksičnost, kjer so LAO encimi na nekaterih rakavih celičnih linijah izkazovali visoko citotoksičnost in precej nizko citotoksičnost na nekaterih nerakavih celičnih linijah, kar povečuje njihovo vrednost za uporabo v farmaciji kot možnih novih terapevtskih učinkovin (16, 20, 21).

1.2.4 LAO izolirane iz gliv

Čedalje več je raziskav, ki se posvečajo LAO mikrobnega (virusi, bakterije, glive in paraziti) izvora, ki tako kot LAO, izolirani iz kačjih strupov, izkazujejo vrsto bioloških in farmakoloških učinkov (sprožitev apoptoze, mikrobicidne, protivirusne, protiparazitične, idr. učinke). Raziskave navajajo številne potencialne možnosti uporabe LAO mikrobnega izvora v medicinske (npr. v onkologiji kot induktorje apoptoze), biološke in prehrabene namene (13). Hkrati je izražanje LAO kot rekombinantnih proteinov v heterolognih gostiteljih težje izvedljivo, zato novejšje raziskave usmerjajo pozornost na LAO, izolirane iz drugih virov, kot so mikrobi in glive, ker so le-ti lažje dostopni (22).

Tudi za LAO, izolirane iz mikrobov, vključno bakterij in gliv, je značilna velika raznolikost v substratni specifičnosti, molekulski masi in postranslacijskih modifikacijah. Funkcionalne lastnosti LAO se razlikujejo glede na različne tipe LAO, ti so odvisni od izvora. Mesto nahajanja LAO (znotrajcelično, vezane v membrano, zunajcelično) je tako odvisno od izvora kot tudi od ustrezne funkcije. LAO mikrobnega izvora imajo širok substratni spekter, vendar ti FAD-vsebujoči encimi večinoma prednostno katalizirajo v oksidoreduktazni reakciji, pri kateri nastaja H_2O_2 , hidrofobne aminokislinske substrate, kot so fenilalanin, levcin, tirozin in triptofan. Oksidoreduktaze LAO mikrobnega izvora so stabilne pri 25°C do 45°C in manj občutljive na spremembo pH v primerjavi s kačjimi LAO in se inaktivirajo pri nizkih temperaturah (-20 do -30 °C), torej so tudi temperaturno bolj obstojne kot LAO iz kačjih strupov (18, 22).

V zadnjem času se je za številne vrste gob, ki jih skupaj s kvasovkami in plesnimi uvrščamo med glive, izkazalo, da vsebujejo proteine z LAO encimsko aktivnostjo, ki izkazujejo tudi protitumorno, antiproliferativno in imunomodularno delovanje. Lektinu podobni proteini, ki delujejo antiproliferativno na tumorskih celicičnih linijah, so bili izolirani iz gob *Tricholoma mongolicum* in *Agaricus bisporus*. Protein volvarin, ki spada v družino ribosom inaktivirajočih beljakovin tipa I, izoliran iz gobe *Vorvaliella volvacea*, je izkazal antineoplastično delovanje. Strupena goba *Bolenus satanas* Lenz vsebuje lektine bolesatine, ki zavirajo sintezo beljakovin *in vitro* in *in vivo* (22, 23). Med novoizolirane proteine, ki imajo LAO encimsko delovanje in izkazujejo protitumorno delovanje, spadajo: toksofalin iz gobe *Amanita phalloides* (Slika 6), toksovirin iz gobe *Amanita virosa* in toksogein iz gobe *Clitocybe geotropa* (Slika 7) (23-25).



Slika 6: Zelena mušnica (*Amanita phalloides*) (26).



Slika 7: Pozna livka (*Clitocybe geotropa*) (26).

Zelena mušnica (*Amanita phalloides*) je smrtno strupena goba, proizvaja namreč več strupenih snovi. Prvo snov je leta 1937 izoliral Wieland in izkazalo se je, da ima strukturo oligopeptida. V nadaljnjih raziskavah sta Wieland in Faulstich odkrila še druge strupene ciklopeptide, ki so bili razvrščeni v dve strukturni skupini (t.j. amanitine in faloidine) z različnimi mehanizmi toksičnega delovanja. Amanitin zavira mRNA transkripcijo,

falotidin pa veže aktin in zavira funkcije citoskeleta. Ti ciklopeptidi se pogosto uporabljajo kot eksperimentalno orodje znanstvenih študij, ker so njihove znotrajcelične molekularne tarče in mehanizme delovanja podrobno opredelili. Poleg omenjenih strupenih polipeptidov zelena mušnica vsebuje tudi protistrup, ciklodekapeptid antamanid, ki zavira učinke faloidina in strupen polipeptid, falolizin, ki ima hemolitično aktivnost (23).

Zelena mušnica vsebuje tudi novoizolirani citotoksični protein toksofalin z LAO encimsko aktivnostjo. Njegove fizikalno-kemijske in biološke lastnosti se izrazito razlikujejo od drugih znanih strupenih proteinov te gobe. Toksofalin je protein z molekularno maso 55 kDa in izoelektrično točko pri pH 5.7 ter tvori trimerni kompleks v puferni raztopini. Raziskave so pokazale, da povzroča kondenzacijo kromatina ter fragmentacijo DNK in jedra, kar so značilne spremembe procesa apoptoze. Citotoksičnost *in vivo* je povzročil na več celičnih linijah sesalcev: mišjih L1210 in kuninih CCL-64 ter človeških A549, MCF-7, T47D, CEM T4 (23). Podobno delovanje kot toksofalin izkazuje tudi protein toksovirin iz gobe *Amanita virosa*. Raziskave so pokazale, da povzroča tudi kondenzacijo kromatina ter fragmentacijo DNK in jedra, značilne karakteristike apoptoze. Citotoksičnost *in vivo* je povzročil na več celičnih linijah sesalcev: mišjih L1210 ter človeških CEM T4 in Jurkat (24).

Nasprotno je protein toksogein novoizolirani protein, ki so ga pridobili iz gobe pozne livke (*Clitocybe geotropa*), njegovo delovanje pa je še dokaj neraziskano. V preliminarni študiji je protein izkazoval L-aminooksidazno aktivnost, pri čemer je ena izmed frakcij po izolaciji iz *C. geotrope* pokazala en pomemben pas pri 65kDa molekulske mase na SDS PAGE in več pasov LAO aktivnosti pri pogojih, ki niso denaturajoči, kar je verjetno posledica post translacijskih modifikacij ali različnih oligomernih oblik. Primerjava specifične aktivnosti toksofalina in toksogeina z encimsko oksidoreduktivno reakcijo z L-levcinom kot substratom je pokazala, da je oksidaza izolirana iz *A. phalloides* (ApLAO) 8-krat bolj aktivna kot oksidaza iz gobe *C. geotropa* (CgLAO) (25).

2 NAMEN DELA

Sodobno zdravljenje rakavih obolenj vključuje mnogo metod, ki temeljijo na dobro poznanih mehanizmih ter učinkovinah. Kljub temu je rak bolezen, ki v Zahodnem svetu še vedno ostaja po smrtnosti v samem vrhu (27). Apoptoza tumorskih celic je eden izmed učinkovitih mehanizmov zaviranja rakavega obolenja. Snovi, ki bi inducirale apoptozo samo v tumorskih celicah, bi bile učinkovite kot nova protirakava zdravila. Kot induktorji apoptoze so poznani nekateri L-aminooksidazni encimi (LAO), predvsem toksični proteini, ki so jih izolirali iz različnih kačjih strupov. Manj raziskani pa so encimi LAO, ki so jih izolirali iz gob. L-aminokislina oksidaze (LAO) so flavoencimi, ki katalizirajo stereospecifično reakcijo oksidativne deaminacije L-aminokislina in posledično večinoma sprožijo proces apoptoze zaradi oksidativnega stresa. Mehanizmi, ki jih LAO sprožijo, še vedno niso vsi natančno poznani (12, 13).

Namen magistrske naloge je ugotoviti, ali encima LAO, izolirana iz gobe zelene mušnice (*Amanita phalloides*) (ApLAO) ter gobe pozne livke (*Clitocybe geotropa*) (CgLAO), povzročita selektivno citotoksičnost pri celičnih kulturah Jurkat in MCF7. Pri tem bomo uporabili metode določevanja celičnega preživetja s pomočjo spektrofotometrije. V nadaljevanju bomo s pomočjo pretočne citometrije z analizo celičnega cikla in določevanjem deleža apoptotičnih celic ter določevanja aktivnosti apoptoznih kaspaz ovrednotili, ali preiskovani LAO povzročita apoptozo pri celičnih kulturah Jurkat in MCF7. V zaključnem delu magistrske naloge bomo določili mehanizem apoptotičnega delovanja LAO z merjenjem znotrajcelične količine reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), merjenjem mitohondrijskega transmembranskega potenciala (MTP) in izražanjem specifičnih proteinov udeleženih v poteh apoptoze ter tako ovrednotili LAO kot potencialne induktorje apoptoze.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Reagenti

Reagenti in topila, ki smo jih uporabljali pri izvajanju eksperimentalnega dela magistrske naloge, so navedeni v Preglednici I.

Preglednica I: Seznam uporabljenih reagentov in topil z navedenim proizvajalcem.

Reagent	Proizvajalec, država
Advanced DMEM (a-DMEM)	Gibco, ZDA
Ac-DEVD-AFC	Bachem, Švica
Ac-IETD-AFC	Bachem, Švica
Ac-LEHD-AFC	Bachem, Švica
akrilamid	Sigma-Aldrich, ZDA
amonijev persulfat	Sigma-Aldrich, ZDA
Bradfordov reagent	Thermo Scientific, ZDA
bromfenol modro	Merck Millipore, ZDA
Comassie Brilliant Blue	Sigma-Aldrich, ZDA (Fluke NI VEČ)
diklorofluorescein diacetat (DCFH-DA)	Sigma-Aldrich, ZDA
DMEM	Invitrogen, ZDA
DMSO	Gibco, ZDA
DTT	Sigma-Aldrich, ZDA
EDTA	Serva, Nemčija
EDTA-Na ₂	Serva, Nemčija

epidermalni rastni faktor (EGF)	Sigma-Aldrich, ZDA
F-12	Gibco, ZDA
fetalni goveji serum (FBS)	HyClone, ZDA
glicerol	Sigma-Aldrich, ZDA (*Fluka)
H ₂ DCF-DA	Sigma-Aldrich, ZDA
hidrokortizon	Sigma-Aldrich, ZDA
inzulin	Sigma-Aldrich, ZDA
komplet reagentov Annexin V-FITC/PI	Sigma-Aldrich, ZDA
komplet reagentov za kemiluminescenco	Thermo Scientific, ZDA
L-glutamin	Sigma-Aldrich, ZDA
Mito Tracker RedCMXRos	Invitrogen, ZDA
mleko	Pomurke mlekarne, Slovenija
MTS	Promega, ZDA
NaDS	Sigma-Aldrich, ZDA (*Fluka)
nigrozin	Sigma-Aldrich, ZDA
PBS puffer	Sigma-Aldrich, ZDA
penicilin	Sigma-Aldrich, ZDA
propidijev jodid	Invitrogen, ZDA
RIPA puffer	pripravimo sami
RPMI-1640	Sigma-Aldrich, ZDA
substrat za HRP	Thermo Scientific, ZDA
TBS puffer	pripravimo sami

TBS-T puffer	pripravimo sami
TEMED	Sigma-Aldrich, ZDA
tripsin	Sigma-Aldrich, ZDA
Tris-HCl (pH=6,8)	Riedel-de Haën, Nemčija
Triton X-100	Serva, Nemčija
Tween 20	Sigma-Aldrich, ZDA (*Fluka)
Z-VAD-fmk	Bachem, Švica

3.1.2 Standardi

Standardi, ki smo jih uporabili pri izvajanju eksperimentalnega dela magistrske naloge, so navedeni v Preglednici II.

Preglednica II: Seznam uporabljenih standardov, z navedenim proizvajalcem.

Standard	Proizvajalec, država
goveji serumski albumin standard (BSA)	Sigma-Aldrich, ZDA
označevalec velikosti proteinov (See Blue [®] Plus 2 Pre-Stained Standard (1x))	Invitrogen, ZDA

3.1.3 Protitelesa

V Preglednici III so navedena protitelesa, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu magistrske naloge.

Preglednica III: Seznam uporabljenih primarnih in sekundarnih protiteles z navedenim proizvajalcem.

Primarna protitelesa	Proizvajalec, država
kunčja protitelesa, specifična za Bax	Cell Signaling, ZDA

kunčja protitelesa, specifična za Bcl-2	Cell Signaling, ZDA
kunčja protitelesa, specifična za kaspazo-3	Cell Signaling, ZDA
mišja protitelesa, specifična za β -aktin	Sigma-Aldrich, ZDA
Sekundarna protitelesa	Proizvajalec, država
kozja protikunčja protitelesa, označena s HRP	Merck Millipore, ZDA
kozja protimišja protitelesa, označena s HRP	Merck Millipore, ZDA

3.1.4 Laboratorijska oprema

V Preglednici IV so navedeni laboratorijski material ter naprave, ki smo jih potrebovali za izvedbo eksperimentalnega dela magistrske naloge.

Preglednica IV: Seznam uporabljene laboratorijske opreme z navedenim proizvajalcem.

Laboratorijska oprema	Proizvajalec, država
avtomatske pipete	Eppendorf, Nemčija
celični CO ₂ inkubator CB 210 BINDER	Binder, Nemčija
centrifuga Eppendorf 5804R	Eppendorf, Nemčija
centrifuga-bitehnološki laboratorij	Eppendorf, Nemčija
čitalec mikrotitrskih plošč Tecan Safire2	Tecan, Švica
epruvete za centrifugiranje	Sigma-Aldrich, ZDA
hladilnik (+4 °C)	LTH, Slovenija
inkubator WTB BINDER	Binder, Nemčija
kamera za fotografiranje gelov z UV-svetilko	UVItec, Velika Britanija
LAF komora PIO SMBC 183 AV	Iskra Pio, Slovenija

mikroskop (invertni)	Olympus, Japonska
mikrotitrne plošče	Sarstedt, Nemčija
naprava G-Box	Syngene, Velika Britanija
naprava za poliakrilamidno gelsko elektroforezo z NaDS	Bio-Rad Laboratories, ZDA
naprava za prenos western	Bio-Rad Laboratories, ZDA
naprava za sonificiranje	Mikro+polo, Slovenija
nastavki za pipete	Sarstedt, Nemčija
plastenke za gojenje celičnih kultur	Sigma-Aldrich, ZDA
plošče s 6 vdolbinicami	Sigma-Aldrich, ZDA
plošče z 12 vdolbinicami	Sigma-Aldrich, ZDA
poliviniliden difluoridna membrana za prenos western	Thermo Scientific, ZDA
pretočni citometer FACS Calibur	BD Bioscience, ZDA
programska oprema FlowJo	Milteny Biotec, Nemčija
programska oprema Gene Tools	Syngene, Velika Britanija
serološke pipete	Sarstedt, Nemčija
UV-VIS spektrofotometer NanoDrop™ 1000	Thermo Scientific, ZDA
vibracijsko mešalo Vibromix 104ev	Tehtnica, Slovenija
zamrzovalnik (-80 °C)	Gorenje, Slovenija

3.1.5 Pufri

Pufri, ki smo jih uporabili pri izvajanju magistrske naloge, so navedeni v Preglednici V.

Preglednica V: Uporabljeni pufri in njihova sestava.

Pufer	Sestava pufra
Fosfatni pufer z dodatkom NaCl (PBS)	1,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0,24 g KH_2PO_4 8,0 g NaCl 0,2 g KCl dopolnimo z dH_2O do 1,0 L in uravnamo pH na 7,4.
Lizirni pufer za kaspaze	0,1 % triton X-100 100,0 mM fosfatni pufer (pH=6,0) 1,03 mM EDTA 100,0 mM NaCl
RIPA pufer	20,0 mM Tris- HCl (pH=7,5) 150,0 mM NaCl 1,0 nM EDTA- Na_2 1,0 % NP-40
Aktivacijski pufer za kaspaze	20,0 nM PIPES (pH=7,2) 10,0 % sukroza 0,1 % CHAPS 1,0 mM EDTA 100,0 mM NaCl

10-kratni elektroforezni pufer, pH=8,3	29,0 g Tris baze 144,0 g glicina 10,0 NaDS dopolnimo z dH ₂ O do 1,0 L ter pufer pred uporabo redčimo 10-krat z dH ₂ O
Nanašalni pufer	1,25 mL 0,5 M Tris-HCl (pH=6,8) 1,0mL glicerol 0,2 mL 0,4 % (m/V) bromfenol 5,55 mL H ₂ O
Pufer za prenos	2,93 g Tris baze 5,81 g glicina 3,75 mL 10% (m/V) NaDS 200,0 ml metanola dopolnimo z dH ₂ O do 1,0 L.
Tris pufer z dodatkom Tweena (TTBS)	250,0 mM Tris baza 1370,0 mM NaCl 30,0 mM KCl 0,1 % Tween 20
Pufer za odstranjevanje protiteles (»ang. stripping buffer«)	5 g SDS (2%) 1,89 g Tris HCl, pH 6.8 (62.5 mM) 1, 748 ml merkaptoetanol (100 mM) Dopolnimo z dH ₂ O do 250 ml.

3.1.6 Gojišča

Gojišča, ki smo jih uporabili pri izvajanju magistrske naloge, so navedena v Preglednici VI.

Preglednica VI: Uporabljena gojišča in njihova sestava.

Gojišče	Sestava gojišča ($V_{\text{gojišča}}=100 \text{ mL}$)
Gojišče za celice Jurkat	88,0 mL RPMI-1640 10,0 mL FBS 1,0 mL penicilin/streptomycin 1,0 mL L-glutamin Tako pripravljeno gojišče hranimo v hladilniku pri 4 °C.
Gojišča za celice MCF7	47,0 mL aDMEM 47,0 mL F-12 5,0 mL FBS 1,0 mL L-glutamin 100,0 μL inzulin 50,0 μL hidrokortizon 40,0 μL EGF Gojišče hranimo v hladilniku pri 4 °C.

3.1.7 Biološki material

3.1.7.1 Celične kulture

Celične kulture so skupek celic, pridobljenih iz tkiv, ki jih gojimo v laboratoriju (*in vitro*), torej izven živega organizma. V nasprotju z gojenjem bakterij in gliv, je gojenje človeških celic zahtevnejše. Človeške celice namreč za rast potrebujejo zelo specifične pogoje, kot so ustrezen pH in temperatura ter gojišče, obogateno s hranili, rastnimi faktorji, aminokislinami in vitamini. Celice, ki se pritrdijo na podlago v gojiščni posodi, so pritrdjene ali adherentne celične kulture. Nekatere krvne celice, celice iz vranice ter kostnega mozga

pa se zelo slabo pritrjujejo na podlago, a jih kljub temu lahko temu gojimo v kulturi. Takim celičnim kulturam pravimo nepritrjene ali suspenzijske kulture (28).

Pri eksperimentalnem delu za magistrsko nalogo smo uporabili celični kulturi Jurkat in MCF7.

➤ Celična kultura Jurkat:

Celična kultura Jurkat so celice nesmrtnih T limfocitov, pridobljene iz vzorca periferne krvi bolnika z akutno T-celično levkemijo. Celice so psevdodiploidne, z najpogosteje 46 kromosomi. Kromosoma X ter Y večinoma nista poškodovana. Celična linija izraža gen za interlevkin-2 (IL-2) in antigen za CD3. Ob stimulaciji z lektini ali monoklonskimi protitelesi proti T3 antigenu ter dodatku forbolnih estrov (PMA) celice proizvajajo večje količine interlevkina 2 (IL-2). Gojimo jih kot suspenzijsko celično kulturo (29).

➤ Celična kultura MCF7:

Celična kultura MCF7 so človeške celice, ki so jih izolirali iz tkiva dojke in mlečnih žlez bolnice z adenokarcinomom, metastazirane oblike raka dojke, ki se je razvil po plevralnem izlivu, in se uporabljajo v raziskovalne namene. Celice te celične linije izražajo WNT7B onkogen in gen za izražanje proteinov za vezavo inzulinu podobnega rastnega faktorja (IGFBP); BP-2, BP-4, BP-5. Celice MCF7 so ohranile nekaj lastnosti, ki so značilne za diferenciran epitelij mlečnih žlez, kot je na primer sposobnost pretvorbe estradiola v estrogen preko citoplazemskih estrogenskih receptorjev. Omenjene celice se pri gojenju v kulturi pritrjujejo na podlago, zato govorimo o adherentni celični kulturi (30).

Odmrzovanje celičnih kultur:

Celični kulturi sta bili predhodno pripravljene ter shranjene v tekočem dušiku (-196 °C). Celice smo odtalili na vodni kopeli pri temperaturi 37 °C ter jim dodali 8 mL ustreznega gojišča za posamezno celično kulturo, ki smo ga predhodno ogreli na 37 °C. Celično suspenzijo smo centrifugirali 5 minut pri 1200 obratih na minuto. Po končanem centrifugiranju smo supernatant zavrgli, celice resuspendirali v svežem gojišču, ustreznem za posamezno celično linijo, ter jih prenesli v plastenko za gojenje celičnih kultur.

Gojenje celičnih kultur:

Gojenje celične kulture vedno poteka v aseptičnih pogojih. Delo se izvaja v mikrobiološki komori z laminarnim pretokom zraka (LAF komora), da se prepreči okužbo celic ter osebe, ki dela s celicami. Tako pred pričetkom dela, kot tudi po zaključku smo delavno površino v LAF komori in aparature razkužili s 70 % (v/v) etanolom. Pri rokovanju s celično kulturo smo uporabljali sterilne reagente in sterilni pribor. Gojiščne plastenke, kjer smo gojili celice, smo shranjevali v celičnem inkubatorju pri temperaturi 37 °C in atmosferi, nasičeni z vlago ter s 5 % CO₂. Omogočiti smo morali vstop zraka v plastenko, zato zamaška nikoli nismo privili popolnoma do konca. Celice za rast in delitev potrebujejo hranilne snovi in rastne dejavnike. Le-teh v izrabljenem gojišču primankuje, poleg tega pa se v njem začnejo kopičiti tudi razgradni produkti celic in celice začnejo odmirati. Zato smo izrabljeno gojišče redno menjali s svežim gojiščem (vsake 3 do 4 dni).

Adherentne MCF7 celice, ki so v 3. do 4. dneh prerastle 70 % do 80 % gojiščne plastenke, smo tripsinizirali. To smo storili tako, da smo iz plastenke najprej odpipetirali gojišče in celično kulturo sprali z ustrežno količino PBS pufra. Pritrjenim celicam smo dodali 0,02 % EDTA v PBS pufra in tripsin ter plastenko 10 minut inkubirali pri 37 °C. Celice smo spremljali z invertnim mikroskopom, ko so se odlepili od podlage, smo jim dodali ustrežno količino kompletnega gojišča, da smo zmanjšali učinek tripsina. Suspenzijo celic MCF7 smo prenesli v centrifugirko ter jo centrifugirali 5 minut pri 2000 obratih na minuto. Supernatant smo zavrgli, celice redispergirali s svežim gojiščem ter določeno količino celic vzeli za štetje, če smo jih potrebovali za nadaljne poskuse, del pa prenesli nazaj v plastenko in vrnili v inkubator .

Pri celični kulturi Jurkat postopek tripsinizacije ni bil potreben, saj so celice suspenzijske in se ne priraščajo na podlago. Jurkat celicam smo gojišče prav tako menjavali na vsake 3 do 4 dni tako, da smo suspenzijo s celicami prenesli iz plastenke v centrifugirko in centrifugirali 5 minut pri 2000 obratih na minuto. Supernatant z izrabljenim gojiščem smo zavrgli, celicam dodali ustrezen volumen svežega gojišča, jih resuspendirali, del prenesli v plastenko ter vrnili v celični inkubator.

Štetje celic:

Za pravilno ter uspešno izvedbo eksperimenta moramo poznati število celic, ki jih bomo obravavali v nadaljnjih poskusih. Zato smo najprej določili število celic v 1 mL celične

suspenzije. Iz celične suspenzije predhodno tripsiniziranih celic MCF7 s svežim gojiščem ter iz celične suspenzije Jurkat celic s svežim gojiščem smo odpipetirali po 50,0 μL in dodali 50,0 μL 0,2 % raztopine nigrozina ter temeljito premešali. Nigrozin ne more vstopiti v viabilno celico, prehaja pa v mrtve celice zaradi porušene membranske integritete in tako celico obarva črno. Vzorec suspenzije z barvilom smo nanegli v Burker-Turkovo komoro. Z invertnim mikroskopom smo prešteli vse žive celice, črno obarvanih pri štetju nismo upoštevali. Nato smo izračunali število celic na mL gojišča z Enačbo 1:

$$N=N' \cdot 2 \cdot 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$$

Enačba 1

N.....število celic v mL celične suspenzije

N'.....povprečno število celic, prešteti pod mikroskopom

3.1.7.2 Citotoksična proteina ApLAO in CgLAO

Citotoksičen protein ApLAO so izolirali iz gobe zelene mušnice (*Amanita phalloides*), CgLAO pa iz gobe pozne livke (*Clitocybe geotropa*) na Inštitutu Jožef Štefan. Obe gobi so nabrali v Sloveniji. Proteina so izolirali, očistili in opredelili s pomočjo velikostno-izključitvene in ionsko-izmenjevalne kromatografije, SDS-PAGE ter masne spektrofotometrije. L-aminokislinsko oksidazno (LAO) aktivnost so potrdili z gelsko detekcijo z uporabo L-Levcina, s čimer so tudi ugotovili približno 8-krat večjo oksidativno aktivnost ApLAO v primerjavi s CgLAO (25).

Vzorci proteinov, ki smo jih uporabljali v raziskavah s celicami, smo sterilno filtrirali s sterilizacijskim filtrom z velikostjo por 0,22 μm . Z UV-VIS spektrofotometrom NanoDrop™ 1000 smo trikrat pomerili 1,5-2,0 μl vzorca proteina ApLAO in CgLAO, da smo določili povprečno koncentracijo (mg/mL). Pri merjenju smo uporabili PBS pufer za slepo vrednost. Nato smo vzorce proteinov razdelili v alikvote in zamrznili pri $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2 METODE

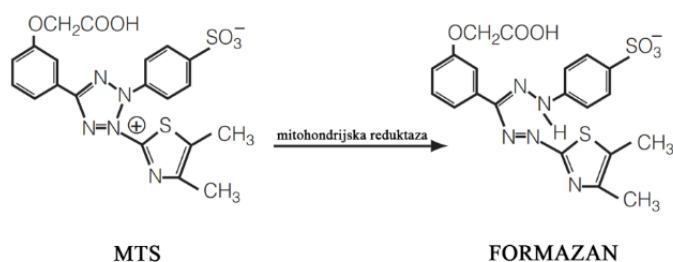
3.2.1 Spektrofotometrija

Pri delu s celičnimi kulturami se spektrofotometrične metode najpogosteje uporabljajo za proučevanje parametrov, ki so povezani s celično viabilnostjo ali smrtjo. Pokazatelj citotoksičnosti je na primer določanje aktivnosti encimov v supernatantu preiskovane celične kulture, kot je encim laktat dehidrogenaza (LDH), ki se nahaja le znotraj celice, ob porušeni strukturi plazemske membrane, pa se sprosti v okolje celice. Zelo dober pokazatelj za določanje celične viabilnosti je tudi aktivnost mitohondrijske dihalne verige. S slednjo določamo število živih proliferajočih celic v primerjavi s številom mrtvih.

Kolorimetrične metode uporabljamo večinoma v začetnih fazah raziskovanja celičnega preživetja, ko je potrebno raziskati večje število različnih pogojev, vedno pa moramo uporabiti tudi ustrezne kontrole (31).

3.2.1.1 Vrednotenje celičnega preživetja z MTS testom

MTS test je neradioaktivna kolorimetrična metoda, s katero določamo aktivnost mitohondrijske dihalne verige. Najpogosteje se za oceno viabilnosti celic oz. citotoksičnosti uporabljajo tertazolijeve soli, ki prehajajo membrano, mitohondrijski encimi pa jih metabolizirajo do obarvanih produktov, ki absorbirajo pri določenih valovnih dolžinah. V prvo generacijo uvrščamo toksično tetrazolijevo sol MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tertazolijev bromid). Soli druge generacije sta MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tertazol) in WST-1 (4-[3-(4-jodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetra])). MTS sol se v metabolično aktivnih celicah pretvori z encimom mitohondrijsko reduktazo do netoksičnega vodotopnega formazana, ki vzorec obarva rozasto-vijolično, kot prikazuje Slika 8 (32).



Slika 8: Strukturna formula MTS soli in njenega derivata formazana (32).

Izvedba merjenja celičnega preživetja:

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili komplet za določanje celičnega preživetja s tetrazolijevo soljo MTS. Najprej smo na mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami nanesti po 100 μL celične suspenzije MCF7 celic ($2 \times 10^4/100 \mu\text{L}$) v ustreznem gojišču. V primeru adherentne celične kulture MCF7 smo ploščo čez noč inkubirali v celičnem inkubatorju pri temperaturi 37 °C, da so se celice pritrdile na dno vdolbinic. Naslednji dan smo s celic previdno odpipetirali izrabljeno gojišče ter nanje nanesti 100 $\mu\text{L}/\text{vdolbinico}$ vnaprej pripravljenih proučevanih vzorcev raztopine proteina ApLAO oziroma CgLAO v različnih koncentracijah (0,1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Pri suspenzijski celični kulturi Jurkat inkubacija preko noči ni bila potrebna. Na ploščo smo nanesti 50 μL celične suspenzije ($2 \times 10^4/50 \mu\text{L}$). Nato smo v vsako vdolbinico dodali 50 μL vnaprej pripravljenega vzorca raztopine proteina ApLAO oziroma CgLAO v koncentraciji, ki je bila 2-krat višja od končne.

V primeru proučevanja od kaspaz odvisne celične smrti, smo celični kulturi Jurkat in MCF7 tretirali z oksidazama ApLAO in CgLAO v različnih koncentracijah, v prisotnosti in odsotnosti 10 μM inhibitorja kaspaz z-VAD-fmk (karbobenzoksil-valil-alanil-aspartil-(O-metil)-fluorometilketona) ter inkubirali v različnih časovnih točkah (12, 24, 48 ur). Po končanem tretiranju smo v vsako vdolbinico dodali mikrotitrsko ploščo 10 μL MTS reagenta in inkubirali še 1-2 uri. Formazan, ki prosto prehaja skozi membrane celic v celično okolje (gojišče), smo določili spektrofotometrično z absorbanco, merjeno pri valovni dolžini 492 nm. Ker je absorbanca proporcionalna deležu preživelih celic, smo za njegov izračun, ob predhodnem upoštevanju odštete absorbance slepe vrednosti, uporabili Enačbo 2:

$$\text{Delež preživelih celic (\%)} = (A_{\text{vzorec}} / A_{\text{kontrola}}) \cdot 100$$

Enačba 2

A_{vzorec} ...absorbanca vzorca celic, tretiranih z ApLAO/CgLAO

A_{kontrola} ...absorbanca vzorca celic brez ApLAO/CgLAO

3.2.1.2 Merjenje aktivnosti kaspaz

Kaspazno aktivnost smo določali spektrofotometrično z ustreznimi fluorescentnimi substrati, saj metoda temelji na reakciji kaspaz in substrata, ki je specifičen za posamezno kaspazo. Kaspaze v aminokislinskem zaporedju prepoznajo sekvence, specifične za posamezno kaspazo, ter substrat na tem mestu razcepijo. Za merjenje aktivnosti kaspaze-3 smo uporabili substrat Ac-DEVD-AFC s sekvenco DEVD (Asp-Glu-Val-Asp), ki jo specifično prepozna kaspaza-3. Pri določanju aktivnosti kaspaze-8 smo uporabili substrat Ac-IETD-AFC s specifično sekvenco IETD (Ile-Glu-Thr-Asp), za merjenje aktivnosti kaspaze-9 pa substrat Ac-LEHD-AFC, ki vsebuje sekvenco LEHD (Leu-Glu-His-Asp). Merili smo fluorescenco AFC, to je C-terminalno vezanega fluorofora v karboksipeptidaznih substratih, ki se je sprostil pri reakciji kaspaze in substrata (33, 34).

Kadar želimo izmeriti aktivnosti kaspaz in jo primerjati med različnimi vzorci, moramo najprej zagotoviti enako celokupno koncentracijo proteinov v vseh medsebojno primerjanih vzorcih. V nasprotnem primeru rezultati niso primerljivi in reprezentativni. Z metodo po Bradfordu, ki temelji na reakciji proteinov v vzorcu z barvilom Coomassie Brilliant Blue, smo določili koncentracijo proteinov v posameznih preiskovanih vzorcih. Ker je barvilo v raztopini v anionski obliki, lahko tvori s proteini elektrostatske in hidrofobne povezave. Nastane obarvan produkt z absorpcijskim maksimumom pri valovni dolžini 595 nm. Metoda je relativna, zato potrebujemo umeritveno krivuljo, ki jo izračunamo iz izmerjenih absorbanc standardnih raztopin govejega serumskega albumina (BSA, »ang. bovine serum albumine«) (35).

Priprava lizatov:

Pred določanjem koncentracije proteinov in merjenjem kaspazne aktivnosti v vzorcih je bilo potrebno vzorce najprej lizirati. Celično suspenzijo (1×10^6 celic/2 mL gojišča) smo predhodno tretirali z oksidazama ApLAO (0,5 $\mu\text{g/mL}$) ali CgLAO (5 $\mu\text{g/mL}$) ter inkubirali v različnih časovnih točkah (3, 6, 9, 12, 15 in 24 ur). Vzorce s suspenzijo tretiranih celic smo nato prenesli v centrifugirke, centrifugirali 5 minut pri 2000 obratih na minuto, zavrgli supernatant in celice sprali s PBS pufrom (1 mL). Nato smo jih ponovno centrifugirali pri 2000 obratih na minuto, zavrgli supernatant ter resuspendirali v lizirnem pufu za kaspaze (100 - 150 μL). Vzorce smo postavili na led za 30 minut, da smo uničili še preostanek celic z nepoškodovanimi celičnimi membranami. S tem smo dosegli boljšo izluženost proteinov

v raztopino. Nato smo vzorce celičnih suspenzij sonificirali (2 x 8 sekund) in jih shranili za najmanj 60 minut pri temperaturi -80 °C. Celične lizate smo centrifugirali 15 minut pri 14000 g, pri temperaturi 4 °C. Pelete celičnih ostankov smo po končanem centrifugiranju zavrgli, supernatantu posameznih vzorcev pa določili koncentracijo proteinov.

Določanje koncentracije proteinov po Bradfordu:

Koncentracijo proteinov smo določili tako, da smo uporabili standardne raztopine BSA z naraščajočimi koncentracijami med 2 in 150 µg/mL. V začetne vdolbinice mikrotitrške plošče smo nanesti po 5 µL standardnih raztopin, nato pa v ostale po 5 µL posameznega vzorca. V vdolbinice mikrotitrške plošče s standardni in vzorci smo dodali po 200 µL Bradfordovega reagenta, ploščo zaščitili pred svetlobo ter inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi. Absorbance smo spektrofotometrično izmerili pri valovni dolžini 595 nm. Z izmerjenimi vrednostmi absorbanc standardov smo izrisali umeritveno krivuljo. Absorbanca raztopine je namreč v območju nizkih koncentracij proteinov (2-150 µg/mL) proporcionalna koncentraciji proteinov v vzorcu. Nato smo izračunali koncentracije proteinov v preiskovanih vzorcih, ki smo jih potrebovali v nadaljnjih poskusih pri merjenju aktivnosti kaspaz.

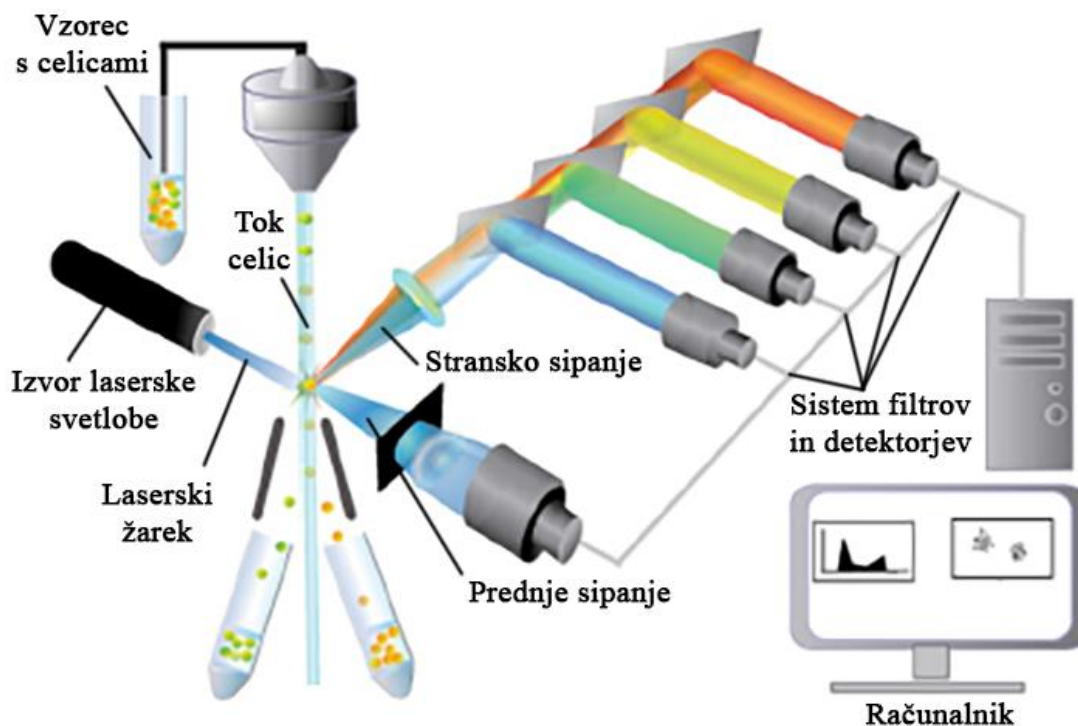
Izvedba merjenja aktivnosti kaspaz:

Vzorce smo normalizirali s kaspaznim lizirnim pufrom na končno koncentracijo proteinov 44 µg/110 µL. Pri delu smo uporabili črno mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami. V vdolbinice smo nanesti 50 µL aktivacijskega kaspaznega pufra z dodanim ditioneitolom (DTT, 20 µL/mL) ter dodali po 50 µL preiskovanih vzorcev lizatov z znano koncentracijo proteinov. Ploščo smo inkubirali pri temperaturi 37 °C 30 minut, nato nanesti v vsako vdolbinico 10 µL specifičnega substrata za kaspazo-3, Ac-DEVD-AFC s koncentracijo 1 mM ter nemudoma začeli meriti fluorescenco kontinuirano 30 minut, v intervalih po 1 minuto. Fluorescenco smo merili pri ekscitacijski valovni dolžini 405 nm ter emisijski valovni dolžini 535 nm. Aktivnost kaspaze smo podali kot porast fluorescence v odvisnosti od časa. Po enakem postopku z ustreznim specifičnim substratom smo določali tudi aktivnost kaspaze-8 in kaspaze-9.

3.2.2 Pretočna citometrija

Pretočna citometrija je metoda, ki jo v raziskavah celične smrti zaradi priročnosti zelo pogosto uporabljamo. Merimo in analiziramo lahko lastnosti tako posameznih celic kot celičnih komponent. Celice v suspenziji tečejo ena za drugo skupaj s pretočno tekočino skozi kapilaro, pri tem pa potujejo skozi snop laserskega žarka. Ta se od celice lahko odbije, lomi ali absorbira, odvisno od lastnosti, ki jih celica nosi, in samega označevanja. Z metodo pridobimo informacijo o velikosti ter granuliranosti celice s fotodetektiranjem razpršene svetlobe ob prehodu celice skozi snop laserskega žarka.

Najpogosteje pri analizi celične smrti uporabljamo bodisi barvila bodisi specifična protitelesa označena s fluorokromom, kar zaznamo s fluorescenčnimi detektorji. Sestavne dele pretočnega citometra prikazuje Slika 9 (36, 37).



Slika 9: Shema pretočnega citometra (38).

3.2.2.1 Določitev deleža apoptotičnih celic

Celične spremembe v zgodnjih fazah apoptoze vključujejo izgubo fosolipidne asimetrije. Pri živih nepoškodovanih celicah encim aminofosfolipidna translokaza transportira preko membranskega dvosloja fosfatidilserin v notranjost celice, pri apoptotičnih celicah pa se

prenese na zunanjo površino membrane, zato lahko delež apoptotičnih celic v vzorcih določamo s pomočjo komercialno dostopnih kompletov reagentov, ki vežejo prosti fosfatidilserin. Za detekcijo fosfatidilserina smo uporabili komplet Aneksin V-FITC (Aneksin V, konjugiran s fluorkromom fluorescein izotiocianatom (FITC)), ki ga s pretočno citometrijo detektiramo kot zeleno fluorescenco. Istočasno smo uporabili reagent propidijev jodid (PI), ki se vgradi samo v DNK mrtvih celic ter tako omogoča določanje njihovega deleža. PI pri detekciji s pretočnim citometrom fluorescira rdeče. Uporaba obeh reagentov v kombinaciji nam omogoča določitev deleža živih celic, zgodnje apoptotičnih, pozno apoptotičnih ter nekrotičnih celic (41).

Izvedba določevanja apoptoze celic:

Celice Jurkat in MCF7 smo tretirali z ApLAO (0,5µg/mL) in CgLAO (5µg/mL) v prisotnosti ali odsotnosti kaspaznega inhibitorja z-VAD-fmk (10 µM). Po 16-urni inkubaciji smo celice prešteli in jih prenesli v centrifugirke (2×10^5 celic/mL). Celice smo sprali z 2 mL PBS pufra in jih 5 minut centrifugirali pri 2000 obratih na minuto. Odstranili smo supernatant in celice suspendirali v 350 µL vezalnega pufra, nato pa dodali 3,5 µL Aneksina V-FITC ter 7,0 µL PI. Vzorce smo nato zaščitene pred svetlobo inkubirali natanko 10 minut pri sobni temperaturi. S pretočnim citometrom FACS Calibur smo izvedli meritve, delež posameznih celičnih subpopulacij pa smo analizirali s programsko opremo FlowJo. Kontrolne celice niso bile tretirane s citotoksičnima proteinoma.

3.2.2.2 Merjenje mitohondrijskega transmembranskega potenciala

Merjenje mitohondrijskega transmembranskega potenciala (MTP) temelji na spremenjeni mitohondrijski funkciji. V procesu apoptoze pride zaradi okvarjenega delovanja mitohondrijev do padca MTP. Z metodo določamo delež celic z aktivnim mitohondrijskim dihanjem. Predhodno tretirani celični suspenziji dodamo nefluorescenčno barvilo MitoTracker, ki z difuzijo prehaja celično membrano. V celicah se oksidira v fluorescenčni kationski produkt, ki ga nato privzamejo mitohondriji. Barvilo v aktivnih mitohondrijih reagira s tiolnimi skupinami v proteinih in peptidih ter tvori konjugat, ki fluorescira rdeče. Intenziteto eksitacije fluorescence izmerimo s pretočnim citometrom (42).

Izvedba določevanja MTP:

Celice Jurkat smo priraščali na plošči z 24 vdolbinicami (2×10^5 celic/mL), jih tretirali z ApLAO (0,5 $\mu\text{g/mL}$) in CgALO (5 $\mu\text{g/mL}$) in inkubirali 0, 1, 3, 6, in 24 ur. Po končani inkubaciji smo celice dvakrat sprali z 2 mL PBS pufra in jih centrifugirali 5 minut pri 2000 obratih na minuto. Supernatant smo odpipetirali, na pelete celic pa dodali po 500 μL raztopine predhodno segretega celičnega gojišča in barvila MitoTracker (300 nM). Celice smo resuspendirali in inkubirali 30 minut pri temperaturi 37 °C. Nato smo celice ponovno sprali z 2 mL PBS pufra, jih 5 minut centrifugirali pri 2000 obratih na minuto, po centrifugiranju pa supernatant zavrgli ter celice resuspendirali v PBS pufu. S pretočnim citometrom FacsCalibur smo izvedli meritev, delež MTP pa smo analizirali s programsko opremo FlowJo.

3.2.2.3 Merjenje količine znotrajcelično nastalih reaktivnih kisikovih spojin

Tudi tvorba znotrajcelično nastalih reaktivnih kisikovih zvsti (ROS) je eden izmed kazalcev procesa apoptoze v celici. LAO povzročijo povečano nastajanje H_2O_2 , kar posledično vodi v oksidativni stres. Pri tem se poveča nastajanje znotrajceličnih ROS, katerih količino smo določili s pretočno citometrijo. Za detekcijo celic, ki flourescirajo, smo uporabili sondo dihidro-2',7'-diklorofluorescein diacetata ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$), nefluorescenčno spojino, ki s pasivnim transportom prehaja celično membrano. V celici so prisotne endogene esteraze, ki sondo deacetilirajo do dihidro-2',7'-diklorodihidrofluoresceina (H_2DCF), slednji pa celične membrane ne prehaja. Ob prisotnosti znotrajceličnih oksidantov (H_2O_2) H_2DCF oksidira v fluorescenčni produkt 2',7'-diklorofluorescein, za katerega membrana celice prav tako ni prepustna (43-45).

Izvedba določevanja ROS:

Celično kulturo Jurkat smo nagojili na ploščo s 24 vdolbinicami (2×10^5 celic/mL). Celice smo različno dolgo (1, 3, 6 in 24 ur) izpostavili oksidazama ApLAO (0,5 $\mu\text{g/mL}$) in CgLAO (5 $\mu\text{g/mL}$) ter jih po končanih inkubacijah dvakrat sprali z 1 mL PBS pufra. Vsakokratnemu spiranju je sledilo 5-minutno centrifugiranje pri 2000 obratih na minuto. Po drugem cetrifugiranju smo supernatant zavrgli ter celičnim peletam dodali po 500 μL raztopine sonde $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ (10 μM) v RPMI 1640 gojišču. Celice smo resuspendirali, jih inkubirali 30 minut pri temperaturi 37 °C, jih po končani inkubaciji ponovno dvakrat sprali

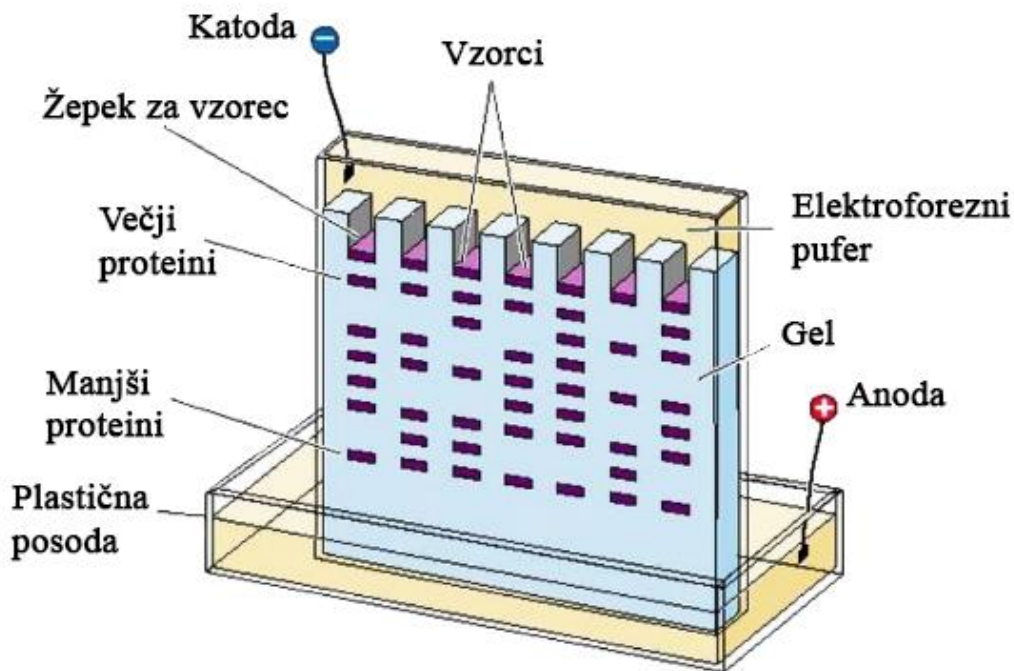
z 1 mL PBS pufra ter jih 5 minut centrifugirali s hitrostjo 2000 obratov na minuto. Supernatant smo nato previdno odstranili, celice pa resuspendirali v PBS puftru. S pretočnim citometrom FacsCalibur smo izvedli meritev, tvorbo ROS pa smo analizirali s programsko opremo FlowJo.

3.2.3 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (NaDS PAGE)

Elektroforezo uvršamo med separacijske metode. Temelji namreč na različni hitrosti potovanja nabitih delcev. Ti v električnem polju potujejo proti nasprotno nabiti elektrodi z različno hitrostjo, ker nanje vplivajo parametri, kot so velikost, oblika molekule in celokupni naboj molekule (31).

Poliakrilamidna gelska elektroforeza je v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata oziroma NaDS PAGE (»ang. SDS-PAGE«) zelo uporabna elektroforezna metoda, zato jo pogosto uporabljajo za ločevanje in analizo proteinov in peptidov. Natrijev dodecilsulfat (NaDS) je negativno nabita površinsko aktivna molekula in se kot anion nespecifično veže na proteine v komplekse, pri tem pa jih denaturira. Proteini v kompleksih pridobijo negativen naboj, zato v električnem polju potujejo proti pozitivno nabiti anodi. Elektroforezno mobilnost takih kompleksov skozi premrežen separacijski gel določa izključno velikost proteinov. Hitrost potovanja proteinov je obratnosorazmerna njihovi velikosti; večji proteini zaradi upora nosilca potujejo počasneje, manjši hitreje (45).

Elektroforeza v prisotnosti NaDS poteka v gelskem matriksu. Ta nastane s polimerizacijo akrilamida in *N,N'*-metilenbisakrilamida, ki poteče v prisotnosti prostih radikalov in stabilizatorja *N,N,N',N'*-tetrametiletildiamina (TEMED-a). Najpogosteje se kot vir prostih radikalov uporablja amonijev persulfat. NaDS gelska elektroforeza običajno poteka v navpičnem neprekinjenem sistemu, ki ga sestavljata zgornji, koncentracijski in spodnji, separacijski gel. Koncentracijski gel je manj zamrežen kot separacijski in molekul pri gibanju ne ovira, zato v njem ne pride do separacije proteinov ali proteinskih fragmentov. Omogoča koncentriranje proteinov v čim ožjo črto pred začetkom potovanja po separacijskem gelu. Tako lahko vsi proteini hkrati preidejo v separacijski gel in dosežemo boljšo ločbo lis. Separacijski, bolj zamreženi gel, omogoča ločbo molekul glede na velikost (35). Shematski prikaz sistema za izvedbo NaDS PAGE prikazuje Slika 10.



Slika 10: Shematski prikaz sistema za elektroforezo (47).

Priprava gelov:

Pred pripravo gelov smo sestavili napravo za vlivanje gelov. V okvir smo vstavili stekelci, med kateri smo kasneje vlili gela in vse postavili v stojalo za polimerizacijo, pri čemer smo pazili, da je bila naprava na ravni površini. Sledila je priprava 12 % separacijskega gela z reagenti, navedenimi v Preglednici VII. Sveže pripravljen separacijski gel (3,3 mL) smo nemudoma vlili med stekelca ter nanj, preden se je začel strjevati, previdno vlili 1 mL butanola, nasičenega z vodo za izravnano gladine gela. Ko se je gel strdil, smo butanol odlili, sprali z vodo ter previdno popivnali s filter papirjem. V nadaljevanju postopka smo pripravili še 5 % koncentracijski gel, kot je navedeno v Preglednici VII in tudi tega nemudoma vlili med stekelca, preko separacijskega gela. V gel smo vstavili glavniček za oblikovanje t.i. žepkov za vzorce in počakali, da se je gel strdil.

Preglednica VII: Sestava separacijskega in koncentracijskega gela za izvedbo NaDS
PAGE

12 % separacijski gel (4,0 mL)		5 % koncentracijski gel (1,5 mL)	
40,0 % akrilamid	1,2 mL	40,0 % akrilamid	188 µL
1,5 M Tris-HCl (pH=8,8)	1,0 mL	1,5 M Tris-HCl (pH=6,8)	195 µL
H ₂ O	1,7 mL	H ₂ O	1,0 mL
10,0 % NaDS	50,0 µL	10,0 % NaDS	15,0 µL
10,0 % amonijev persulfat*	50,0 µL	10,0 % amonijev persulfat*	15,0 µL
TEMED*	1,7 µL	TEMED*	1,5 µL

*dodamo tik pred vlivanjem gela

Priprava vzorcev:

Celice Jurkat smo nagojili na ploščo s šestimi vdolbinicami (5×10^6 celic/mL) in tretirali z ApLAO (0,5 µg/mL) in CgLAO (5 µg/mL). Celične lizate smo pripravili po 0, 6, 12, 15 in 24 urah inkubacije z lizirnim pufrom RIPA. Z metodo po Bradfordu smo določili koncentracijo proteinov za vse analizirane vzorce. V nadaljevanju smo vzorce redčili s pufrom, da je bila koncentracija proteinov po redčenju 30 µg/mL. Po 20 µL vsakega od analiziranih vzorcev smo odpipetirali v nove epice ter dodali po 10,6 µL 2 x nanašalnega puфра in 5,4 µL 1 M reducenta DTT, ki je prekinil disulfidne vezi v preiskovanih vzorcih. Sledila je 5-minutna inkubacija vzorcev na vodni kopeli pri 100 °C. Analiziranim vzorcem smo z nanašalni pufrom dodali glicerol, da smo dosegli njihovo lepše usedanje in barvilo bromfenol modro za sledenje elektroforezne fronte.

Elektroforezna ločba:

Predhodno pripravljen gel, ki smo ga pustili med stekelcema, smo prestavili v aparaturo za elektroforezo in jo napolnili z elektroforeznim pufrom (pH=8,3). Vzorce smo nato nanegli v t. i. žepke, vdolbinice na vrhu gela. V prvi žepki smo nanegli 10 µL označevalca velikosti proteinov, v ostale pa po 25 µL vzorcev. Gel v tako pripravljenem sistemu smo razvijali 2 uri pri konstantni napetosti 100 V, da je lahko potekla elektroforezna ločba. Po

končani elektroforezi smo aparaturo previdno razdrli, odstranili gel ter ga prenesli v petrijevko. Sledil je prenos proteinov na membrano in detekcija proteinov.

3.2.4 Prenos western

Detekcija proteinov po elektroforezni ločbi je lahko nespecifična ali pa specifična. Pri specifičnem določevanju posameznih proteinov navadno uporabljamo primarna protitelesa, točno določeno usmerjena proti analiziranemu proteinu. Protitelesa so velike molekule in te težko potujejo skozi gel, zato proteine iz gela prenesemo na nitrocelulozno ali najlonsko membrano. To je t.i. prenos western, ki lahko poteka kapilarno ali elektroforezno. Membrano po prenosu inkubiramo s primarnimi protitelesi, nanje pa vežemo sekundarna protitelesa. Slednja so specifično usmerjena proti primarnim in so označena s kromogenom ali encimom. Ta ob prisotnosti substrata tvori obarvan produkt, ki ga detektiramo (46).

Priprava naprave za prenos western:

Po končani poliakrilamidni gelski elektroforezni ločbi proteinov smo najprej pripravili posebno napravo z dvema elektrodama za izvedbo prenosa western, kot prikazuje Slika 11. Plastični nosilec z anodo smo pomočili v pufer za prenos in nanj namestili gobico. Slednjo smo predhodno temeljito prepojili s pufrom za prenos, da smo iz nje izgnali zračne mehurčke, ki bi motili potek prenosa proteinov. V velikosti gela smo izrezali filter papirja in nitrocelulozno membrano, ki smo jo aktivirali s 5-minutno inkubacijo v metanolu. Filter papir, aktivirano membrano in gel z ločenimi proteini smo omočili v pufri za prenos. Na gobico smo previdno položili prvi filter papir in čezenj membrano. Oboje smo previdno zgladili, s čimer smo odstranili zračne mehurčke, nastale med filter papirjem in membrano. Gel z ločenimi proteini smo položili na membrano in nanj drugi filter papir. Pokrili smo s plastičnim nosilcem s katodo in sistem priključili na napetost. Prenos proteinov z gela na membrano je potekal 1,5 ure s konstantno napetostjo 100 V.

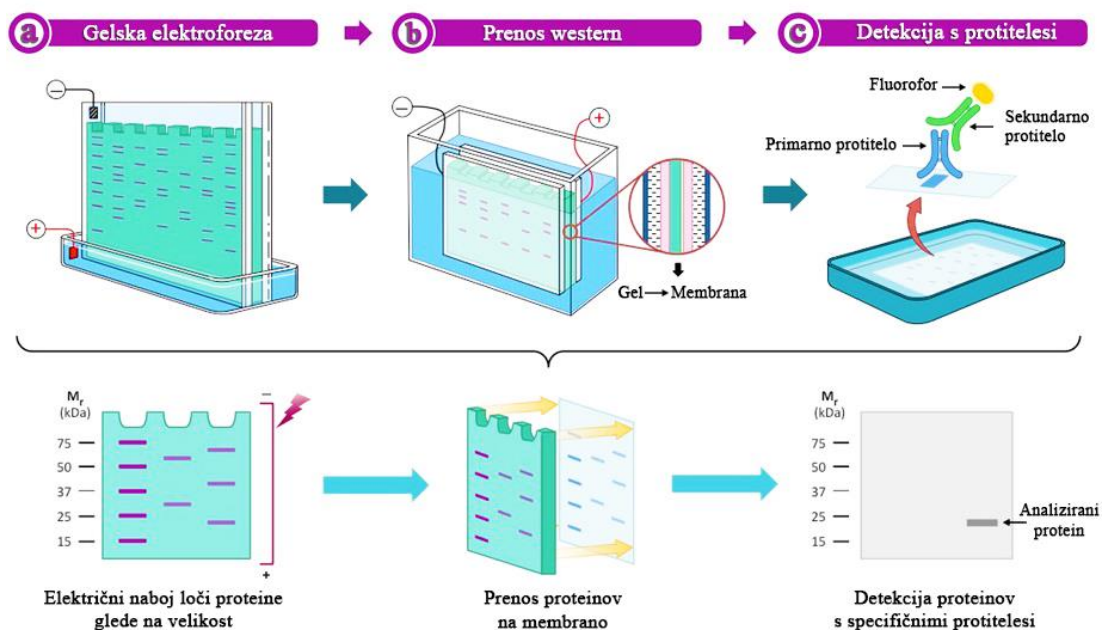


Slika 11: Sestava aparature za prenos western.

Detekcija proteinov:

Proteine smo po prenosu na membrano specifično detektirali s protitelesi. Membrano smo sprali s pufrom TTBS (1 x TBS pufer z dodatkom 0,1 % Tween 20) in jo 1 uro inkubirali v 5 % mleku v PBS, ob rahlem stresanju. Po blokadi smo membrano 3-krat spirali po 5 minut s pufrom TTBS. Sledila je inkubacija membrane v raztopini primarnih kunčjih protiteles proti Bax proteinu (1000-kratno redčenje v 3 % BSA v TTBS) in proti Bcl-2 proteinu (1000-kratno redčenje v 3 % BSA v TTBS), ki je potekala preko noči pri temperaturi 4 °C, ob rahlem stresanju. Po nanosu primarnih protiteles in pred nanosom sekundarnih smo membrano vedno spirali 6-krat po 10 minut s pufrom TTBS. Inkubacija v raztopini kozjih protiteles proti kunčjim, označenih s hrenovo peroksidazo (HRP) je potekala 1 uro pri sobni temperaturi, ob rahlem stresanju. Membrano smo nato 5-krat po 5 minut spirali s pufrom TTBS. Spiranje smo po inkubaciji s protitelesi vsakokrat ponovili. Sledila je 5-minutna inkubacija membrane substratom za peroksidazo pri sobni temperaturi, zaščiteno pred svetlobo. Z napravo G-Box smo posneli odziv na membrani. Po merjenju smo membrano 30 minut spirali s pufrom TTBS in s proteinov odcepili protitelesa z 1-urno inkubacijo v »stripping« pufru pri 60 °C. Membrano smo sprali (dvakrat po 20 minut s TTBS), blokiral v 5 % mleku v TTBS (30 minut inkubacije z rahlim stresanjem) in ponovno spirali (trikrat po 5 minut, pufer TTBS). S proteinom β -aktinom smo preverili, ali je bil nanos vzorcev na gel enakomeren. Za detekcijo β -aktina smo kot primarna protitelesa uporabili mišja, specifično usmerjena proti β -aktinu (500-kratno redčenje v 3 % BSA v TTBS), za sekundarna pa kozja proti mišjim, označena s HRP (2500-kratno redčenje v 5 % mleku v TTBS). Uporabili smo enak postopek kot za določanje proteinov Bax in Bcl-2. Tudi kemluminescenčni odziv na membrani za β -aktin smo posneli z napravo G-Box.

Slika 12 prikazuje zaporedje izvedbe eksperimentalnega dela ločbe in detekcije proteinov: gelske elektroforeze (a), prenosa western (b) in detekcije s protitelesi (c) (48, 49).



Slika 12: Prikaz NaDS PAGE (a), prenosa western (b) in detekcije proteinov (c) (48, 49).

3.2.5 Statistično vrednotenje rezultatov

Rezultate kvantitativnih meritev smo statistično ovrednotili in jih podali kot povprečno vrednost vsaj dveh neodvisnih bioloških meritev \pm standardna deviacija (S.D.). Za analizo razlik med vzorci smo uporabili statistično metodo Student *t*-testa dveh neodvisnih vzorcev, pri tem pa smo upoštevali predpostavko o enakosti varianc. S *t*-testom smo zračunali t.i. P vrednosti, razliko med vzorci pa ovrednotili za statistično značilno, če je bila vrednost $P < 0,05$, kar smo označili z zvezdico (*) pred P. Rezultate smo analizirali s pomočjo programske opreme Microsoft Excel 2013.

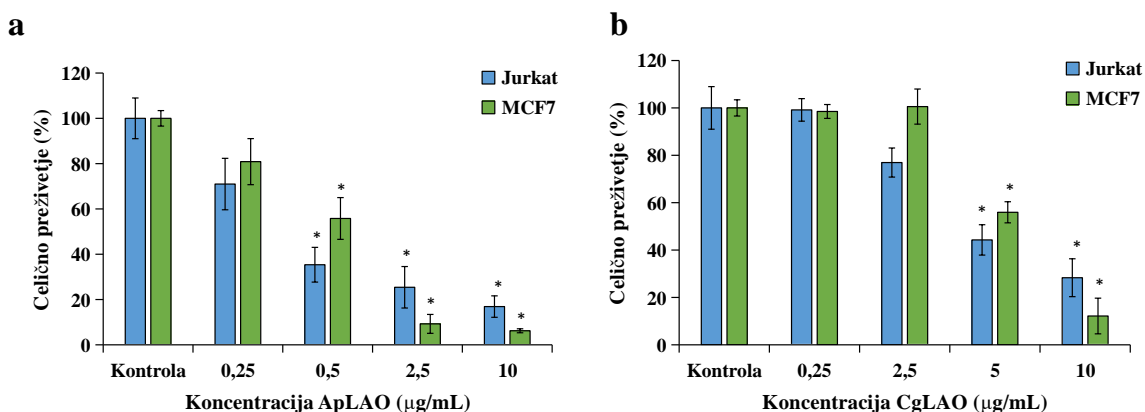
4 REZULTATI

4.1 VREDNOTENJE CITOTOKSIČNOSTI ApLAO IN CgLAO NA CELIČNIH KULTURAH JURKAT IN MCF7

ApLAO in CgLAO izkazujeta različno citotoksičnost na Jurkat in MCF7 celičnih kulturah.

4.1.1 Celice tretirane z ApLAO in CgLAO izkazujejo koncentracijsko-odvisno citotoksičnost

Citotoksično delovanje proteinov ApLAO in CgLAO smo preverili z merjenjem njihovih učinkov na celično kulturo nesmrtnih T limfocitov Jurkat in na celično kulturo epitelijskih MCF7 celic človeškega adenokarcinoma dojke. Celice smo priraščali v kompletnem gojišču, nato pa tretirali z naraščajočimi koncentracijami ApLAO ali CgLAO (0,25–10 $\mu\text{g/mL}$) ter inkubirali 24 ur. Celično preživetje smo preverili z uporabo MTS reagenta. Celice smo detektirali z merjenjem absorbance vzorcev s čitalcem mikrotitrskih plošč in preračunali delež celičnega preživetja za vse posamezne vzorce; kontrola so bile netretirane celice. Vsak poskus smo izvedli v štirih paralelkah. Rezultati so predstavljeni kot povprečje \pm standardno deviacijo (S.D.) v treh neodvisnih testih in jih prikazuje Slika 13.



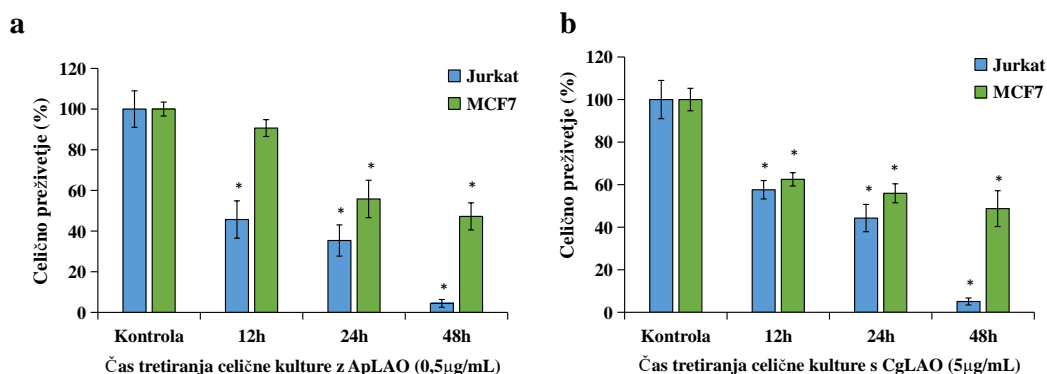
Slika 13: Učinki ApLAO (a) in CgLAO (b) na preživetje Jurkat in MCF7 celic.

Jurkat in MCF7 celice so bile izpostavljene naraščajočim koncentracijam ApLAO (0,25–10 $\mu\text{g/mL}$) in CgLAO (0,25–10 $\mu\text{g/mL}$). Po 24. urah tretiranja je bila viabilnost celic ocenjena z MTS testom. Rezultati so podani kot povprečje \pm S.D. treh neodvisnih testov. * $P < 0,05$.

Celično preživetje celičnih kultur Jurkat in MCF7, ki smo ju tretirali z ApLAO za 24 ur, se značilno zmanjša v odvisnosti od koncentracije. Tretiranje celic z ApLAO pri koncentraciji 0,5 $\mu\text{g/mL}$, ki smo jo izbrali za nadaljne poskuse, je znižalo sposobnost preživetja Jurkat celic na $35,4 \pm 7,7\%$ in MCF7 celic na $55,8 \pm 9,2\%$ glede na ustrezne kontrole, kar je prikazano na Sliki 13a. 24-urno tretiranje celic s CgLAO pri koncentraciji 5 $\mu\text{g/mL}$, ki smo jo izbrali za nadaljne poskuse, je zmanjšalo sposobnost preživetja celic Jurkat na $44,3 \pm 6,4\%$ in MCF7 celic na $55,9 \pm 4,5\%$ glede na ustrezne kontrole, kot kaže Slika 13b. Proteina ApLAO in CgLAO izkazujeta koncentracijsko odvisno citotoksičnost na obeh celičnih kulturah, vendar je bil učinek obeh oksidaz bolj izrazit na Jurkat celicah.

4.1.2 Celice tretirane z ApLAO in CgLAO izkazujejo časovno-odvisno citotoksičnost

Preverili smo tudi citotoksičnost obeh oksidaz v odvisnosti od časa tretiranja na izbranih celičnih kulturah, v izbranih časovnih obdobjih: 12, 24 in 48 ur. Na podlagi pridobljenih rezultatov, ki kažejo zmanjšanje sposobnosti preživetja glede na čas tretiranja tako Jurkat kot MCF7 celic in jih prikazuje Slika 14a in b, lahko sklepamo, da ApLAO in CgLAO poleg koncentracijsko-odvisne citotoksičnosti, izkazujeta tudi časovno-odvisno citotoksičnost na celicah Jurkat in MCF7.



Slika 14: Učinki ApLAO (a) in CgLAO (b) na preživetje Jurkat in MCF7 celice v odvisnosti od časa.

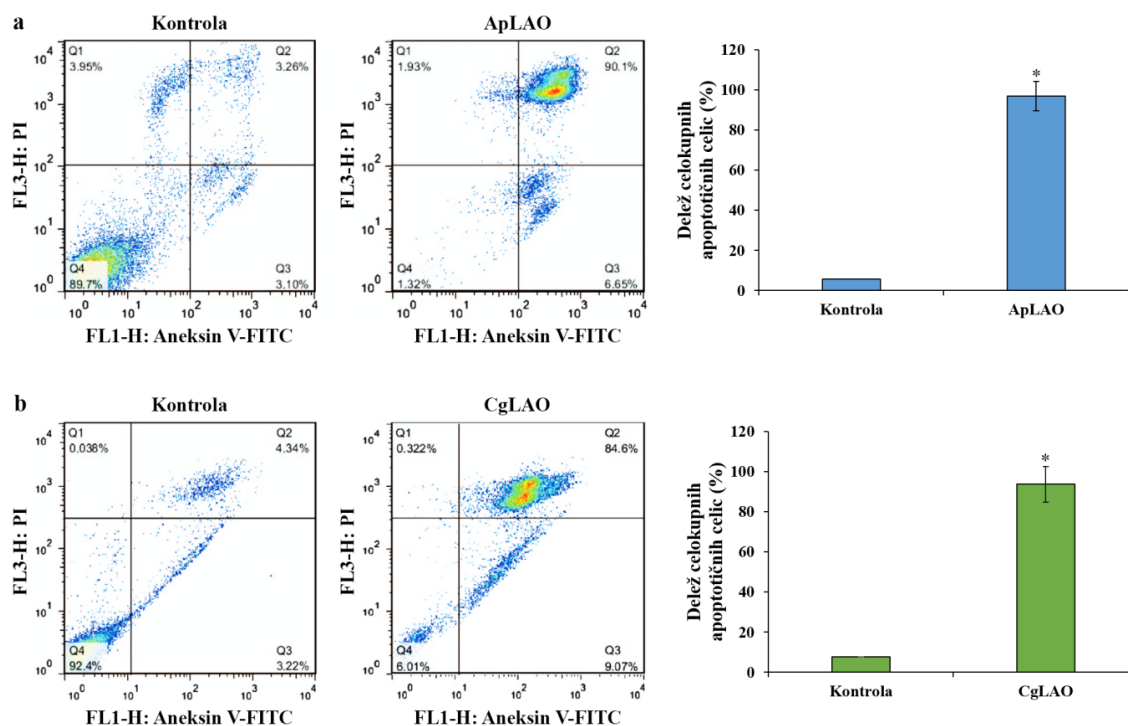
Jurkat in MCF7 celice so bile izpostavljene ApLAO (0,5 $\mu\text{g/mL}$) in CgLAO (5 $\mu\text{g/mL}$) 12, 24 in 48 ur. Po tretiranju z oksidazama je bila viabilnost celic ocenjena z MTS testom. Rezultati so podani kot povprečje \pm S.D. treh neodvisnih testov v štirih paralelkah. * $P < 0,05$.

Proteina ApLAO in CgLAO izkazujeta časovno odvisno citotoksičnost na obeh celičnih linijah, vendar je bil učinek obeh oksidaz bolj izrazit na Jurkat celični liniji. Vzrok za to je lahko posledica izvora proteina zaradi biološke razlike med obema gobama, iz katerih sta bili oksidazi izolirani.

4.2 VREDNOTENJE APOPTOZE CELIC, TRETIRANIH Z ApLAO IN CgLAO

4.2.1 ApLAO in CgLAO sprožita apoptozo

Da bi ugotovili, ali je celična smrt, ki jo povzročita oksidazi ApLAO in CgLAO, posledica apoptoze, smo proučili način celične smrti. Značilnost apoptotičnih celic je izražnje določenih molekul, kot je fosfatidilserin, na membrani celice. Delež apoptotičnih celic v vzorcih določamo s pomočjo komercialno dostopnih kompletov reagentov, ki vežejo prosti fosfatidilserin (31). Za detekcijo fosfatidilserina smo uporabili komplet Aneksin V-FITC (Aneksin V, konjugiran s fluorkromom fluorescein izotiocianatom (FITC), ki fluorescira zeleno) in reagent propidijev jodid (PI) (vgradi se samo v DNK mrtvih celic, pri detekciji s pretočnim citometrom fluorescira rdeče). Uporaba obeh reagentov v kombinaciji nam omogoča določitev deleža živih celic, zgodnje apoptotičnih, pozno apoptotičnih ter nekrotičnih celic (41). Celice Jurkat smo tretirali z ApLAO s koncentracijo 0,5 µg/mL in s CgLAO s koncentracijo 5 µg/mL za 16 ur. Kontrolne celice nismo tretirali s preiskovanima proteinoma. Z identifikacijo zgodnje apoptoze (Aneksin V-pozitivne (Aneksin V^{POS}) in PI-negativne (PI^{neg}) celice) in pozne apoptoze (Aneksin V^{POS} in PI-pozitivne (PI^{POS}) celic) smo preračunali delež celokupne apoptoze. Kvadrante smo določili glede na kontrolne Jurkat celice in celice obdelane z oksidazama; Q1-nekrotične celice, Q2-pozna apoptoza, Q3-zgodnja apoptoza in Q4-žive celice. Tretiranje Jurkat celic z ApLAO (0,5 µg/mL) je po 16. urah statistično značilno povečalo delež celic v zgodnji in pozni apoptozi, s skupnim povečanjem deleža apoptotične populacije (Q2+Q3) iz 5,8 na 96,8 % v primerjavi s kontrolnimi celicami. Rezultate prikazuje Slika 15a. Enak učinek smo opazili pri tretiranju s CgLAO, kjer se je delež apoptotičnih celic povečal iz 7,6 na 93,7 %, kot je prikazano na Sliki 15b.



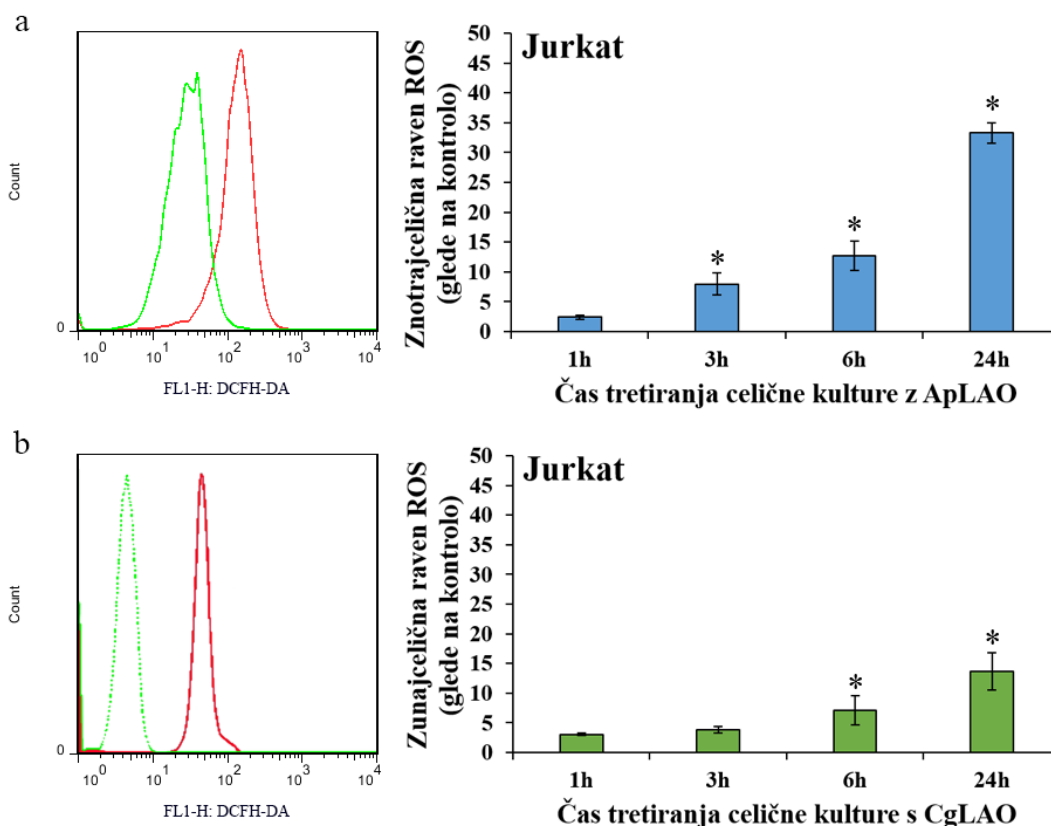
Slika 15: ApLAO (a) in CgLAO (b) sprožita apoptozo na celični kulturi Jurkat.

Celice Jurkat smo tretirali 16 ur z oksidazama ApLAO (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (a) in CgLAO (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (b). Grafični prikaz (desno) predstavlja odstotek celic, ki odražajo delež vseh celic v apoptozi. Rezultati so predstavljeni kot \pm S.D. dveh neodvisnih poskusov. * $P < 0,05$.

4.2.2 ApLAO in CgLAO sprožita apoptozo, posredovano s H₂O₂

LAO povzročajo nastajanje znatnih količin reaktivnih kisikovih vrst (ROS). Kot biološko aktivni encimi katalizirajo reakcijo, pri kateri nastaja H₂O₂, ki ga uvrščamo v reaktivne kisikove zvrsti. Slednje ustvarijo stanje oksidativnega stresa in povzročijo poškodbe DNK ter spremembe v mitohondrijski membrani, posledično se sprosti citokrom *c* iz mitohondrija v citosol, kar povzročijo sprožitev intrinzične (mitohondrijske) poti procesa apoptoze. ROS sicer nastajajo znotrajcelično v procesu mitohondrijske dihalne verige. LAO, kot že omenjeno, povzročijo povišano nastajanje ROS (H₂O₂), ki povečajo prepustnost membrane mitohondrijev, pri čemer se sprosti citokrom *c* in izvrši apoptoza (12). Količino znotrajcelično nastalih ROS, torej pokazatelja procesa apoptoze v celici, smo izmerili s pomočjo fluorescenčne probe H₂DCF-DA. Tretiranje Jurkat celične kulture bodisi z ApLAO (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) bodisi CgLAO (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) je statistično značilno povečalo nastanek ROS v odvisnosti od časa tretiranja celic. Opazili smo 33,3-kratno povečanje v številu DCF-pozitivnih celic pri 24-urnem tretiranju celic z ApLAO (Slika 16a). Podoben,

vendar manj izrazit učinek, smo opazili tudi pri 24-urnem tretiranju celic s CgLAO; znatno se je povečalo nastajanje ROS, izmerili smo za 14,7-krat večje število DCF-pozitivnih celic kot kontrolnih celicah (Slika 16b).



Slika 16: ApLAO (a) in CgLAO (b) povzročita povišano nastajanje ROS.

Jurkat celice so bile izpostavljene ApLAO (0,5 $\mu\text{g/mL}$) (a) ali CgLAO (5 $\mu\text{g/mL}$) (b) različno dolgo časa (1, 3, 6, 24 ur). Znotrajcelične ravni ROS smo izmerili s pretočno citometrijo z uporabo fluorescenčne DCFH-DA probe. Reprezentativni sliki levo kažeta analizo pretočne citometrije in nastajanja ROS, kjer zelena črta predstavlja kontrolne Jurkat celice, rdeča pa celice, tretirane z ApLAO (a) ali s CgLAO (b). Grafa na desni strani slike prikazujeta analizo nastanka spojin ROS kot relativni delež DCF-pozitivnih celic normaliziranih na ustrezne kontrolne celice. Rezultati so predstavljeni kot povprečje \pm S.D. vsaj dveh neodvisnih poskusov. * $P < 0,05$.

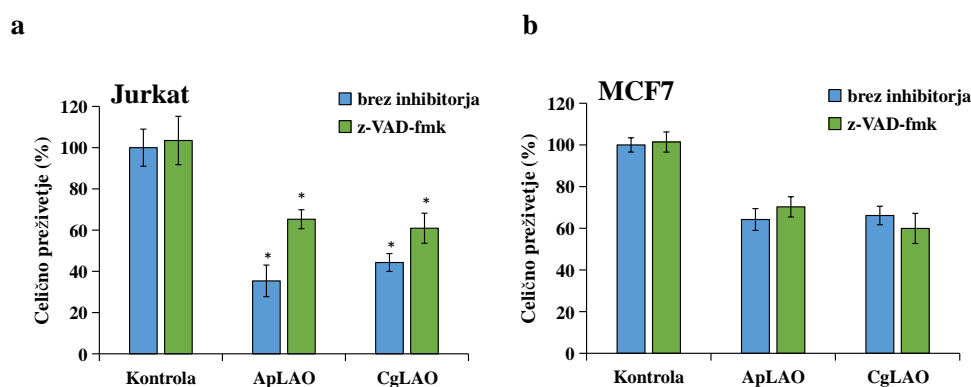
4.3 OPREDELITEV MEHANIZMA APOPTOZE, POVZROČENE Z ApLAO IN CgLAO

V prvem delu naloge smo ugotovili, da proteina ApLAO in CgLAO povzročita koncentracijsko- in časovno-odvisno citotoksičnost na celicah Jurkat in MCF7, hkrati pa

smo pokazali, da v izbranih, toksičnih koncentracijah povzročita proces apoptoze. Zato smo v nadaljevanju želeli opredeliti mehanizem apoptoze, preko katerega proteina izkazujeta toksično aktivnost.

4.3.1 Vrednotenje kaspazno odvisne apoptoze s kaspaznim inhibitorjem z-VAD-fmk

V kaspazno odvisni apoptozi imajo pri signaliziranju poti osrednjo vlogo endoproteaze kaspaze, zaradi česar veljajo za glavne vršilce celične smrti. Z aktivacijo le-teh se sproži vrsta zaporednih proteoliznih reakcij, ki vodijo v celično smrt (50). S prehodnimi poskusi smo ugotovili, da preiskovani oksidazi sprožita nadzorovano celično smrt. Z nadaljnimi poskusi smo želeli preučiti mehanizem apoptoze. Preveriti smo želeli, ali v mehanizmu apoptoze sodelujejo kaspaze, zato smo celice Jurkat in MCF7 najprej tretirali z nereverzibilnim zaviralcem družine kaspaz, z-VAD-fmk (10 μ M) za 30 minut. Nato smo celicam dodali ApLAO (0,5 μ g/mL) in CgLAO (5 μ g/mL) in po končani 24-urni inkubaciji preverili celično preživetje s pomočjo uporabe MTS reagenta. Izmerili smo absorbanco, absolutne vrednosti meritev pa so nam služile za izračun deleža celičnega preživetja. Kontrolne celice so bile celice, ki jih nismo tretirali z oksidazama. Rezultate smo podali kot povprečje \pm S.D. treh neodvisnih poskusov in jih prikazuje Slika 17.

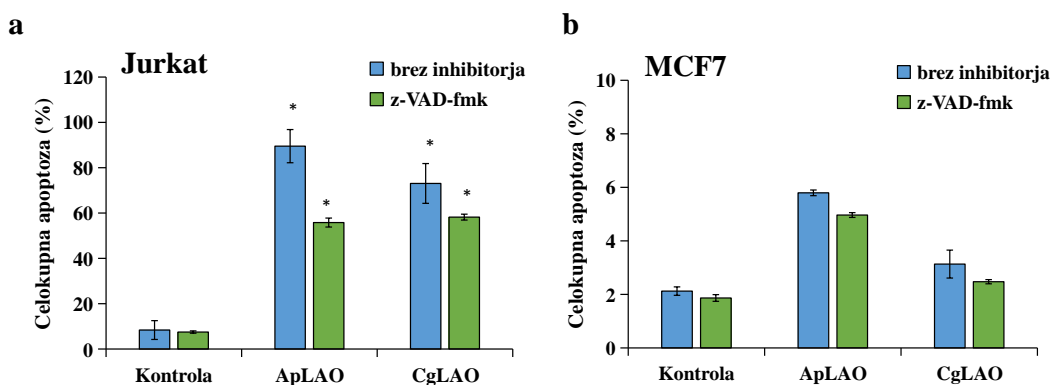


Slika 17: Delež celičnega preživetja celic Jurkat (a) in MCF7 (b) tretiranih z ApLAO in CgLAO v prisotnosti in odsotnosti inhibitorja z-VAD-fmk.

Celice Jurkat in MCF7 smo tretirali s pan-specifičnim kaspaznim zaviralcem z-VAD-fmk (10 μ M) za 30 minut ter nato dodatno tretirali s ApLAO (0,5 μ g/mL) in CgLAO (5 μ g/mL). Po 24. urah smo ocenili celično preživetje Jurkat (a) in MCF7 celic (b) z MTS testom. Rezultate predstavljajo povprečja \pm S.D. treh biološko neodvisnih poskusov. * $P < 0,05$.

Pan-specifični kaspazni zaviralec je delno odpravil citotoksične učinke ApLAO in CgLAO v Jurkat celicah, in sicer bolj izrazito pri ApLAO oksidazi, ki na celice deluje bolj citotoksično (Slika 17a). Pri celični kulturi MCF7, ki smo jo tretirali s preiskovanima oksidazama v prisotnosti in odsotnosti inhibitorja z-VAD-fmk, ni bilo opaziti statistično značilnega zmanjšanja celične smrti MCF7 celic (Slika 17b). To nakazuje na možne druge poti sproženja apoptoze, ki niso odvisne od kaspaz.

V nadaljevanju smo vpliv pankaspaznega inhibitorja želeli preveriti tudi na sproženo apoptozo celic Jurkat in MCF7, povzročeno po tretiranju z ApLAO in CgLAO. Celice Jurkat smo najprej tretirali 30 minut z inhibitorjem z-VAD-fmk (10 μ M), nato pa tretirali z ApLAO (0,5 μ g/mL) in CgLAO (5 μ g/mL). Po 16. urah inkubiranja z oksidazama smo določili delež apoptotičnih celic s pomočjo pretočnega citometra z označevanjem celic z Aneksinom V-FITC in PI. Slika 18 prikazuje rezultate analize deleža apoptoze celic Jurkat (Slika 18a) in celic MCF7 (Slika 18b), ki predstavlja delež vseh, zgodnje apoptoznih kot tudi pozno apoptoznih celic.



Slika 18: ApLAO in CgLAO sprožita od kaspaz odvisno pot apoptoze.

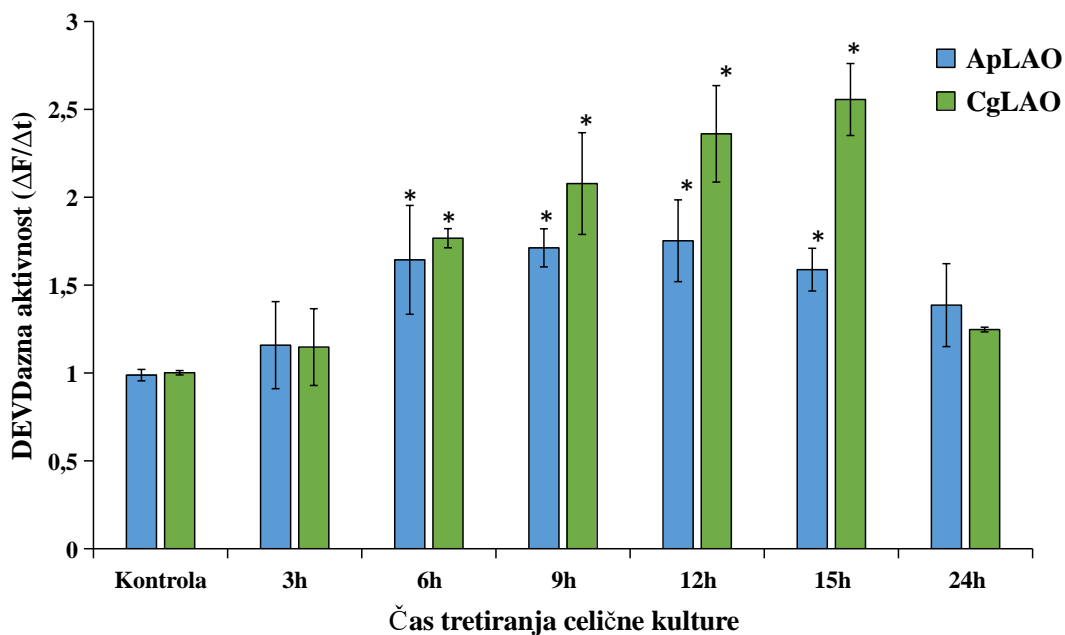
Po 16. urah tretiranja celic Jurkat (a) in MCF7 (b) z ApLAO (0,5 μ g/mL) in CgLAO (5 μ g/mL) smo delež celokupnih apoptotičnih celic ocenili s pretočno citometrijo in predhodno uporabo Aneksina V in PI. Grafi prikazujejo deleže celokupnih apoptotičnih celic v prisotnosti in odsotnosti pankaspaznega inhibitorja z-VAD-fmk v Jurkat (a) in MCF7(b) celicah. Rezultati so podani kot povprečje \pm S.D. vsaj dveh biološko neodvisnih poskusov. * $P < 0,05$

Tretiranje celic Jurkat s kaspaznim inhibitorjem z-VAD-fmk je statistično značilno zmanjšalo delež celokupnih apoptotičnih celic po tretiranju z ApLAO iz $96,8 \pm 7,3$ na $55,8$

$\pm 2,0$ %, kot tudi delež celokupnih apoptotičnih celic po tretiranju z CgLAO iz $93,7 \pm 8,8$ na $58,2 \pm 1,3$ %, pri čemer pa je bil vpliv inhibitorja manjši pri CgLAO kot ApLAO (Slika 18a). Nasprotno se delež apoptotičnih MCF7 celic, tretiranih z oksidazama ApLAO in CgLAO v prisotnosti z-VAD-fmk ni znatno zmanjšal; delež apoptoze, povzročene z ApLAO se je znižal iz $5,8 \pm 0,1$ % na $5,0 \pm 0,1$ % in s CgLAO iz $3,1 \pm 0,5$ % na $2,5 \pm 0,1$ %. Pridobljeni rezultati torej kažejo na ključno vlogo kaspaz pri sprožitvi apoptoze celic Jurkat po tretiranju z oksidazama ApLAO in CgLAO.

4.3.2 Vrednotenje aktivnosti kaspaz-3, -8 in -9

V nadaljevanju smo izvedli poskuse za merjenje encimske aktivnosti kaspaz z namenom potrditve predpostavke, da oksidazi ApLAO in CgLAO povzročita kaspazno odvisno celično smrt. Aktivacija kaspaz lahko poteka preko intrinzične ali ekstrinzične signalne poti, ne glede na signalno pot pa izvrši apoptozo aktivirana izvršilna kaspaza-3. Slednja z aktivacijo citoplazemskih endonukleaz in proteaz povzroči citomorfološke in biokemične spremembe, ki vodijo v tvorbo apoptotičnih telesc (6). Kaspazno aktivnost smo določali spektrofotometrično z ustreznimi fluorescentnimi substrati, specifičnimi za posamezno kaspazo. Za merjenje aktivnosti kaspaze-3 smo uporabili specifični substrat Ac-DEVD-AFC (33, 34). Na celicah Jurkat smo želeli pokazati vpliv oksidaz ApLAO in CgLAO na aktivacijo kaspaze-3 v časovni odvisnosti tretiranja. V ta namen smo celice Jurkat tretirali s proteinoma ApLAO ($0,5 \mu\text{g/mL}$) in CgLAO ($5 \mu\text{g/mL}$). Po 3-, 6-, 9-, 12-, 15- in 24-urni inkubaciji smo pripravili celične lizate. S pomočjo določevanja koncentracije proteinov po Bradfordu smo uporabili zahtevano količino proteinov in s pomočjo substrata Ac-DEVD-AFC določili aktivnost kaspaze-3 v posameznem celičnem lizatu. Rezultati, ki smo jih dobili po merjenju fluorescence v odvisnosti od časa, so predstavljeni na Sliki 19.



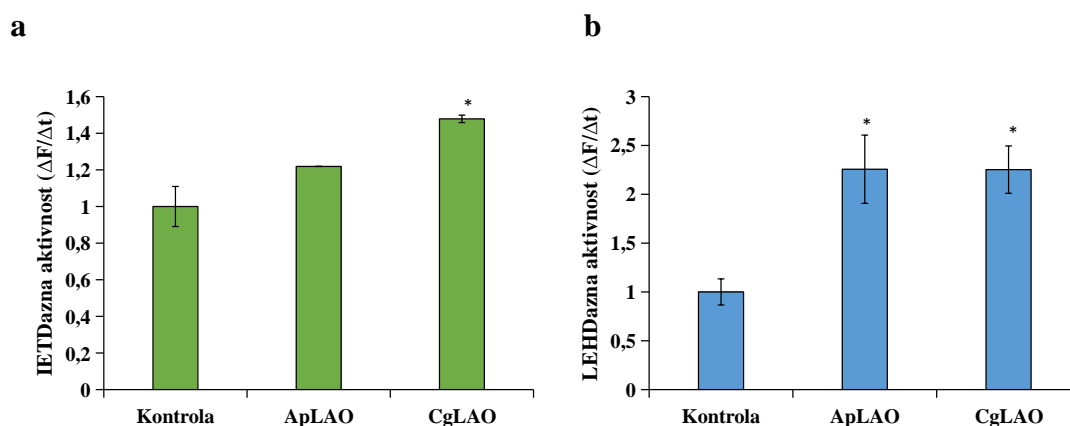
Slika 19: Časovna odvisnost aktivnosti kaspaze-3 na celicah Jurkat, tretiranih z ApLAO in CgLAO.

Jurkat celice smo tretirali z ApLAO (0,5 $\mu\text{g/mL}$) in CgLAO (5 $\mu\text{g/mL}$) za 3, 6, 9, 12, 15 in 24 ur. Aktivnost kaspaze-3 v celičnih lizatih smo določili fluorometrično, z uporabo specifičnega substrata za kaspazo -3/7 (Ac-DEVD-AFC). Rezultat je predstavljen kot sprememba fluorescence v odvisnosti od časa ($\Delta F/\Delta t$) in ga podaja povprečje \pm S.D. vsaj dveh neodvisnih poskusov, izvedenih v dveh paralelkah. * $P < 0,05$.

Pri tretiranju Jurkat celic z ApLAO (0,5 $\mu\text{g/mL}$) se je povečevala aktivnost kaspaze-3 z daljšanjem časa tretiranja, najvišjo porast aktivnosti (glede na kontrolo) pa smo opazili pri 12. urah, zato smo za nadaljne poskuse ter primerjave aktivnosti kaspaz izbrali časovno točko 12 ur. Podobno je tretiranje Jurkat celic z oksidazo CgLAO (5 $\mu\text{g/mL}$) vodilo v statistično značilno povišanje aktivnosti kaspaze-3 po 12. urah (Slika 19).

Z namenom določitve mehanizma kaspazno-odvisne poti apoptoze smo v nadaljevnaju ovrednotili še aktivnost kaspaze-8 in kaspaze-9 po tretiranju z oksidazama. Kaspaza-8 je udeležena pri ekstrinzični signalni poti apoptoze, kaspaza-9 pa v intrinzični, obe pa uvrščamo med sprožilne kaspaze, ki apoptozne procese spodbudijo z aktivacijo izvršilnih, kot je kaspaza-3 (6). Celice Jurkat smo 12 ur tretirali z oksidazama ApLAO (0,5 $\mu\text{g/mL}$) in CgLAO (5 $\mu\text{g/mL}$), nato pa fluorometrično pomerili aktivnost kaspaz v celičnih lizatih. Pri določanju aktivnosti kaspaze-8 smo uporabili specifični substrat Ac-IETD-AFC, za

merjenje aktivnosti kaspaze-9 pa substrat Ac-LEHD-AFC. Tako ApLAO kot CgLAO sta po 12-urnem tretiranju celic Jurkat statistično značilno povečala aktivnost kaspaze-8 (Slika 20a) kot tudi aktivnost kaspaze-9 (Slika 20b), povišana aktivnost pa je bila bolj izrazita pri kaspazi-9. Rezultati, ki jih prikazuje Slika 20, kažejo, da tako CgLAO kot ApLAO sprožita od kaspaz odvisno apoptozno pot v Jurkat celicah. Aktivacija sprožilnih kaspaz-8 in -9, nakazuje tako intrinzično kot ekstrinzično pot apoptoze, vendar s prevladujočo intrinzično signalno potjo, glede na znatno višjo aktivnost kaspaze-9 v primerjavi s kaspazo-8.



Slika 20: Relativna aktivnost kaspaze-8 in kaspaze-9 v Jurkat celicah, tretiranih z ApLAO in CgLAO .

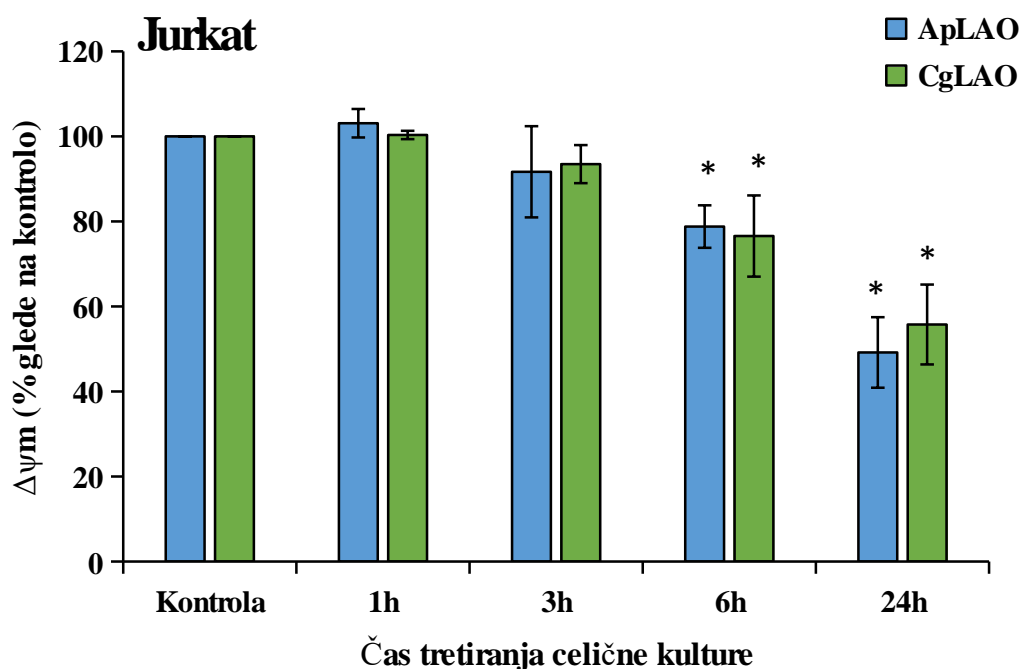
Jurkat celice smo tretirali z ApLAO (0,5 μg/mL) in CgLAO (5 μg/mL) za 12 ur. Aktivnost kaspaze-8 in kaspaze-9 v celičnih lizatih smo določili fluorometrično z uporabo specifičnih substratov. Rezultati so predstavljeni kot sprememba fluorescence v odvisnosti od časa ($\Delta F/\Delta t$) in jih podaja povprečje \pm S.D. vsaj dveh neodvisnih poskusov izvedenih v dveh paralelkah. * $P < 0,05$.

4.4 ApLAO IN CgLAO SPROŽITA INTRINZIČNO POT APOPTOZE

4.4.1 Vrednotenje mitohondrijskega transmembranskega potenciala (MTP)

Poškodba mitohondrijev ima zelo pomembno vlogo v sproženju intrinzične poti apoptoze. Sprožijo se znotrajcelični signali smrti, ki povzročijo znižanje mitohondrijskega transmembranskega potenciala (MTP), iz membranskega prostora pa se v citosol sprosti citokrom *c*, ki z vezavo s proteinom Apaf-1 in prokaspazo-9 tvori apoptosom. Nadalje se sproži kaskada reakcij, ki aktivirajo kaspazo-3 in ta izvrši proces apoptoze (51). S proučevanjem in merjenjem znotrajcelično nastalih ROS ter pri znatno povišani aktivnosti kaspaz-3 in -9, ne pa tudi kaspaze-8, smo domnevali, da tretiranje z oksidazama ApLAO in

CgLAO povzroči od kaspaz odvisno intrinzično pot apoptoze. Z namenom potrditve domneve o sprožitvi intrinzične poti, ki smo jo opazili, smo izvedli poskuse z merjenjem MTP. Padec celičnega MTP je eden izmed kazalcev intrinzične signalne poti apoptoze (4, 51). Spremembe MTP ($\Delta\psi_m$) smo ocenili z uporabo pretočnega citometra. Po tretiranju Jurkat celic z ApLAO (0,5 $\mu\text{g/mL}$) ali CgLAO (5 $\mu\text{g/mL}$) smo celice označili s probo za označevanje funkcije mitohondrijev, natančneje, uporabili smo barvilo MitoTracker Red CMXROS. Potek padca MTP smo opazovali v različnih časovnih točkah tretiranja z oksidazama. Z analizo meritev fluorescence na pretočnem citometru smo določili padec mitohondrijskega transmembranskega potenciala, ki nakazuje na spremembe v membrani mitohondrijev, kar prikazuje Slika 21.



Slika 21: Padec MTP ($\Delta\psi_m$) v odvisnosti od časa tretiranja Jurkat celic z ApLAO in CgLAO.

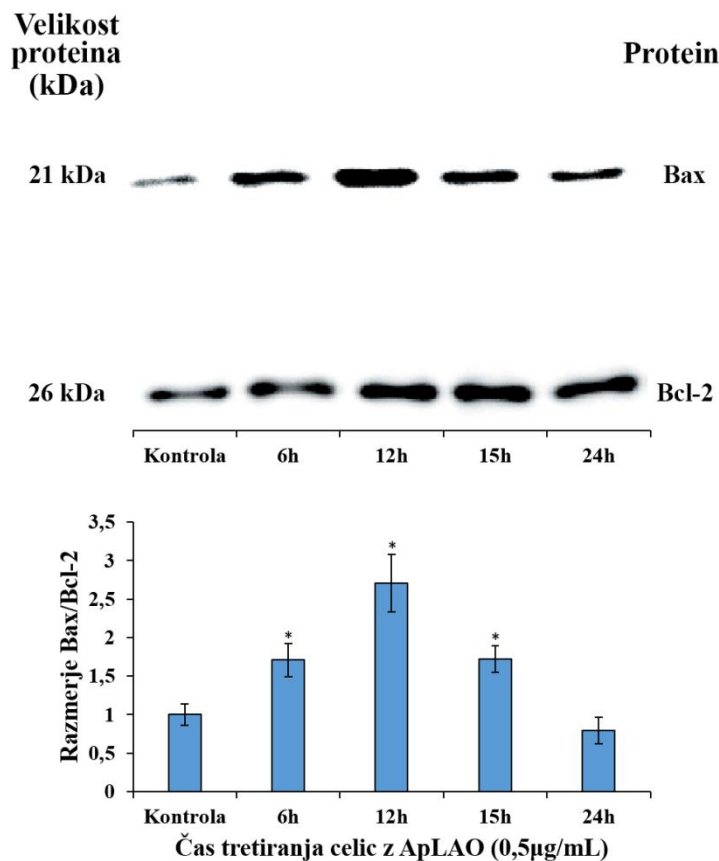
Celice Jurkat smo tretirali z ApLAO (0,5 $\mu\text{g/mL}$) ali CgLAO (5 $\mu\text{g/mL}$) v različnih časovnih točkah (1, 3, 6, 24 ur). Rezultat podaja povprečje \pm S.D. dveh neodvisnih testov, vsak izveden v dveh paralelkah. * $P < 0,05$.

Statistično značilno odstopanje $\Delta\psi_m$ se je pojavilo po šestih urah tretiranja celične kulture Jurkat z oksidazama ApLAO (0,5 $\mu\text{g/mL}$) in CgLAO (5 $\mu\text{g/mL}$). S povečevanjem časa tretiranja se je pri obeh padec MTP še povečeval. Po 24. urah tretiranja ApLAO se je $\Delta\psi_m$

znižal na $49,2 \pm 6,2\%$ glede na kontrolne netretirane celice. Po 24-urnem tretiranju s CgLAO se je $\Delta\psi_m$ zmanjšal na $55,7 \pm 8,3\%$, v primerjavi s kontrolnimi netretiranimi celicami. Pridobljeni rezultati nakazujejo, da oksidazi s svojim toksičnim delovanjem okrneta celovitost membrane mitohondrijev in posledično povzročita intrinzično pot apoptoze.

4.4.2 Vpliv ApLAO in CgLAO na izražanje proteinskega nivoja apoptotičnih signalnih molekul

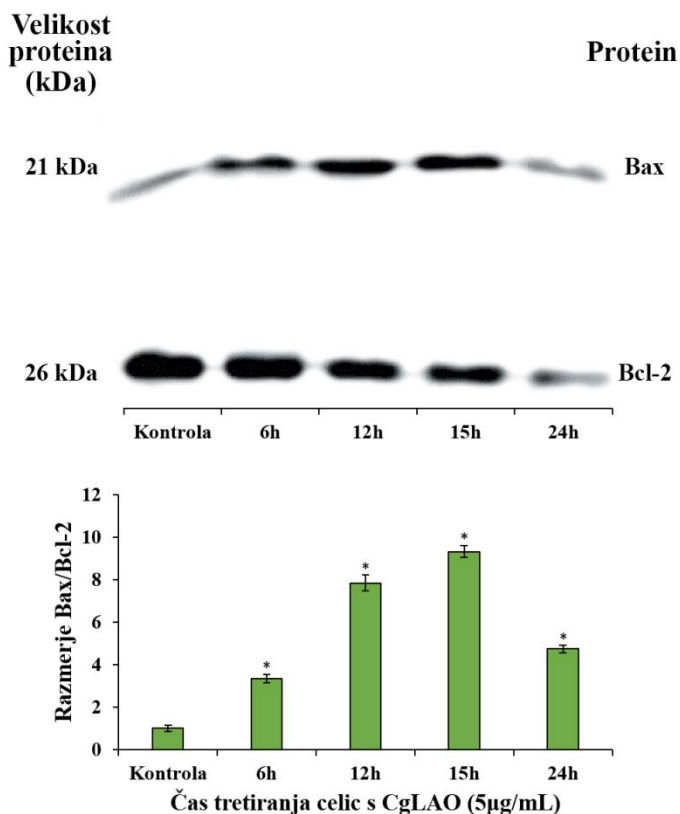
Osrednji regulatorji intrinzične poti apoptoze so proteini družine B-celičnega limfoma 2 (Bcl-2), ki jih nadzira tumorsupresorski protein p53. Bcl-2 proteini sodelujejo pri uravnavanju permeabilnosti zunanje membrane mitohondrija in posledično vplivajo na padec mitohondrijskega transmembranskega potenciala in sproščanje citokroma *c* (4, 51). ApLAO in CgLAO povzročata mitohondrijske nepravilnosti v Jurkat celicah in sprožita intrinzično pot apoptoze, kar smo predhodno ocenili z merjenjem MTP, ki se je značilno znižal ob tretiranju z obema LAO in porastom v aktivnosti kaspaze-9. Zato smo nadalje ocenili vpliv oksidaze na izražanje signalnih molekul, ki so udeležene v procesu apoptoze. S pomočjo NaDS PAGE in prenosa western smo na Jurkat celični liniji proučili proteinski nivo proapoptotičnega proteina Bax in antiapoptotičnega Bcl-2. Najprej smo pripravili vzorce celičnih lizatov z enako koncentracijo proteinov. Vzorce smo nanесли na gel in proteine ločili z elektroforezo v reducirajočih pogojih, nato pa jih prenesli na nitrocelulozno membrano z metodo prenosa western. Proteine smo detektirali z ozačevanjem s specifičnimi primarnimi in sekundarnimi protitelesi, kot je navedeno v metodah. Z določitvijo proteinske ravni β -aktina smo preverili enakomernost nanosa preiskovanih vzorcev. Izražanje Bax in Bcl-2 proteina smo normalizirali glede na proteinsko raven β -aktina. Analizo proteinske ravni izražanja signalnih molekul prikazujeta Sliki 22 in 23.



Slika 22: Proteinski nivo izražanja signalnih proteinov Bax in Bcl-2 v odvisnosti od časa tretiranja Jurkat celic z ApLAO.

*Učinek ApLAO (0,5 µg/mL) na izražanje proteina Bax in Bcl-2 na Jurkat celicah glede na čas tretiranja. Lisi predstavljata nivo izražanja proteina Bax in Bcl-2, grafa predstavljata razmerje izražanja proteinov Bax/Bcl2 relativno glede na kontrolne netretirane celice. Rezultati so podani kot povprečje ± S.D. dveh neodvisnih poskusov. * $P < 0,05$.*

Izražanje proapoptotičnega Bax proteina pri Jurkat celicah tretiranih z ApLAO (0,5 µg/mL) se statistično značilno poveča in je najbolj izraženo pri 6-, 12- in 15-urnem tretiranju. Podobno ApLAO povzroči rahlo zvišanje izražanja antiapoptotičnega Bcl-2 signalnega proteina v odvisnosti od časa tretiranja, kar je prikazano na Sliki 20. Razmerje med proapoptotičnim proteinom in antiapoptotičnim proteinom (Bax/Bcl-2) se znatno poveša po tretiranju z ApLAO in je najbolj izrazito po 12. urah, kar dodatno nakazuje na ApLAO-spodbujeno aktivacijo apoptozne kaskade preko mitohondrijske poti.



Slika 23: Proteinski nivo izražanja signalnih proteinov Bax in Bcl-2 v odvisnosti od časa tretiranja Jurkat celic s CgLAO.

*Učinek CgLAO (5 µg/mL) na izražanje proteina Bax in Bcl-2 na Jurkat celicah glede na čas tretiranja. Lisi predstavljata nivo izražanja proteina Bax in Bcl-2, grafa predstavljata razmerje izražanja proteinov Bax/Bcl2 relativno glede na kontrolne netretirane celice. Rezultati so podani kot povprečje ± S.D. dveh neodvisnih poskusov. * $P < 0,05$.*

Izražanje proapoptotičnega Bax proteina pri Jurkat celicah tretiranih s CgLAO (5 µg/mL) se statistično značilno poveča in je tudi najbolj izraženo pri 6-, 12- in 15-urnem tretiranju, podobno kot pri ApLAO. Nasprotno je oksidaza CgLAO zmanjšala ekspresijo Bcl-2 proteina. Kljub temu je tretiranje celic Jurkat s CgLAO povzročilo povečano razmerje Bax/Bcl-2 v prid proapoptotičnega signala za apoptozo, kar nakazuje na mitohondrijsko odvisno sproženo apoptozo, enako kot smo pokazali za delovanje ApLAO.

5 RAZPRAVA

Mnogi znanstveniki se v zadnjem času posvečajo proučevanju L-aminooksidaz, izoliranih iz bakterij, gliv, rastlin in raznih živali, ker izkazujejo raznovrstne biološke in farmakološke učinke kot so: sproženje apoptoze, hemolitično, hemoragično, protivirusno, protimikrobno delovanje in agregacija trombocitov (13). Najbolj obširno raziskovane so LAO, izolirane iz različnih kačjih strupov (18). Te so termolabilne, zato se pozornost usmerja na LAO mikrobnege izvora (22). Nedavne raziskave so pokazale, da LAO, ki so jih izolirali iz nekaterih vrst gob, izkazujejo protitumorne učinke na več celičnih linijah in bi jih lahko uporabili kot induktorje apoptoze v razvoju novih učinkovitejših protirakavih terapij (21-24).

Namen naše raziskave je bil proučiti toksične učinke toksogeina, izoliranega iz gobe pozne livke (*Clitocybe geotropa*) (CgLAO) v primerjavi z učinki toksofalina, citotoksičnega proteina, izoliranega iz zelene mušnice *Amanita phalloides* (ApLAO), na človeških tumorskih celičnih kulturah Jurkat in MCF7. V magistrski nalogi smo ugotovili, da je oksidaza CgLAO povzročila podoben citotoksični učinek, kot ga je povzročila oksidaza ApLAO ter da je potrebna LAO encimska aktivnost, da preiskovani oksidazi povzročita apoptozo. S podrobnejšo proučitvijo mehanizma z LAO povzročene toksičnosti na Jurkat celicah smo pokazali, da sta obe oksidazi izolirani iz gob, tako ApLAO kot tudi CgLAO, sprožili od kaspaz odvisno apoptozo.

Mnoge raziskave endoproteaz LAO so pokazale, da LAO kažejo specifično citoksičnost glede na vrsto celičnih linij in v odvisnosti od koncentracije povzročijo bodisi apoptozo bodisi nekrozo (20, 23-25). S proučevanjem citotoksičnosti ApLAO in CgLAO na Jurkat in MCF7 celicah, smo v naši raziskavi ugotovili, da obe LAO sprožita celično smrt v odvisnosti tako od časa tretiranja kot od koncentracije. Ugotovili smo tudi, da obe oksidazi delujeta podobno na posamezni uporabljeni celični kulturi, vendar povzročita različno citotoksičnost glede na vrsto celic. Oba oksidazi sta delovali bolj citotoksično na človeške Jurkat T-limfocite akutne levkemije kot na MCF7 celice adenokarcinoma dojke. Naše ugotovitve tako sovpadajo s predhodnimi raziskavami, ki so pokazale višjo občutljivost Jurkat celične linije na toksične učinke gobjih LAO v primerjavi s celičnimi linijami, podobnimi MCF7 (23, 24).

Z LAO posredovana celična smrt je posledica dolgotrajne izpostavljenosti visoki ravni H_2O_2 , ki povzroča oksidativni stres in ga uvrščamo med ROS. Pogoji dolgotrajnega ali visokega oksidativnega stresa povzročijo poškodbe celične membrane in posledično nabrekanje celične membrane, krčenja celice ter povišanje prepustnosti membrane, kar vodi v celično lizo in smrt celice (3). Citotoksičnost LAO katjega izvora je v veliki meri povezana s proizvodnjo H_2O_2 , kot so to pokazale številne raziskave (16, 17). To so pokazali tudi v raziskavi, kjer so preiskovali delovanje apoksina-1, izoliranega iz strupa klopotače. Ugotovili so, da dodatek katalaze, ki je odstranjevalec H_2O_2 , zniža učinek le-tega; namreč H_2O_2 kot produkt oksidativne katalize inducira apoptozo, dodatek katalaze pa je inhibiral apoptozo na več celičnih linijah, tretiranih z apoksinom-1 (52).

Vendar nedavne raziskave kažejo tudi, da LAO lahko povzročijo kaspazno odvisno pot apoptoze, ne le posredovano zaradi direktne citotoksičnosti H_2O_2 na celice (21, 53, 54). Vendar je bilo to dokazano le za LAO katjega izvora, medtem ko v predhodni raziskavi LAO gobjega izvora, kot je toksofalin, apoptoza sprožena v sesalskih celicah ni bila odvisna od aktivacije kaspazne kaskade (23). Nasprotno, v naši magistrski nalogi smo pokazali, da je zaviralec kaspazne družine z-VAD-fmk delno zaščitil celice pred citotoksičnimi in apoptoznimi signali, kar kaže na vpletenost kaspaz kot izvršiteljev apoptoze v določenih eksperimentalnih pogojih. Ta učinek je bil statistično značilen le pri bolj na LAO občutljivi Jurkat celični liniji, medtem ko pri celični liniji MCF7, tretirani z ApLAO in CgLAO v prisotnosti in odsotnosti inhibitorja z-VAD-fmk, ni bilo zaznati večjih sprememb pri apoptozi, ki sta jo povzročila omenjeni LAO. Slednje kaže, da preiskovani LAO povzročita pri MCF7 celični kulturi bolj izražen proces nekroze kot apoptoze. Sklepamo lahko, da sta način delovanja LAO in raven citotoksičnosti odvisna od vrste in izvora celične linije. Z raziskavami so namreč pokazali, da so tumorske celice različnega izvora različno občutljive za signale, ki sprožijo proces apoptoze. Na primer, hematopoetske celice, kamor uvrščamo tudi Jurkat celično linijo, imajo nižji prag občutljivosti za oksidativni stres; posledično se hitreje sproži proces apoptoze, kot nehematopoetske celice, kot so MCF7 celice (epitelijske celice). Višja citotoksičnost LAO je lahko posledica povečanega kopičenja H_2O_2 v hematopoetskih celicah (55). Prisotnost LAO specifičnih receptorjev ali tarč v različnih celičnih linijah, ki so vključene v sproženje celične smrti, ostajajo neznani in jih je potrebno še raziskati.

LAO iz kačjega strupa povzročijo od kaspaz odvisno pot apoptoze preko intrinzične (mitohondrijske) ali ekstrinzične (receptorske, DR) poti (21, 53, 54). Intrinzično pot sprožijo poškodbe membrane zaradi povišanega nastajanja ROS, ki depolarizacijo mitohondrijsko membrano. Posledično se iz mitohondrijev v citosol sprosti citokroma *c*, s čimer se aktivira prokaspaza-9. Ta se avtokatalizira v aktivno kaspazo-9 in vodi v aktivacijo kaspaze-3 (3, 4, 9, 11, 51). V nalogi smo pokazali, da tretiranje celic Jurkat, bodisi z ApLAO bodisi s CgLAO, aktivira kaspazo-3 in -9, relativna aktivnost obeh kaspaz pa narašča z daljšanjem časa tretiranja.

Ugotovili smo tudi, da tretiranje celične linije Jurkat z ApLAO in CgLAO v procesu celične smrti povzroči padec mitohondrijskega transmembranskega potenciala ($\Delta\psi_m$), kar potrjuje domnevo, da obe preiskovani oksidazi sprožita intrinzično pot apoptoze. Intrinzično pot regulirajo proteini družine B-celičnega limfoma 2 (Bcl-2), ki jih nadzira tumorsupresorski protein p53. Bcl-2 proteini sodelujejo pri uravnavanju permeabilnosti zunanje membrane mitohondrija ter posledično vplivajo na padec mitohondrijskega transmembranskega potenciala in sproščanje citokroma *c* (4, 51). Večinoma intrinzično pot urejata antiapoptotični protein Bcl-2 in proapoptotični protein Bax (51). V nalogi smo preverili nivo izražanja obeh proteinov, rezultate pa predstavili v razmerju Bax/Bcl-2. Njuno razmerje je boljši kazalec apoptoze kot zgolj njuni ravni izražanja, saj predstavlja odnos med proapoptotičnimi proteini in antiapoptotičnimi. Ugotovili smo, da se je razmerje Bax/Bcl-2 povišalo v odvisnosti od časa tretiranja Jurkat celic tako z ApLAO kot s CgLAO. S tem smo dodatno potrdili, da sta preiskovani oksidazi ApLAO in CgLAO udeleženi v procesu intrinzične signalne poti apoptoze.

Analiza rezultatov je pokazala tudi povišano aktivnost kaspaze-8, sicer relativno izraženo v manjši meri kot pri kaspazi-3 in -9. Povečanje aktivnosti kaspaze-8 lahko kaže, da ima Fas receptor določeno vlogo v celični smrti, ki ju sprožita obe oksidazi. To pot bi bilo potrebno nadalje preučiti. Ugotovitev tako nakazuje tudi udeležnost preiskovanih citotoksičnih ApLAO in CgLAO v ekstrinzični signalni poti apoptoze. Ekstrinzično pot apoptoze sproži vezava ligandov na ustrezne receptorje smrti (DR), kot je Fas (4). Posledično se sproži vrsta zaporednih reakcij, ki vodijo v aktivacijo prokaspaze-8 v aktivno sprožilno kaspazo-8, slednja pa sproži aktivacijo izvršilne kaspaze-3 (6).

Rezultati, ki smo jih pridobili v magistrski nalogi, kažejo nov mehanizem celične smrti, ki ga sprožita L-aminooksidazi, izolirani iz gob *A. Phalloides* (ApLAO) in *C. Geotropa*

(CgLAO). Raziskava je pokazala, da sta obe LAO bolj specifični za Jurkat celično linijo. ApLAO in CgLAO sta torej sprožili od kaspaz odvisno intrinzično signalno pot apoptoze, ki povzroči motnje v delovanju mitohondrijev. Povišalo se je nastajanje znotrajceličnih ROS, pri čemer se je posledično depolarizirala mitohondrijska membrana, pokazano z zmanjšanjem $\Delta\psi_m$, povečalo se je razmerje Bax/Bcl-2 proteinov. Pri tem se je posledično aktivirala kaspaza-9, kar je vodilo v aktivacijo kaspaze-3, ki je izvršila proces apoptoze. Pri magistrskem delu smo ugotovili tudi zvišano aktivnost kaspaze-8, ki nakazuje udeležnost ekstrinzične poti aktivacije celične smrti, povzročene s tretiranjem z ApLAO in CgLAO. Kot smo že omenili, lahko LAO, izolirane iz kačjega strupa, ovirajo procese celičnega cikla proliferacije rakavih celic, sprožijo apoptozo in učinkovito zavirajo rast tumorjev ter imajo velik potencial za razvoj novih protitumornih učinkovin (12, 18, 53, 56). Vendar je večina LAO kačjega izvora temperaturno neobstojevnih proteinov in so zato manj primerne v formulaciji zdravil. Novo-izolirane LAO drugih virov, kot so gobe, tako lahko znatno povečajo uporabnost LAO v razvoju načrtovanja novih protitumornih terapij.

6 SKLEP

L-aminokislinski oksidazi (LAO) delujeta toksično na celični liniji Jurkat in MCF7, vendar je citotoksičen učinek bolj izrazit pri Jurkat celicah. Medsebojna primerjava oksidaz kaže na višjo citotoksičnost toksofalina (ApLAO) kot toksogeina (CgLAO). Jakost toksičnega delovanja in posledično celična smrt, ki jo povzročita ApLAO in CgLAO na celični liniji Jurkat in MCF, je odvisna tako od koncentracije, kot tudi od časa tretiranja celic z oksidazama.

L-aminooksidazi morata biti biološko aktivna encima, da povzročita citotoksično delovanje. ApLAO in CgLAO sprožita apoptozo, posredovano s H_2O_2 (ROS).

ApLAO in CgLAO povzročita apoptozo Jurkat in MCF celic, kar je pokazal povečan delež celokupnih apoptotičnih celic. Delež le-teh se je značilno zmanjšal ob dodatku pankaspaznega inhibitorja z-VAD-fmk pri Jurkat celicah, kar nakazuje na kaspazno odvisno pot apoptoze. Oksidazi povzročita znatno povišanje aktivnosti kaspaz-3 in -9 v celicah Jurkat, kar potrjuje od kaspaz odvisno intrinzično pot apoptoze. Hkrati sta oksidazi ApLAO in CgLAO povzročili aktivacijo kaspaze-8, vendar v manjši meri, kar nakazuje možnost njune udeležnosti v apoptozi tudi preko ekstrinzične poti.

Z nadaljnimi poskusi na Jurkat celicah smo potrdili domnevo, da ApLAO in CgLAO sprožita intrinzično oz. mitohondrijsko pot apoptoze s povečanim nastajanjem reaktivnih kisikovih zvrst (ROS) in padcem mitohondrijskega transmembranskega potenciala v odvisnosti od časa tretiranja celic Jurkat z obema oksidazama. Ob inkubaciji Jurkat celic z ApLAO in CgLAO se je povišalo razmerje med proapoptotičnim Bax in antiapoptotičnim Bcl-2 signalnim proteinom, kar vodi v sprožitev signalov za apoptozo. Slednje dodatno potrjuje ugotovitev, da ApLAO in CgLAO povzročita intrinzično pot apoptoze.

7 LITERATURA

1. G Kroemer L, Galluzzi L et al.: Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation* 2009; 16, 3–11.
2. Galluzzi L, Vitale I et al.: Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation* 2012; 19, 107–120.
3. Elmore S: Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4): 495-516
4. Fulda S, Debatin K-M: Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006; 25: 4798-4811
5. Murn J, Urleb U et al.: Internucleosomal DNA cleavage in apoptotic WEHI 231 cells is mediated by chymotrypsin-like protease. *Genes to Cells* 2004; 9: 1103-1111
6. McIlwain, Berger T et al.: Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2013; 5: a008656
7. Lavrik IN, Krammer PH: Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell death Differentiation* 2012; 19: 36-41
8. Chipuk JE, Green DR: How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends in Cell Biology* 2008; 18:157-164
9. Turrens JF: Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology* 2003; 552.2: 335-344
10. Favaloro B, Allocati N et al.: Role of Apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)* 2012; 5: 330-349
11. Suhr S-m, Kim D-S: Comparison of the Apoptotic Pathways Induced by L-Amino Acid Oxidase and Hydrogen Peroxide. *The Journal of Biochemistry* 1999; 125: 305-309
12. Lukashcheva EV, Efremova AA et al.: L-Amino Acid Oxidases: Properties and Molecular Mechanisms of Action. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry* 2011; Vol.5, No.4: 337-345
13. Singh S: L-Amino Acid Oxidases-Microbial and Snake Venom. *Microbial & Biochemical Technology* 2014; 6(3): 128-134
14. Izidoro LFM, Sobrinho JC et al.: Snake venom L-amino acid oxidases: Trends in Pharmacology and Biochemistry. *BioMed Research International* 2014; 2014: 196754

15. Costa TR, Burin SM et al.: Snake venom L-amino acid oxidases: an overview on their antitumor effects. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Disease* 2014; 20: 23.
16. Zhang L, Wei LJ: ACTX-8, a cytotoxic L-amino acid oxidase isolated from *Agkistrodon acutus* snake venom, induces apoptosis in Hela cervical cancer cells. *Life Sciences* 2007; 80 (13): 1189-1197.
17. Ande SR, Kommoju PR et al.: Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. *Apoptosis* 2006; 11: 1439-1451
18. Tan NH, Fung SY: Snake venom L-amino acid oxidases an Their Potential Biomedical Applications. *Malsysian Journal of Biochemistry an Molecular Biology* 2008; 16 (1): 1-10
19. Ande SR, Fussi H et al.: Induction of apoptosis in yeast by L-amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma* viper. *Yeast* 2008; 25 (5): 349-357
20. Lee ML, Fung SY et al.: King cobra (*Ophiophagus hannah*) venom L-amino oxidase induces apoptosis in PC-3 cells and supresses PC-3 solid tumor growth in a tumor xenograft mouse model. *Internacional Journal of Medical Sciences* 2014; 11: 593-601.
21. Mukherjee AK, Saviola AJ e tal.: Apoptosis induction in human breast cancer (MCF7) cells by a novel venom L-amino oxidase (Rusvinoxidase) activity and is accompanied by caspase-7 activation and reactive oxygen species production. *Apoptosis* 2015; 20: 1358-1372.
22. Hossain GS, Li J et al.: L-Amino acid oxidase from microbial sources: types, properties, functions, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2014; 98: 1507-1515.
23. Stasyk T, Lutsik-Kordovsky et al.: A new highly toxic protein isolated from the death cap *Amanita phalloides* is an L-amino acid oxidase. *FEBS Journal* 2010; 277: 1260-1269.
24. Antonyuk VO, Klyuchivska OY et al.: Cytotoxic proteins of *Amanita virosa* Secr. Mushroom: Purification, characteristics and action towards mammalian cells. *Toxicon* 2010; 55: 1297-1305.
25. Pisljar A, Sabotic J et al.: Cytotoxic L-amino-acid oxidases from *Amanitha phalloides* and *Clitocybe geotropa* induce caspase-dependent apoptosis. *Cell Death Discovery* 2016; 2: 1-11
26. Garnweidner E: Gobe: žepni gobarski vodnik, Cankarjeva založba, Ljubljana 2005: 62, 80
27. Kamangar F, Dores GM et al.: Patterns of Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Across Five Continents: Defining Priorities to Reduce Cancer Disparities in Different Geographic Regions of the World
28. Lodish H, Berk A et al.: *Molecular cell biology*, W. H. Freeman and Company, New York, 2008: 395-403.

29. <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/TIB-152.aspx#characteristics>, povzeto 5. avgusta 2016
30. https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx?geo_country=si), povzeto 5. avgusta 2016
31. Galluzzi L, Aaronson SA et al.: Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death and Differentiation* 2009; 16(8): 1093–1107.
32. <https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/0/celltiter%2096%20aqueous%20one%20solution%20cell%20proliferation%20assay%20system%20protocol.pdf>, povzeto 3. avgusta 2016
33. http://www.bachem.com/fileadmin/user_upload/pdf/Flyers/Cancer_Research.pdf, povzeto 3. avgusta 2016
34. <http://www.bdbiosciences.com/eu/solrSearch?q=caspase+substrates%3Arelevance&text=caspase%20substrates>, povzeto 3. avgusta 2016
35. Mevc A: Vrednotenje amfifilnih nitroksidnih radikalov kot induktorjev apoptoze. Magistrska naloga; Ljubljana, 2014.
36. <http://www.bdbiosciences.com/us/s/flowcytometry>, povzeto 6. avgusta 2016
37. Bizjak V: Uporaba pretočne citometrije za spremljanje karakteristik celic CHO v bioprocseh. Diplomsko delo; Ljubljana, 2006
38. <http://www.biotech.uiuc.edu/flowcytometry>, povzeto 6. avgusta 2016
39. Rang HP, Ritter JM et al.: Rang and Dale's Pharmacology, Elsevier Ltd. 2016: 67-69.
40. Pucci B, Kasten M et al.: Cell cycle and Apoptosis. *Neoplasia Vol.2 July-Avgust 2000*; 4: 291-299
41. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/apoafbul.pdf>, povzeto 8. avgusta 2016
42. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp07510.pdf>, povzeto 10. avgusta 2016
43. Myhre O, Andersen JM et al.: Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochemical Pharmacology* 2003; 65(10): 1575–1582.
44. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d6883?lang=en®ion=SI>, povzeto 8. avgusta 2016.

45. Zang, Y, Beard RL et al.: Evidence of a lysosomal pathway for apoptosis induced by the synthetic retinoid CD437 in human leukemia HL-60 cells. *Cell Death and Differentiation* 2001; 8 :477-485.
46. Hafner A: Vloga gama1-sintropina pri posredovanju s katepsinom x uravnavane nevrotrofične aktivnosti gama-enolaze. Diplomsko naloga; Ljubljana, 2009.
47. <https://regentsgeneticstechnology.wikispaces.com/Gel+Electrophoresis+3-4>, povzeto 15. avgusta 2016
48. <http://www.antibodies-online.com/resources/17/1224/western-blotting-immunoblot-gel-electrophoresis-for-proteins/>, povzeto 20. avgusta
49. <http://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-3-genetics/35-genetic-modification-and/gel-electrophoresis.html>, povzeto 20. avgusta 2016
50. Utz PJ, Anderson P: Life and death decisions: regulation of apoptosis by proteolysis of signaling molecules. *Cell Death Differentiation* 2000; 7: 589-602.
51. Eldering E, Mackus WJM et al.: Apoptosis via the B cell antigen receptor requires Bax translocation and involves mitochondrial depolarization, cytochrome C release, and caspase-9 activation. *European Journal of Immunology* 2004; 34: 1950-1960
52. Murakawa M, Jung SK et al.: Apoptosis-inducing protein, AIP, from parasite-infected fish induces apoptosis in mammalian cells by two different molecular mechanisms.
53. Guo C, Liu S et al.: Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase. *Toxicon* 2012; 60: 302-311.
54. Alves RM, Antonucci GA et al.: Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 2008; 151: 542-550.
55. Chen YC, Chen SY et al.: Apoptosis of T-leukemia and B-myeloma cancer cells induced by hyperbaric oxygen increased phosphorylation of p38 MAPK. *Leukemia Research* 2007; 31: 805–815.
56. de Melo Alves Paiva R, de Freitas Figueiredo R et al.: Cell cycle arrest evidence, parasitical and bacterial properties induced by L-amino amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom. *Biochimie* 2011; 93: 941-947.