

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA STRAH

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA STRAH

VPLIV BUTILHIDROKSIANIZOLA NA SIGNALNE POTI, SPROŽENE S CITOKINOM  
TNF-alfa NA CELIČNI LINIJI ČLOVEŠKEGA ADENOKARCINOMA DEBELEGA  
ČREVESA

THE EFFECT OF BUTYLATED HYDROXYANISOLE ON SIGNALING PATHWAYS  
TRIGGERED BY TNF-alpha IN A HUMAN COLORECTAL ADENOCARCINOMA CELL  
LINE

UNIFORM MASTER'S STUDY PROGRAMME PHARMACY

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Institutu Jožefa Stefana na oddelku za Biokemijo, molekularno in strukturno biologijo pod mentorstvom doc. dr. Bojana Doljaka in prof. ddr. Borisa Turka.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se doc. dr. Bojanu Doljaku za vsa navodila, pomoč in nasvete pri izdelavi magistrske naloge.

Lepo se zahvaljujem prof. ddr. Borisu Turku in Institutu Jožefa Stefana, da so mi omogočili delo v njihovih laboratorijih in sodelovanje pri njihovem raziskovalnem delu.

Iskrena hvala dr. Katarini Pegan in Nežki Kavčič, ki sta me tri leta budno spremljali in nesebično delili svoje znanje z mano ter me podpirali pri vsakem podvigu v mojem profesionalnem življenju.

Najlepše se zahvaljujem družini in prijateljem, ki so mi stali ob strani in me podpirali, tudi ko zanje nisem imela časa.

## **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Bojana Doljaka in somentorstvom prof. ddr. Borisa Turka.

Nina Strah

Predsednik magistrske komisije: prof. dr. Danijel Kikelj

Mentor: doc. dr. Bojan Doljak

Somentor: prof. ddr. Boris Turk

Član magistrske komisije: asist. dr. Nejc Horvat

# VSEBINA

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD .....  | 1  |
| 1.1 Dejavnik tumorske nekroze $\alpha$ .....                               | 1  |
| 1.2 TNF- $\alpha$ molekulske poti.....                                     | 1  |
| 1.2.1 Celična smrt.....  | 1  |
| 1.3 Oksidativni stres in TNF- $\alpha$ .....                               | 9  |
| 1.4 Butilhidroksianizol .....  | 10 |
| 1.5 Celična linija HT-29 .....   | 11 |
| 2. NAMEN IN POTEK DELA .....   | 12 |
| 3. MATERIALI IN METODE.....  | 13 |
| 3.1 Materiali.....   | 13 |
| 3.1.1 Citokini, antagonisti, zaviralci in antioksidanti .....              | 13 |
| 3.1.2 Fluorescenčna barvila in fluorogeni substrati .....                  | 13 |
| 3.1.3 Celične linije, gojišča, dodatki za gojišča in delo s celicami ..... | 13 |
| 3.1.4 Ostale kemikalije .....  | 13 |
| 3.1.5 Protitelesa.....   | 14 |
| 3.1.6 Pufri, geli in njihova sestava .....                                 | 14 |
| 3.2 Metode .....   | 16 |
| 3.2.1 Osnovne metode dela s celicami .....                                 | 16 |
| 3.2.2 Odmrzovanje celic .....  | 16 |
| 3.2.3 Precepljanje celic .....   | 16 |
| 3.2.4 Določanje vpliva dodanih spojin na celice .....                      | 17 |
| 3.2.5 Meritve na pretočnem citometru .....                                 | 17 |
| 3.2.6 Priprava celičnih lizatov .....                                      | 19 |
| 3.2.7 Analiza proteinov .....  | 19 |
| 3.2.8 Merjenje aktivnosti kaspaz.....                                      | 20 |

|  |    |
|--|----|
| 3.2.9 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS (NaDS PAGE) .....  | 21 |
| 3.2.10 Prenos western in imunodetekcija proteinov .....  | 21 |
| 3.2.11 Statistična analiza rezultatov .....  | 21 |
| 4. REZULTATI.....  | 22 |
| 4.1 Testiranje citotoksičnosti BHA .....   | 22 |
| 4.2 Testiranje citotoksičnosti BV6 .....   | 22 |
| 4.3 Vpliv TNF- $\alpha$ , BV6 in zVAD-fmk na celično smrt.....   | 23 |
| 4.4 Vpliv TNF- $\alpha$ , BV6 in zVAD-fmk na aktivnost kaspaz.....   | 24 |
| 4.5 Vpliv TNF- $\alpha$ , BV6 in zVAD-fmk na nastanek ROS.....   | 25 |
| 4.6 TNF- $\alpha$ v kombinaciji z BV6 in zVAD-fmk sproži nekroptozo.....   | 26 |
| 4.7 Vpliv BHA na celično smrt .....  | 27 |
| 4.7.1 Vpliv 100 $\mu$ M BHA na celično smrt, aktivnost kaspaz in oksidativni stres .....   | 27 |
| 4.7.2 Vpliv 500 $\mu$ M BHA na celično smrt, aktivnost kaspaz in oksidativni stres .....   | 31 |
| 4.8 Vpliv BHA na preživetveno pot .....  | 36 |
| 5. RAZPRAVA .....  | 38 |
| 5.1 Citotoksičnost BHA in BV6 .....  | 38 |
| 5.2 Določitev časovnih točk in opredelitev vrste celične smrti: vpliv TNF- $\alpha$ , BV6 in zVAD-fmk na nastanek ROS, aktivnosti kaspaz in sprožitev nekroptoze ..... | 39 |
| 5.3 Vpliv BHA na procese, ki jih sproži TNF- $\alpha$ .....  | 40 |
| 6. ZAKLJUČEK .....   | 43 |
| 7. LITERATURA .....  | 44 |

## POVZETEK

Dejavnik tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) je citokin, ki nastaja v celicah imunskega sistema. Je ena izmed nepogrešljivih molekul, ki so potrebne za aktivacijo imunskega odziva in obrambo pred tujki in telesu lastnimi, a spremenjenimi celicami. Z omenjenim citokinom smo na celični liniji človeškega kolorektalnega adenokarcinoma HT-29 sprožili tri različne kaskade reakcij, ki jih lahko opazujemo tudi *in vivo*. Opazovali smo apoptozo, nekroptozo in preživetveno pot, ki se sproži preko aktivacije jedrnega dejavnika  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Za sprožitev apoptoze smo celice inkubirali z modificiranim peptidom BV6, ki antagonizira zaviralce apoptoze; pri nekroptozni poti smo poleg TNF- $\alpha$  in BV6 celice inkubirali še z zVAD-fmk, ki preprečuje delovanje kaspaz. Za preučevanje vpliva na preživetveno pot smo uporabili samo TNF- $\alpha$ . Glavni cilji opazovanja so bili razumeti vpliv butilhidroksianizola (BHA) na vse tri omenjene poti. Predvidevali smo, da v kolikor so v procese vpletene reaktivne kisikove spojine (ROS), lahko z dodatkom BHA, ki je lovilec radikalov in splošno znan konzervans v hrani, preprečimo oba tipa celične smrti in aktivacijo NF- $\kappa$ B.

Ugotovili smo koncentracijske in časovne učinke BHA na viabilnost celic, količino ROS in aktivnost kaspaz. Nižje koncentracije same po sebi sicer niso bile citotoksične, vendar niso imele vpliva na nobeno izmed poti. Po 24-urni inkubaciji je BHA pri višjih koncentracijah povzročil visoko smrtnost celic, pri krajših časovnih točkah pa je BHA deloval kot lovilec radikalov in s tem preprečil sprožitev z ROS posredovanih procesov. Po 10-urni inkubaciji je BHA statistično značilno povečal kaspazno aktivnost le v kombinaciji s TNF- $\alpha$  in BV6.

## **ABSTRACT**

Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) is a cytokine produced by immune cells. It is one of the molecules needed for activation of the immune response, for the purpose of self-defense against pathogens and transformed cells. We used TNF- $\alpha$  to trigger three different pathways in the HT-29 human colorectal adenocarcinoma cell line that can be observed *in vivo*: apoptosis, necroptosis and cell survival triggered with NF- $\kappa$ B. We incubated the cells with BV6 triggering apoptosis and with the combination of BV6 and zVAD-fmk for necroptosis. The cell survival pathway was induced by TNF- $\alpha$  only. Our primary aim was to find out if butylhydroxyanisole (BHA) prevents the three processes of cell death/survival. BHA is used as an antioxidant and preservative in food. Its mechanism of action is through radical scavenging. If reactive oxygen species (ROS) play a role in the mentioned processes, BHA should definitely have some effect.

We found out that the effects of BHA are concentration and time dependent. Lower concentrations of BHA are not cytotoxic, yet not potent enough to affect apoptosis, necrosis or cell survival. Higher concentrations of BHA show high cytotoxicity after 24 hours, but shorter incubation periods, the effect of BHA on cell survival and ROS quantity was significant. We also noticed, that after 10 hours of incubation of BHA with the combination of TNF- $\alpha$  and BV6, the caspase activity was significantly higher meanwhile BHA itself did not raise it at all.

## SEZNAM OKRAJŠAV

|                   |   |
|-------------------|---|
| Ac-DEVD-AFC       | fluorometrični substrat za kaspaze: N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-trifluorometilkumarin                |
| APAF-1            | aktivacijski dejavnik monomerne apoptotične proteaze 1 ( <i>angl.</i> apoptotic protease activating factor) |
| APS               | amonijev persulfat  |
| ATP               | adenozin trifosfat  |
| BAFF              | dejavnik, ki aktivira B-celice ( <i>angl.</i> B-cell activating factor)                                     |
| BHA               | butilhidroksianizol   |
| BSA               | goveji serumski albumin   |
| CHAPS             | površinsko aktivna snov: 3-[(3-holaminopropil)dimetilamonijev]-1-propansulfonat                             |
| cIAP              | celični zaviralci apoptoze ( <i>angl.</i> cellular inhibitor of apoptosis protein)                          |
| DD                | domena smrti ( <i>angl.</i> death domain)   |
| dH <sub>2</sub> O | enkrat prečiščena voda  |
| DISC              | citosolni smrt inducirajoči signalni kompleks ( <i>angl.</i> death-inducing signaling complex)              |
| DMSO              | dimetilsulfoksid  |
| DPBS              | fosfatni pufer z NaCl po Duplecu  |
| DTT               | reducent ditiotreitrol  |
| EDTA              | etilendiamintetraocetna kislina   |
| FADD              | proteini z domeno smrti, vezano na Fas ( <i>angl.</i> Fas-associated protein with death domain)             |
| FBS               | fetusni serum goveda  |
| HEPES             | 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina   |
| IKK               | kompleks kinaze I $\kappa$ B ( <i>angl.</i> I $\kappa$ B kinase)  |
| I $\kappa$ B      | zaviralec jedrnega faktorja $\kappa$ B  |
| JNK               | c-Jun-N-terminalna kinaza ( <i>angl.</i> c-Jun-N-terminal kinase)   |
| MAPK              | mitogen-aktivirana protein kinaza ( <i>angl.</i> mitogen-activated protein kinase)                          |
| MLKL              | mešana skupina podobna kinaznim domenam ( <i>angl.</i> mixed lineage kinase domain-like)                    |
| MOMP              | permeabilizacija zunanje mitohondrijske membrane ( <i>angl.</i>   |



|                |  |
|----------------|--|
|                | mitochondrial outer membrane permeabilization)   |
| NaDS PAGE      | poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim lavrilsulfatom   |
| NaDS           | natrijev lavrilsulfat  |
| NEMO           | osnovni modulator NF- $\kappa$ B ( <i>angl.</i> NF- $\kappa$ B essential modulator)  |
| NF- $\kappa$ B | jedrni faktor $\kappa$ B ( <i>angl.</i> nuclear factor $\kappa$ B)   |
| NIK            | NF- $\kappa$ B inducirajoča kinaza ( <i>angl.</i> NF- $\kappa$ B inducing kinase)  |
| NP-40          | nonilfenilpolietilen glikol, nonident P-40, oktilfenoksipolietoksiletanol  |
| PBS            | fosfatni pufer z NaCl  |
| PI             | propidijev jodid   |
| PRR            | receptorji, ki prepoznavajo patogene ( <i>angl.</i> pattern recognition receptor)  |
| RIP 1/3        | z receptorjem interagirajoča proteinska kinaza 1/3 ( <i>angl.</i> receptor interacting protein kinase 1/3)                                 |
| ROS            | reaktivne kisikove spojine   |
| SMAC           | drugi mitohondrijski aktivator kaspaz ( <i>angl.</i> second mitochondria-derived activator of caspases)                                    |
| TEMED          | N,N,N',N'-tetrametiletildiamin   |
| TNF- $\alpha$  | dejavnik tumorske nekroze $\alpha$   |
| TNFR1          | receptor dejavnika tumorske nekroze $\alpha$   |
| TRADD          | domena smrti povezana s TNFR1 ( <i>angl.</i> TNF- $\alpha$ receptor associated death domain)   |
| TRAILR         | receptor za ligand, ki inducira s TNF- $\alpha$ povezano apoptozo ( <i>angl.</i> TNF- $\alpha$ related apoptosis-inducing ligand receptor) |
| TRIS           | tris(hidroksimetil) aminometan   |
| XIAP           | z X povezan zaviralec apoptoze   |
| zVAD-fmk       | N-benziloksikarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilketon  |

# 1. UVOD

## 1.1 Dejavnik tumorske nekroze $\alpha$

Dejavnik tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) je citokin, ki nastaja predvsem v makrofagih in drugih mononuklearnih fagocitih. Spada v večjo družino TNF, kamor sodijo tako receptorji kot tudi ligandi. Prvič je bila družina TNF omenjena leta 1962, TNF- $\alpha$  pa je bil odkrit leta 1984. Istega leta so določili tudi njegovo aminokislinsko zaporedje. TNF- $\alpha$  se lahko veže na dva receptorja: TNFR1 in TNFR2. Pri prvem je sestavni del domena smrti (*ang.* death domain, DD) in ga najdemo na vseh celicah. TNFR2 pa se nahaja le na živčnih in endotelijskih celicah ter celicah imunskega sistema (29).

TNF- $\alpha$  je eden izmed povzročiteljev vnetja in aktivatorjev levkocitov. Ima več bioloških učinkov; inducira endotelijske adhezijske molekule, avtokrino aktivira in povzroči diferenciacijo makrofagov, služi kot obramba pred znotrajceličnimi patogeni, deluje kot komitogen na limfocite T in B, regulira hematopoezo, deluje kot rastni dejavnik, ima protrombotično delovanje in sproži izločanje drugih citokinov iz celic, ki sodelujejo pri imunskem odgovoru. Ob vezavi na receptor na celični membrani lahko sproži tri različne molekulske poti: preživetveno pot preko jedrnega dejavnika  $\kappa$ B, aktivacijo apoptotskih kaspaz in/ali nastajanje amiloidnih tvorbo - nekrosomov (8).

Nastajanje in delovanje TNF- $\alpha$  mora biti natančno regulirano. Deregulacija se lahko izrazi v obliki kardiovaskularnih, nevroloških, pljučnih, avtoimunskih in metabolnih bolezni ter različnih vrst raka (29).

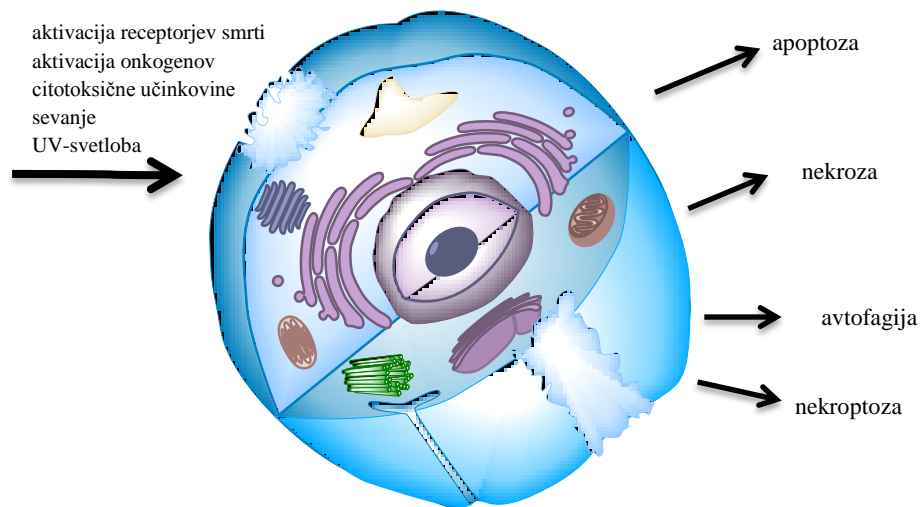
## 1.2 TNF- $\alpha$ molekulske poti

### 1.2.1 Celična smrt

Ravnotežje med celično delitvijo in smrtjo je ključnega pomena za pravilen razvoj in vzdrževanje večceličnih organizmov. Kakršnakoli nepravilnost v odnosu med življenjem in smrtjo celice lahko vodi v pojav različnih patoloških nepravilnosti, kot so rak, nepravilna embriogeneza in nevrodegenerativne bolezni (1).

V osnovi razlikujemo med tremi različnimi vrstami celične smrti: apoptozo, nekrozo in avtofagijo. V zadnjem času se uveljavlja tudi na novo odkrita pot imenovana nekroptoza (26) (slika 1). Glede na stopnjo nastalega stresa se lahko sprožijo vse zaporedno (začenši z avtofagijo) ali celo hkrati. V magistrski nalogi smo se osredotočili predvsem na spremljanje

apoptoze in nekroptoze. Slednja ima lastnosti dveh tipologij celične smrti: tako apoptoze kot nekroze.



Slika 1: Ob delovanju različnih dejavnikov na celico se sprožijo številne poti, ki vodijo do različnih tipov celične smrti (1).

### 1.2.1.1 Apoptoza

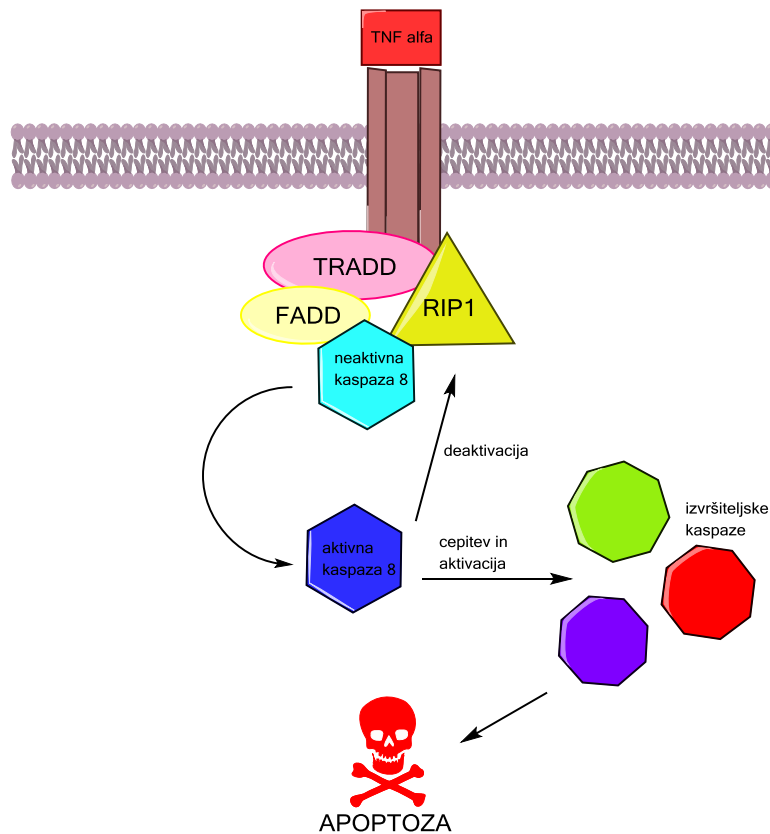
Apoptoza je eden izmed osnovnih programiranih procesov, s katerimi organizem odstranjuje poškodovane celice. Gre za eno izmed prvih preučevanih celičnih smrti. Lahko bi jo poimenovali tudi celični samomor. Sama beseda izhaja iz grščine in sicer *apo* pomeni od, iz in *ptosis* padanje. Morfološko jo zaznamuje kondenzacija in fragmentacija jedra, cepitev jedrne DNA in tvorjenje apoptotskih teles. Biokemijsko jo prepoznamo po aktivaciji značilnih apoptotskih encimov - apoptotskih kaspaz in po tem, da je za njeno izvršitev potrebna energija v obliki ATP. Sistemsko se apoptozo prepozna po tem, da ne povzroča vnetja, saj celice imunskega sistema apoptotske celice in apoptotska telesa učinkovito odstranijo (2, 34). Omenjena vrsta celične smrti ni le rezultat patološkega procesa, pač pa je nujno potrebna tudi za normalno fiziološko delovanje, na primer pri razvoju in regeneraciji (3).

Apoptoza se lahko sproži prek dveh različnih poti: intrinzične in/ali ekstrinzične. Obe poti sprožita niz biokemijskih reakcij, katerih končni učinek je aktivacija apoptotskih kaspaz. Intrinzično sprožena apoptoza poteka preko mitohondrijev, iz katerih se sprosti citokrom c in nekateri drugi dejavniki (1).

Ekstrinzična pot apoptoze se sproži z vezavo liganda na receptorje smrti. Med receptorje smrti spadajo sledeči receptorji in družine: TNFR1, Fas receptor in družina receptorjev na katere se veže ligand, ki inducira s TNF- $\alpha$  povezano apoptozo (TRAILR), poznamo pa tudi TNFR2, ki ima antiapoptotično vlogo (4,17, 40).

TNFR1 je sestavljen iz treh delov. Ko se na receptor veže TNF- $\alpha$ , pride do njihove oligomerizacije. Ob vezavi sta možna dva dogodka. Primarno se sproži preživetvena pot (opisana v poglavju 1.2.1.3), lahko pa pride do internalizacije kompleksa receptorja in liganda, kar povzroči tvorbo citosolnega smrt inducirajočega signalnega kompleksa (DISC), kar vodi v apoptozo. Pri tem ima pomembno vlogo z receptorjem interagirajoča protein kinaza 1 (RIP1). Ta se deubikvitilira (ubikvitilirana povzroča sprožitev preživetvene poti) in pridruži DISC, ki ga sestavljajo še domena smrti povezana s TNFR1 (TRADD), s Fas povezan protein z domeno smrti (FADD) in kaspaza 8. Ko se kaspaza 8 aktivira, pride do proteolitske cepitve RIP1 in RIP3. Kaspaza 8 lahko proteolitično cepi druge nezrele kaspaze (npr. kaspazo 3, 6 in 7) ali pa poveča prepustnost mitohondrijske membrane (3,5).

Za uravnavanje procesa apoptoze se v celici nahajajo drugi mitohondrijski aktivatorji kaspaz (SMAC) (prvotna lokacija v mitohondriju), ki apoptozo pospešuje z vezavo cIAP in celični zaviralci apoptoze (cIAP), ki apoptozo zavirajo. Ti pospešijo ubikvitinacijo RIP1 in s tem preprečujejo tvorbo DISC in posledično preprečijo apoptozo (3). Poznamo cIAP-1 in -2 ter z X povezan zaviralec apoptoze (XIAP). Zadnji je edini, ki direktno zavira kaspaze 9, 3 in 7 (35). Z dodatkom antagonistov cIAP, kot je na primer BV6 (SMAC mimetik), lahko apoptozo sprožimo *in vitro* (3). Potek ekstrinzične poti prikazuje slika 2.



Slika 2: Shema poteka z receptorji posredovane apoptoze (TRADD - domena smrti povezana s TNFR1, FADD - s FAS povezan protein z domeno smrti, RIP1 - z receptorjem interregirajoča protein kinaza 1).

Pri poteku ekstrinzične poti apoptoze naj bi sodelovale tudi reaktivne kisikove spojine (ROS). Predvideva se, da so za nastanek ROS odgovorni aktivirani mitohondriji. Pri tem se iz mitohondrijske membrane sprosti citokrom c, kar vodi v aktivacijo kaspaz (30).

#### **1.2.1.2 Nekroptoza, programirana oblika nekroze**

Beseda nekroza izhaja iz grške besede *necros* in pomeni mrtev oziroma mrlič. Na celičnem nivoju nekroza označuje tip naključne celične smrti, ki je posledica raznih poškodb, hipoksije in delovanja toksinov. Nekroza se sproži v primeru prekinitve nastajanja ATP. Za razliko od apoptoze sproži imunski odziv in s tem posledično povzroči vnetje. Morfološko se celica napihne, membrana se poškoduje, kar vodi v izlitje celične vsebine. Jedro se morfološko spremeni, vendar ne pride do fragmentacije DNA (2).

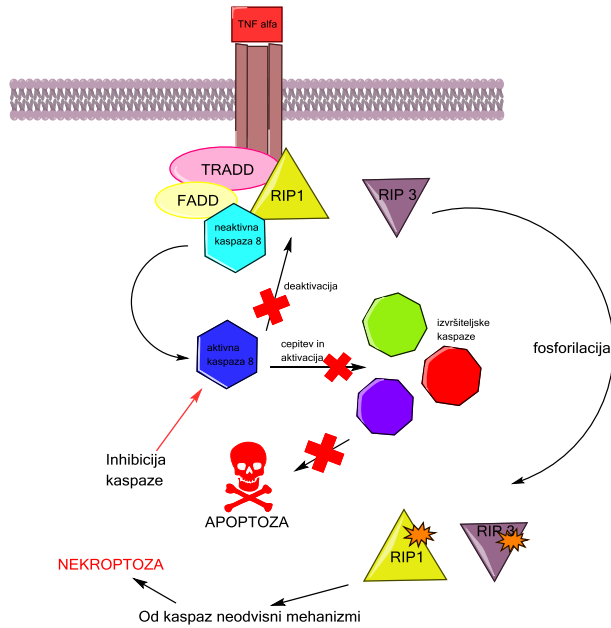
Nekroptoza je vrsta celične smrti, ki jo je strokovna literatura prvič omenila leta 2005. Prepoznamo jo po kombinaciji lastnosti, ki so značilne tako za apoptozo kot za nekrozo (36). Tako kot apoptoza je tudi nekroptoza programirana celična smrt, le da poteka ob odsotnosti kaspaz kot posledica genetskih nepravilnosti ali zaradi prisotnosti kaspaznih zaviralcev. Morfološko pa se nekroptoza kaže kot nekroza. Organeli in celica nabreknejo, jedro pa je le malenkost spremenjeno. Končni rezultat je odpoved funkcije celične membrane in izlitje celične vsebine v okolico. Za razliko od apoptoze se tu pojavi vnetje. Ta tip celične smrti se pojavlja pri ishemijah, travmah (kemijske in fizične), bakterijskih, virusnih okužbah in neurodegenerativnih boleznih (6).

Novejša literatura poroča, da se nekroptoza lahko sproži le umetno, saj sicer kaspaze cepijo proteine potrebne za nekroptozo (npr. RIP1) in s tem onemogočijo njen potek. Kljub temu je nekroptoza potrjena kot glavna molekulska pot smrti pri nekaterih infektivnih obolenjih. Na primer okužba z virusom *Vaccinia*, ki proizvaja proteine, ki zavirajo beljakovine potrebne za potek apoptoze. Tako sta izpolnjena dva pglavitna pogoja, ki omogočita sprožitev nekroptoze: inhibicija apoptotskih kaspaz in prisotnost TNF- $\alpha$ , ki se veže na receptor smrti (2).

Pri nekroptozi sodelujejo Fas, TNFR1 in 2 ter TRAIL 1 in 2. Poleg teh lahko omenjen tip celične smrti sproži tudi aktivacija družine receptorjev, ki prepoznavajo patogene (PRR). Po vezavi liganda na določen receptor se tvori smrt inducirajoči citosolni signalni kompleks

oziroma kompleks II. RIP1 se pri tem deubikvitilira in sproži nastanek supramolekulskega kompleksa, v katerem se nahajajo TRADD, FADD, RIP1, RIP3 in kaspaza 8. Če omenjena kaspaza ne deluje zaradi različnih razlogov, potem RIP1 in RIP3 ostaneta aktivna po fosforilaciji (slika 3) (6).

Fosforilirana RIP1 in RIP3 tvorita strukturo imenovano nekrosom, ki fosforilira MLKL (angl. mixed lineage kinase domain-like), aktivirajo se c-Jun-N-terminalne kinaze (JNK) in nastanejo ROS, kar vodi v nekroptozo (27).



Slika 3: Shematski prikaz poteka nekroptoze (6).

Ob vezavi TNF- $\alpha$  na receptor se poleg aktivacije molekulske poti pričnejo generirati tudi ROS. Glavni vir le teh so mitohondriji, ki produkcijo ROS pospešujejo tudi s premestitvijo nekrosoma v membrane povezane z mitohondriji. Nastali oksidativni stres pospešuje potek nekroptoze (27). Povzetek vseh lastnosti je opisan v preglednici I.

Preglednica I: Primerjava apoptoze, nekroze in nekroptoze.

|                         | APOPTOZA   | NEKROZA   | NEKROPTOZA  |
|-------------------------|--|---|---|
| MEHANIZEM               | od kaspaz odvisna<br>programirana<br>celična smrt  | neprogramirana celična<br>smrt  | od kaspaz neodvisna<br>programirana celična smrt,   |
| KASPAZE                 | aktivne  | status aktivacije ni<br>pomemben  | zavrte  |
| MORFOLOŠKE<br>LASTNOSTI | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ kondenzacija<br/>in<br/>fragmentacija<br/>jedra</li> <li>➤ značilna<br/>cepitev<br/>jedrne DNA<br/>(180-200<br/>baznih parov)</li> <li>➤ tvorjenje<br/>apoptotskih<br/>teles</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ napihnjena celica</li> <li>➤ poškodovana<br/>membrana</li> <li>➤ izlitje celične vsebine</li> <li>➤ jedro je morfološko<br/>spremenjeno</li> <li>➤ ni fragmentacije<br/>DNA</li> </ul> | morfološke lastnosti so<br>enake nekrozi  |
| POJAV VNETJA            | NE   | DA  | DA  |
| PORABA ATP              | DA   | NE  | NE  |
| VZROKI ZA<br>NASTANEK   | intrinzični ali<br>ekstrinzični signal   | mehanske in kemične<br>poškodbe   | Za enkrat opisan<br>ekstrinzični signal ob<br>pogoju, da so apoptotske<br>kaspaze zavrte. |

### 1.2.1.3 Preživetvena pot in jedrni dejavnik $\kappa$ B

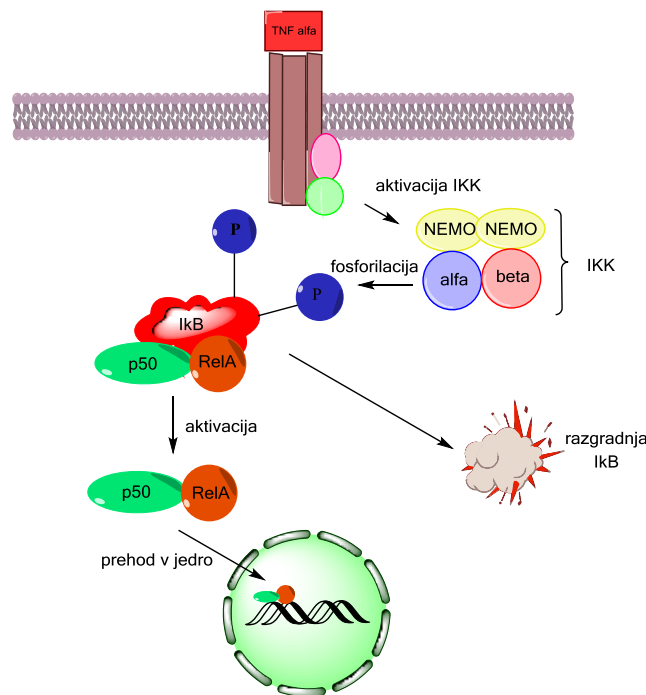
Jedrni dejavnik  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) ima pomembno vlogo pri aktivaciji imunskega sistema in njegovega delovanja. Njegovo aktivacijo sprožijo zunanji in notranji dejavniki (bakterije in virusi, citokini in drugi vnetni dejavniki, ki se sproščajo iz celic imunskega sistema, med njimi tudi TNF- $\alpha$ ). NF- $\kappa$ B sproži prepis genov, ki kodirajo proteine, pomembne za imunski in vnetni odziv, med katerimi so tudi interleukin-1, -6 in -8 in tkivni dejavniki (28).

NF- $\kappa$ B označuje družino proteinov, ki jo lahko razdelimo na dve poddružini; proteini NF- $\kappa$ B (p50, p100) in proteini Rel (RelA oz. p65, RelB). Proteini se v celici nahajajo v neaktivni

obliki, aktivni pa postanejo po specifični dimerizaciji. Aktivni dimeri se vežejo na 9-10 baznih parov dolgo mesto na DNA, ki ga imenujemo  $\kappa$ B mesto (7).

Aktivnost NF- $\kappa$ B, poleg dimerizacije, regulirajo še zaviralci jedrnega dejavnika  $\kappa$ B (I $\kappa$ B). I $\kappa$ B se veže na aktivni del NF- $\kappa$ B in preprečuje vezavo na DNA. Njegova aktivacija in delovanje lahko potekata po treh različnih poteh. Najbolje poznani sta kanonična oziroma klasična in nekanonična oziroma alternativna pot (7).

Kanonična ali klasična pot: Kanonična pot je ključna pri prirojeni imunosti in vnetju. Ob vezavi liganda na celični receptor (v našem primeru TNFR) pride do tvorbe kompleksa proteinov, ki pripomore k aktivaciji kompleksa kinaze I $\kappa$ B (IKK). Le ta je sestavljen iz  $\alpha$  in  $\beta$  podenote ter proteina imenovanega osnovni modulator NF- $\kappa$ B (NEMO oz. IKK $\gamma$ ). NEMO je odgovoren za aktivacijo NF- $\kappa$ B, ki se, kot že omenjeno, v citoplazmi nahaja v neaktivni obliki, saj ga zavira I $\kappa$ B. Slednjega NEMO fosforilira, kar vodi v njegovo ubikvitinacijo in razgradnjo. Jedrni dejavnik postane aktiven, potuje v jedro, kjer omogoča prepis tarčnih genov v mRNA. Obenem prihaja tudi do aktivacije gena za I $\kappa$ B, v citoplazmi nakopičeni I $\kappa$ B pa ustvari negativno povratno zanko inhibicije NF- $\kappa$ B (slika 4) (7).

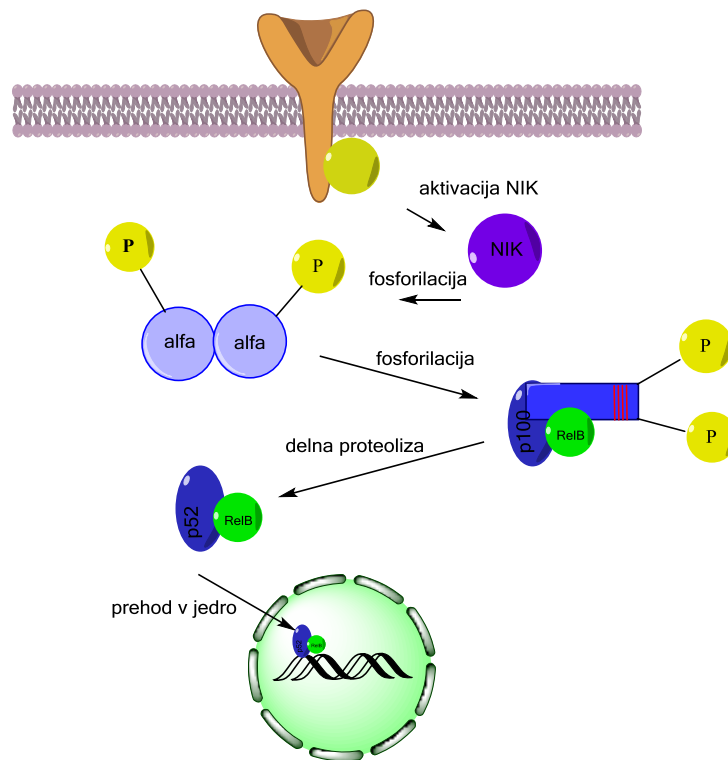


Slika 4: Shematski prikaz kanonične poti aktivacije NF- $\kappa$ B (7).

Nekanonična ali alternativna pot: Ta pot je npr. aktivna pri diferenciaciji limfocitov T in B. Za aktivacijo procesa so odgovorni limfotoksin B, dejavnik, ki aktivira B-celice (BAFF) in CD40. Ob vezavi le teh se aktivira NF- $\kappa$ B inducirajoča kinaza (NIK), ki fosforilira IKK



kompleks, ki ima v tem primeru le dve  $\alpha$  podenoti, brez dveh NEMO podenot. Aktiviran kompleks nato fosforilira NF- $\kappa$ B, pri katerem poteče delna proteoliza in pretvorba v aktivno obliko NF- $\kappa$ B (slika 5) (7).



Slika 5: Shema nekanonične poti aktivacije NF- $\kappa$ B (7).

Nekatere ugotovitve kažejo, da so ROS potrebne za aktivacijo NF- $\kappa$ B preživetvene poti, spet druge trdijo obratno. ROS naj bi delovale v začetnem delu kaskade, še pred fosforilacijo I $\kappa$ B in njegovo razgradnjo. Predlagan mehanizem je, da povzročijo oksidacijo cisteinskega ostanka v aktivnem mestu IKK $\alpha$  in  $\beta$  podenote. Na ta način je kompleks IKK stabiliziran in lahko opravi svojo funkcijo (9).

Predlagani so tudi mehanizmi, po katerih ROS zavirajo potek nastanka in delovanja NF- $\kappa$ B. Ali bodo ROS delovale kot aktivatorji ali kot zaviralci je odvisno od količine le teh. Manjše količine ROS aktivirajo, večje pa delujejo zaviralno na nastanek NF- $\kappa$ B. Večja količina ROS pomeni tudi večjo količino oksidirane oblike glutationa, ki naj bi oviral ubikvitinacijo in posledično proteolizo I $\kappa$ B. Ravno tako naj bi ROS direktno zavirale vezavo NF- $\kappa$ B na DNA, saj le tega oksidirajo, za optimalno delovanje pa naj bi bil jedrni dejavnik v reducirani obliki (9).

### 1.3 Oksidativni stres in TNF- $\alpha$

Zaradi toksičnosti kisika so morali živi organizmi razviti mehanizme, s katerim so omejili oksidativni stres. Sam kisik sodeluje v življenjskih procesih kot prejemnik elektronov v dihalni verigi. Nastali produkti predstavljajo skupino reaktivnih kisikovih spojin, ki jih organizmi po tvorbi nižjih koncentracij uporabljajo za številne življenjske funkcije kot sekundarne prenašalne molekule pri številnih signalnih poteh. ROS sodelujejo tako pri fizioloških kot pri patoloških procesih. Sodelujejo pri reguliranju transkripcije, diferenciacije, proliferacije, transformaciji v rakave celice in programirani celični smrti (9).

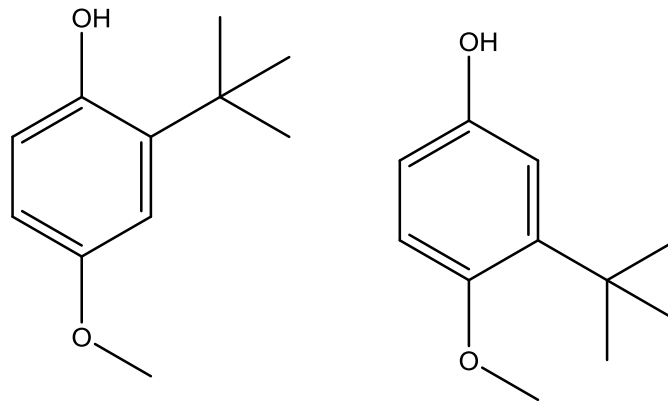
Največ ROS nastane v mitohondrijih, izven njih pa jih najdemo tudi v endoplazmatskem retikulumu, peroksisomih, celični membrani in nenazadnje v citoplazmi sami. Količina nastalih ROS se v zdravi celici povečini regulira s pomočjo superoksidne dismutaze, glutationa, vitaminov C in E (slednja vnašamo s hrano), katalaz in drugih endogenih antioksidativnih molekul. Lovilci radikalov pretvorijo superoksidni anion v  $H_2O_2$  in  $O_2$ , katalaze pa vodikov peroksid razgradijo v vodo in kisik. Ko pride do porušanja ravnotežja med nastajanjem in nevtralizacijo, govorimo o oksidativnem stresu, ki povzroči oksidacijo proteinov, lipidov in DNA. Na nivoju organizma se poškodbe posameznih delov celic kažejo kot razvoj različnih bolezni (sladkorna bolezen, nevrodegenerativne bolezni, rak), ravno tako pa tudi prispeva k pospešitvi procesa staranja (10).

Ko se TNF- $\alpha$  veže na receptor, sproži molekulske poti, pri katerih sodelujejo tudi ROS. TNF- $\alpha$  naj bi povzročil nastanek ROS preko motenj dihalne verige v mitohondrijih zaradi porušenega delovanja kompleksa III (31).

Količino ROS lahko zmanjšamo z dodajanjem antioksidantov, ki preko različnih mehanizmov nevtralizirajo ROS in preprečijo njihovo delovanje. Antioksidanti, kot so N-acetilcistein (NAC), butilhidroksianizol (BHA) in vitamin C, v določeni meri zavrejo potek apoptoze in nekroptoze sprožene s TNF- $\alpha$ , vendar je njihov učinek odvisen od vrste celične linije oziroma kulture (30).

Antioksidanti imajo dokumentiran vpliv tudi na preživetveno pot, ki jo sproži TNF- $\alpha$ . Derivati vitamina E, vitamin C, BHA,  $\alpha$ -lipojska kislina in deferoksamin preprečijo sprožitev preživetvene poti ob dodatku TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , cikloheksimida in  $H_2O_2$ , kar je tudi vodilo do sklepanj, da so za sprožitev omenjene molekulske poti potrebne ROS (9).

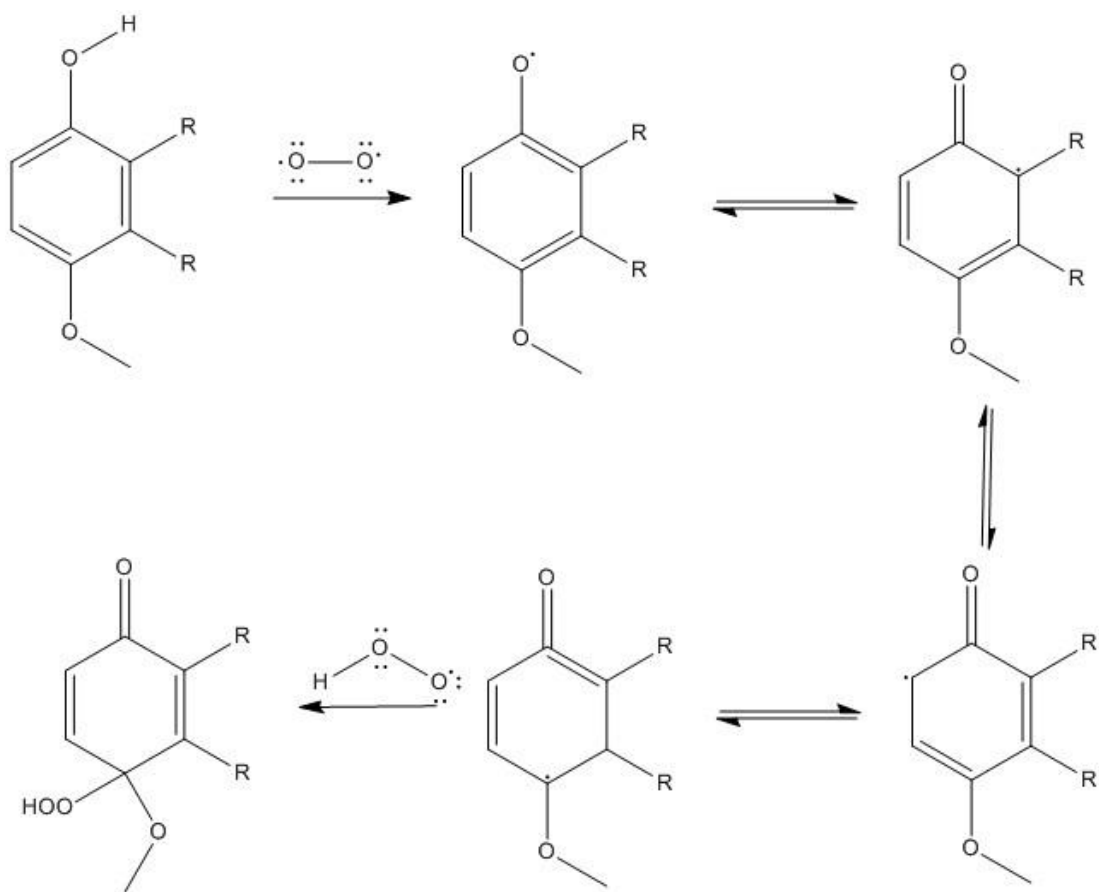
## 1.4 Butilhidroksianizol



Slika 6: 2-*tert*-butil-4-metoksifenol (levo) in 3-*tert*-butil-4-metoksifenol (desno).

Butilhidroksianizol (BHA) je zmes dveh izomerov; 2-*tert*-butil-4-metoksifenola in 3-*tert*-butil-4-metoksifenola (slika 6). Raztaplja se v etanolu, zelo je topen v metilenkloridu, v vodi pa je netopen (11). Če BHA želimo pripraviti kot vodno raztopino, ga predhodno raztopimo v brezvodnem etanolu, raztopino pa nato dodamo vodi.

BHA je sintetični antioksidant, ki se široko uporablja kot konzervans (oznaka E320). Deluje kot lovilec radikalov. V prvi stopnji pride do tvorbe stabilnega radikala zaradi možnosti resonance, le ta pa nato zreagira s hidroperoksidnim radikalom do dienonske oblike(12,13).



Slika 7: Potek radikalske reakcije z BHA (13).

Vpliv BHA na nekroptozo sproženo s  $\text{TNF-}\alpha$  so opazovali že na različnih celičnih linijah. V celicah L929, DKO, p65KO MEF 100  $\mu\text{M}$  BHA statistično značilno zniža količino nastalih ROS pod vplivom  $\text{TNF-}\alpha$  tako ob dodatku zaviralca kaspaz – modificiranega peptida zVAD-fmk kot tudi brez dodatka zVAD-fmk. Tudi viabilnost preučevanih celičnih linij je bila po dodatku BHA višja (32, 33).

### 1.5 Celična linija HT-29

HT-29 so humane celice dobljene iz adenokarcinoma debelega črevesja 44-letne bolnice. Celice rastejo pritrjene na podlago in so primerne za transfekcijo. Za rast potrebujejo celični medij, ki je obogaten z glukozo. Kljub diferenciaciji so dober približek zdravim epitelijskim celicam debelega črevesja. Še vedno pa so nekateri proteini preveč drugi premalo izraženi (41).

## 2. NAMEN IN POTEK DELA

TNF- $\alpha$  je telesu lasten citokin, ki je nujno potreben za normalno delovanje celotnega organizma – njegova deregulacija pa vodi v številne bolezni. Njegova fiziološka funkcija je sprožitev tako preživetvene poti kot poti programirane celične smrti. Poleg teh dveh poti postaja v zadnjem času vse bolj aktualna še tretja - nekroptoza. Znano je, da na te procese vplivajo tudi reaktivne kisikove spojine. S preprečitvijo nastanka ROS, bi lahko zavrla pojav vseh treh poti. Za preprečevanja nastanka ROS *in vitro* se lahko uporabljajo antioksidanti, med katerimi je antioksidant BHA široko uporabljen in velja za varnega.

Novejši terapevtski pristopi mnogokrat temeljijo na izničitvi učinka TNF- $\alpha$ . V magistrski nalogi smo se namenili preučiti vpliv TNF- $\alpha$  in BHA na človeške celice črevesnega adenokarcinoma HT-29.

V okviru naloge bomo preverili naslednje hipoteze:

- BHA v nižjih koncentracijah (do 500 $\mu$ M) za celice ni toksičen.
- BHA zmanjša na aktivacijo NF- $\kappa$ B
- BHA prepreči apoptozo, ki jo sproži TNF- $\alpha$ .
- BHA prepreči nekroptozo, ki jo sproži TNF- $\alpha$ .

Z namenom, da bi potrdili ali ovrgli zgornje hipoteze, bomo oba tipa celične smrti in preživetveno pot sprožene s TNF- $\alpha$  preučevali po dodatku dveh modificiranih peptidov: BV6 – kot antagonist proteinov za zaviranje apoptoze, in zVAD-fmk – kot zaviralec delovanja kaspaz. Poleg omenjenih dveh bomo uporabili tudi nekrostatin-1 – kot zaviralec nekroptoze.

### **3. MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 Materiali**

##### **3.1.1 Citokini, antagonisti, zaviralci in antioksidanti**

- TNF- $\alpha$  (IRC VIB, Gent) – citokin, ki ga izločajo imunske celice
- BV6 (Selleckchem.com) – antagonist proteinov za zaviranje apoptoze
- zVAD-fmk (Bachem) – zaviralec kaspaz
- BHA (Sigma) – antioksidant

##### **3.1.2 Fluorescenčna barvila in fluorogeni substrati**

- CM-H2DCFDA (Life technologies) – reagira z znotrajceličnimi ROS
- propidijev jodid (Sigma) – prehaja v celice s poškodovano celično membrano
- aneksin V (Affymetrix, eBioscience) – veže se na fosfatidilserin na celični membrani
- reagent Bradford (Bio-Rad) – nespecifično se veže na -NH- skupine proteinov
- substrat Ac-DEVD-AFC (Bachem) – omogoča spremljanje kaspazne aktivnosti
- Reagent ECL za kemiluminiscenco (Amersham Pharmacia Biotech) – omogoča odčitavanje rezultatov dobljenih s prenosom po Westernu

##### **3.1.3 Celične linije, gojišča, dodatki za gojišča in delo s celicami**

- gojišče McCoy 5A z L-glutaminom, brez natrijevega karbonata (Sigma)
- fetusni serum govedi (Gibco)
- penicilin/streptomycin (Sigma)
- glutamin (PAA)
- fosfatni pufer z NaCl (1x) s kalcijem in magnezijem – PBS (Lonza)
- tripsin (Gibco)
- celična linija HT-29 (ATCC)

##### **3.1.4 Ostale kemikalije**

- dimetilsulfoksid-DMSO (Merck)
- TRIS (Serva)
- NaCl (AppliChem)
- Natrijev lavrilsulfat-NaDS (Sigma)
- nonident P-40 (Roche Diagnostic)
- deoksiholna kislina (Sigma)
- etilendiamintetraocetna kislina – EDTA (Serva)

- enkrat prečiščena voda – dH<sub>2</sub>O
- goveji serumski albumin – BSA (Sigma)
- akrilamid (Serva)
- N,N,N',N'-tetrametiletildiamin-TEMED (Merck)
- amonijev persulfat-APS (Serva)
- mleko v prahu (Pomurske mlekarne)
- polisorbat 20 (Serva)
- ditiotreitrol-DTT (Sigma)
- 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina-HEPES (PAA)
- 3-[(3-holaminopropil)dimetilamonijev]-1-propansulfonat-CHAPS (Fluka)
- saharoza (Fluka)

### 3.1.5 Protitelesa

- kunčja monoklonska protitelesa proti IκBα (Cell signaling technology)
- mišja monoklonska protitelesa proti α-aktinu (Sigma)
- kozja protizajčja IgG (H+L)-hrpo (Jackson ImmunoResearch)
- kozja protimišja IgG IgM-hrpo (Jackson ImmunoResearch)

### 3.1.6 Pufri, geli in njihova sestava

Preglednica II: Uporabljeni pufri in njihova sestava.

| Pufer                            | Sestava pufra                                       |
|----------------------------------|---|
| pufer za radioimunoprecipitacijo | 50 mM TRIS  |
|                                  | 0,1 % (w/v) NaDS                                    |
|                                  | 1 % (w/v) NP-40                                     |
|                                  | 0,5 % (w/v) deoksiholne kisline                     |
|                                  | 1 mM EDTA   |
|                                  | 200 mM NaCl   |
|                                  | dopolnimo z dH <sub>2</sub> O in umerimo pH 8 s HCl |

| elektroforezni gel                      | 12,5 % ločevalni gel   | nanašalni gel              |
|---|--|----------------------------|
|   | 3,13 mL akrilamida   | 0,625 mL akrilamida        |
|   | 2,50 mL Tris pH= 8,8   | 1,25 mL Tris pH=6,8        |
|   | 4,27 mL dH <sub>2</sub> O  | 3,075 mL dH <sub>2</sub> O |
|   | 0,10 mL 10 % NaDS  | 0,05 mL 10 % NaDS          |
|   | 20 µL TEMED  | 10 µL TEMED                |
|   | 40 µL 10 % APS   | 20 µL 10 % APS             |
| ločevalni pufer (1,5M Tris/HCl; pH=8,8) | 18,2 % (w/v) Tris/HCl  |                            |
|   | Dopolnimo z dH <sub>2</sub> O do končnega volumna                |                            |
|   | s koncentrirano HCl uravnamo na pH=8,8                           |                            |
| 10x elektroforezni pufer za NaDS-PAGE   | 3 % (w/v) TRIS   |                            |
|   | 14,4 % (w/v) glicerola   |                            |
|   | 1 % (w/v) NaDS   |                            |
|   | dopolnimo z dH <sub>2</sub> O do končnega volumna                |                            |
| 10x prenašalni pufer za prenos Western  | 0,3 % (w/v) TRIS   |                            |
|   | 14,4 % (w/v) glicin  |                            |
|   | dopolnimo z dH <sub>2</sub> O do končnega volumna                |                            |
| 1x prenašalni pufer za prenos Western   | 20 % (v/v) metanola  |                            |
|   | 10 % (v/v) 10x prenašalni pufer za prenos Western                |                            |
|   | dopolnimo z dH <sub>2</sub> O do končnega volumna                |                            |
| 10x PBS-Tween pufer                     | 8,5 % (w/v) NaCl   |                            |
|   | 0,39 % (w/v) NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O |                            |
|   | 1,34 % (w/v) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O |                            |
|   | dopolnimo z dH <sub>2</sub> O do končnega volumna                |                            |
| 1x PBS-Tween pufer                      | 10% (v/v) 10x PBS  |                            |
|   | dopolnimo z dH <sub>2</sub> O do končnega volumna                |                            |
|   | 0,05% (v/v) Tween-a 20   |                            |
| raztopina posnetega mleka v prahu       | 5 % (w/v) mleko v prahu v 1x PBS-Tween pufru                     |                            |



|   |   |
|---|---|
| kaspazni pufer (detergent), pH=7          | 100 mM HEPES  |
|   | 200 mM NaCl   |
|   | 0,2 % (w/v) CHAPS                                       |
|   | 20 % (w/v) saharoze                                     |
|   | 2 mM EDTA   |
|   | dH <sub>2</sub> O do končnega volumna                   |
|   | 5 M NaOH za uravnavanje pH na 7                         |
| nanašalni pufer Laemmli za NaDS-PAGE (6x) | 30 % (v/v) glicerol                                     |
|   | 10 % (w/v) SDS  |
|   | 0,012 % (w/v) bromfenol modro                           |
|   | koncentracijski pufer (0,5 M Tris/HCl; pH= 6,8) do 10mL |
|   | 1mM DTT   |

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Osnovne metode dela s celicami

Nekompletnemu gojišču smo dodali glutamin (končna koncentracija 2 mM), penicilin/streptomycin (končna koncentracija 1 % (v/v)) in FBS (končna koncentracija 10 % (v/v)). Ko smo celicam menjali gojišče, smo odesali izrabljeno gojišče, jih sprali s PBS in previdno odpipetirali ustrezen volumen svežega, kompletnega gojišča, ogretega na 37°C. Celice smo gojili v inkubatorju na 37 °C, v prisotnosti 5 % CO<sub>2</sub>.

### 3.2.2 Odmrzovanje celic

Vialo s celicami smo vzeli iz zamrzovalnika (-80 °C) in jo odtalili v vodni kopeli pri 37 °C. Odtaljene celice smo prenesli v 10 mL predhodno ogretega kompletnega gojišča. Vsebino smo centrifugirali (1000 obratov/minuto, 5 minut, sobna temperatura). Supernatant smo odesali z vakuumsko črpalko, celice pa resuspendirali v 10 mL ustreznega gojišča in prenesli na ploščo s premerom 10 cm.

### 3.2.3 Precepljanje celic

Ko so celice v celoti prerasle površino (konfluentna plošča) smo jih uporabili za nadaljnje delo. Najprej smo odstranili gojišče, jih sprali s pufrom PBS in dodali raztopino tripsina za ločitev celic od podlage. Volumen raztopine tripsina je bil premosorazmeren površini plošče.

Ploščo smo nato inkubirali v inkubatorju, dokler se niso celice ločile od podlage. Celice smo potem razdelili na različne plošče. Za poskuse smo celice vedno predhodno prešteli in jih nacepili v koncentraciji  $10^6$  celic/mL.

### 3.7.4. Določanje vpliva dodanih spojin na celice

Celice smo dan pred poskusom nacepili na ustrezne plošče. Primerno razraslim celicam smo dodali antagonist BV6, zaviralec zVAD-fmk in antioksidant BHA. Vzorcem brez dodanih spojin smo le zamenjali izrabljeno gojišče s svežim. Najprej smo celice z dodanimi spojinami inkubirali pol ure, nato pa smo v gojišče dodali še TNF- $\alpha$ . Po inkubaciji smo celice pripravili za želeno analizo.

Preglednica III: Končne koncentracije uporabljenih spojin.

| Spojina       | Uporabljena koncentracija  |
|---------------|----------------------------|
| TNF- $\alpha$ | 20 ng/mL                   |
| BV6           | 1 $\mu$ M                  |
| zVAD-fmk      | 20 $\mu$ M                 |
| BHA           | 500 $\mu$ M in 100 $\mu$ M |

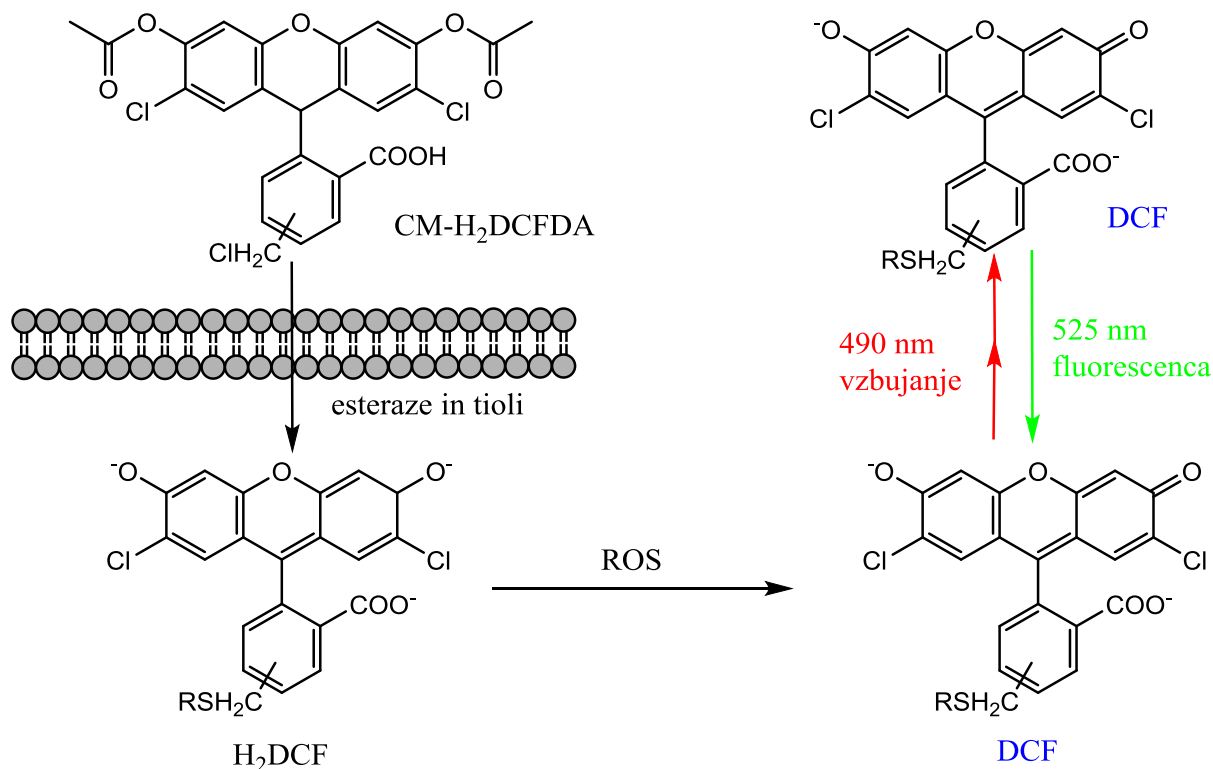
### 3.2.5 Meritve na pretočnem citometru

#### 3.2.5.1 Merjenje nastajanja reaktivnih kisikovih spojin

Celice smo dan pred poskusom nacepili na ploščo s 24 vdolbinicami. V epruvete za pretočno citometrijo smo prenesli gojišče s plavajočimi mrtvimi celicami, pritrjene pa smo prekrili s PBS. Epruvete smo centrifugirali 4 minute na 1000 obratov/minuto. Med centrifugiranjem smo pripravili fluorescenčno barvilo CM-H<sub>2</sub>DCFDA v pufru PBS s končno koncentracijo 5  $\mu$ M. Ko je bila vsebina v epruvetah centrifugirana, smo supernatant odsesali, usedlino pa smo resuspendirali v pripravljenem reagentu. Volumen reagenta smo enakomerno porazdelili med vzorce. S plošč smo odsesali pufer PBS in dodali vsebino epruвет. Celice smo postavili v inkubator na 37 °C, v prisotnosti 5% CO<sub>2</sub> za 45 minut. Nato smo reagent ponovno zbrali v ustrezne epruvete, pritrjene celice pa smo tripsinizirali. Raztopino tripsina smo s kapalko nakapali na ploščo, tako da je bilo dno jamic povsem pokrito. Tripsinizacijo smo ustavili z dodatkom celičnega gojišča in celice predstavili v ustrezne epruvete. Le te smo nato centrifugirali 4 minute na 1000 obratov/minuto. hkrati smo pripravili še propidijev jodid (0,2  $\mu$ g/mL) v PBS. Centrifugiranim vzorcem smo odsesali supernatant, usedlino pa resuspendirali

v 400  $\mu\text{L}$  PI v PBS. Analizo smo naredili na pretočnem citometru FACSCalibur s programom CellQuest. CM-H<sub>2</sub>DCFDA emitira pri 517-527 nm, PI pa pri 636 nm.

Fluorescenčno barvilo CM-H<sub>2</sub>DCFDA prehaja celično membrano. Esteraze prisotne v celici cepijo esterske vezi v fluorescenčnem barvilu, nastali intermediat pa reagira s kisikovimi radikali. Pri tem nastane produkt, ki po vzburjanju s svetlobo določene valovne dolžine oddaja svetlobo nižje valovne dolžine (slika 8).



Slika 8: Reakcija, ki poteče med barvilom CM-H<sub>2</sub>DCFDA in ROS. Po vzburjanju s svetlobo valovne dolžine 490 nm produkta oddaja (fluorescira) svetlobo valovne dolžine 525 nm (14).

### 3.2.5.2 Določanje celične smrti

Celice smo nacepili na ploščo s 24 vdolbnicami in jih pustili rasti preko noči. Po inkubaciji z dodanimi spojinami smo celično gojišče iz vzorcev (skupaj z mrtvimi celicami) prenesli v epruvete za pretočno citometrijo. Pritrjene celice pa smo tripsinizirali in tripsinizat prenesli v epruvetke. Vse skupaj smo nato centrifugirali 5 minut na 1000 obratov/minuto. Supernatant smo zavrgli. Barvila smo pripravili po navodilih proizvajalca. Celicam smo dodali 100  $\mu\text{L}$  raztopine aneksina V, 15 minut kasneje pa še 300  $\mu\text{L}$  propidijevega jodida (PI).

Vzorci smo nato analizirali na pretočnem citometru FACS Calibur s programom CellQuest. S kombinacijo barvil aneksin V in PI določimo odstotek celične smrti. Aneksin V je protein, ki se veže na fosfatidilserin, ki je običajno na notranji strani celične membrane, v zgodnji fazi

apoptoze pa se premesti na zunanjo stran. Propidijev jodid lahko prehaja samo poškodovano membrano. Do tega pride v primeru nekroze ali pozne apoptoze (15).

### 3.2.6 Priprava celičnih lizatov

Celice smo nacepili na plošče s premerom 6 cm in jih gojili en dan pred dodajanjem preučevanih spojin. Po določenem času smo gojišče s plavajočimi mrtvimi celicami prenesli v centrifugirko in centrifugirali 4 minute na 4 °C pri 1000 obratov/min. Usedlino smo nato resuspendirali v približno 50 µL hladnega pufra za radioimunoprecipitacijo. Pritrjene celice smo po spiranju s pufrom PBS lizirali na plošči s 50 µL pufra za radioimunoprecipitacijo. S strgalcem smo postrgali površino plošče in lizat s pipeto prenesli v mikrocentrifugirke, kjer smo jih združili z ustreznimi centrifugiranimi usedlinami.

Lizate smo nato razbili z desetsekundno izpostavitvijo ultrazvoku in jih nato centrifugirali 12 minut na 4 °C pri 13000 obratov/minuto. Dobljeni supernatant smo prenesli v nove mikrocentrifugirke. Vzorce smo ves čas hranili na ledu. Po pripravi smo jih nemudoma uporabili za analizo ali pa jih shranili na -20 °C.

### 3.2.7 Analiza proteinov

#### 3.2.7.1 Določanje koncentracije proteinov po Bradfordu

V celičnih lizatih smo določili koncentracijo proteinov s pomočjo metode po Bradfordu. Predhodno smo pripravili umeritveno krivuljo. Le to smo pridobili s pomočjo znanih koncentracij govejega serumskega albumina.

#### Priprava umeritvene krivulje

Koncentracijo proteinov smo določali z reagentom Bradford. Začetna koncentracija BSA je bila 10 mg/mL, zato smo pripravili tudi BSA s koncentracijo 100 µg/mL. V posamezne odprtine na plošči smo odpipetirali volumne po shemi, ki je predstavljena v preglednici IV.

Preglednica IV: Volumni BSA in vode, ki smo jih uporabili za pripravo umeritvene krivulje.

| Koncentracija BSA (µg/mL) | Volumen BSA s koncentracijo 100µg/mL | Volumen prečiščene vode (µL) | Volumen reagenta Bradford (µL) |
|---------------------------|--------------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| 0                         | 0                                    | 160                          | 40                             |
| 2                         | 4                                    | 156                          | 40                             |
| 6                         | 12                                   | 148                          | 40                             |

|    |    |     |    |
|----|----|-----|----|
| 10 | 20 | 140 | 40 |
| 14 | 28 | 132 | 40 |
| 16 | 32 | 128 | 40 |
| 20 | 40 | 120 | 40 |
| 25 | 50 | 110 | 40 |

Absorbanco smo merili na spektrometru pri 595 nm. Na podlagi dobljenih rezultatov smo izrisali umeritveno krivuljo, ki smo jo nadalje uporabili za izračun koncentracije proteinov v naših vzorcih.

#### Določanje koncentracije proteinov v vzorcu

Vzorci smo redčili z dH<sub>2</sub>O v razmerju 1:1000. Na mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinicami smo odpipetirali 40 µL na sobno temperaturo ogretega reagenta Bradford in 160 µL redčenega vzorca. Tako pripravljenim vzorcem smo na spektrometru pri 595 nm izmerili absorbanco.

Dobljene absorbance smo nato preračunali v koncentracije po naslednji formuli:

$$c[\mu g/ml] = \left( \frac{A - n}{k} \right) * 1000$$

c.....koncentracija celokupnih proteinov v vzorcu

A....izmerjena absorbanca

n.....začetna vrednost umeritvene krivulje

k.....naklon umeritvene krivulje

S pomočjo izračunanih koncentracij smo izračunali volumen vzorca, v katerem se nahaja 50 µg proteinov. Uporabili smo spodnjo formulo:

$$V[\mu l] = \frac{50\mu g}{c} * 1000$$

V.....volumen vzorca

c.....koncentracija celokupnih proteinov v vzorcu

### **3.2.8 Merjenje aktivnosti kaspaz**

Po določenem času inkubacije celic s preučevanimi spojinami smo pripravili popolne celične lizate, kot je opisano v poglavju 3.7.5. Proteinom smo določili koncentracije in v jamice mikrotitrsko plošče prenesli ustrezen volumen lizata, ki je vseboval 50 µg proteinov. Predhodno smo v jamice dodali kaspazni pufer z 20 µM DTT – DTT smo dodali naknadno. Mikrotitrsko ploščo smo nato 10 minut inkubirali v inkubatorju na 37 °C in potem dodali še

fluorogeni substrat Ac-DEVD-AFC do končne koncentracije 10  $\mu$ M. Končni volumen v vdolbinici je bil 100  $\mu$ L. Razgradnjo substrata smo spremljali spektrofluorometrično 30 min pri 37 °C z vzbujanjem pri 400 nm in merjenjem oddane svetlobe pri 505 nm. Iz dobljenih meritev smo izračunali hitrost reakcije in jo definirali kot spremembo fluorescence v časovni enoti.

### **3.2.9 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS (NaDS PAGE)**

Za NaDS PAGE smo uporabili 12,5 % poliakrilamidni gel. Elektroforeza je potekala v elektroforeznem pufru pri napetosti 300 V in električnem toku 35 mA/gel.

Vzorci smo pripravili tako, da smo predhodno izračunanemu volumnu vzorca dodali nanašalni pufer Laemlli (6x) z DTT s končnim 1,5-kratnim redčenjem. Vzorci smo inkubirali 6 min na 95 °C in jih po hitrem centrifugiranju nanесли na gel. Poleg vzorcev smo za kontrolo velikosti proteinov nanесли tudi proteinske standarde PageRuler.

### **3.2.10 Prenos western in imunodetekcija proteinov**

Ko je bila elektroforeza končana, smo proteine iz gela prenesli na nitrocelulozno membrano. Prenos je potekal 2,5 ure pri napetosti 300 V in električnemu toku 250 mA.

Membrano smo inkubirali 45 minut na sobni temperaturi v 5% (w/v) raztopini posnetega mleka v pufru PBS-Tween. S tem smo blokirali nezasedena vezavna mesta na membrani. Membrano smo nato stresali s primarnimi protitelesi preko noči na 4 °C. Membrano smo nato sprali petkrat po 10 minut v pufru PBS-Tween. Sledila je 45-minutna inkubacija s sekundarnimi protitelesi. Nato smo ponovno spirali petkrat po deset minut v pufru PBS-Tween. Tako primarna kot sekundarna protitelesa smo pripravili v pufru PBS-Tween.

Proteinske lise na membrani smo zaznali na podlagi kemoluminiscence z uporabo reagenta ECL, ki smo ga pripravili v razmerju 1:1.

### **3.2.11 Statistična analiza rezultatov**

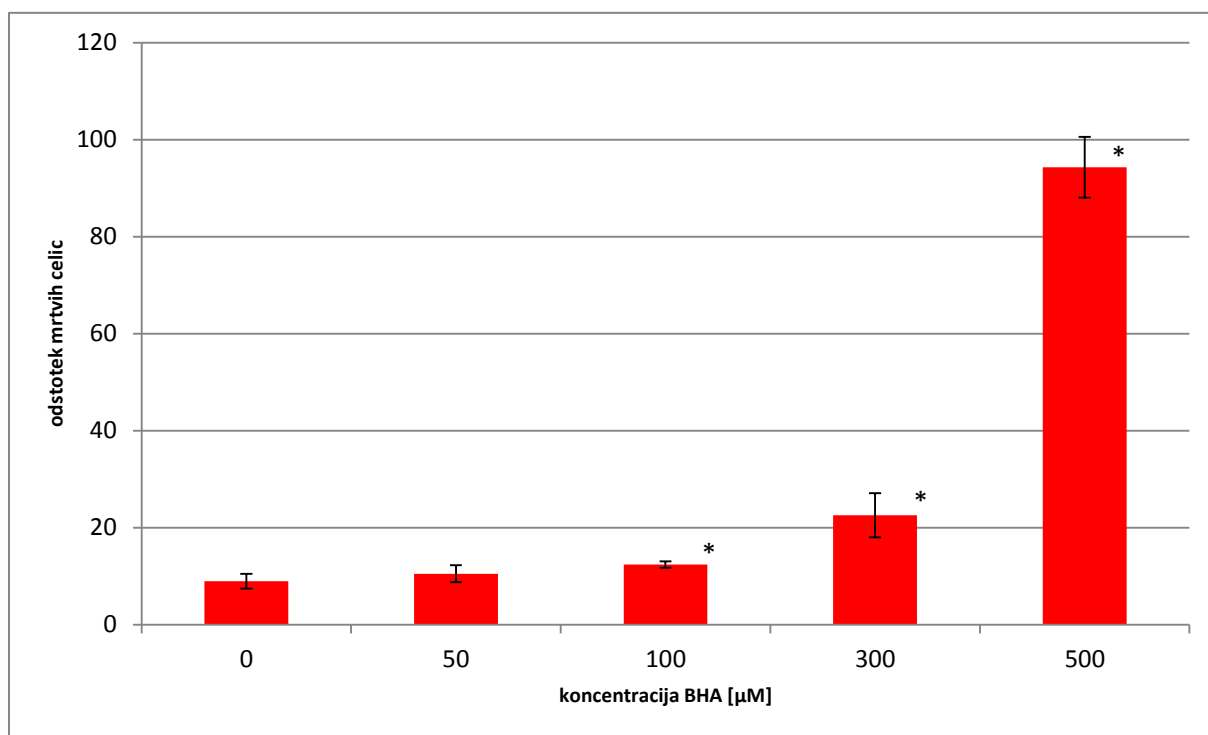
Rezultate, ki smo jih pridobili, smo analizirali s pomočjo dvostranskega t-testa s stopnjo tveganja  $\alpha=0,05$ . Primerjali smo vzorce z negativno kontrolo (celice brez dodatkov kemikalij) ali posamezne vzorce med sabo. Kot rezultat t-testa so bile p vrednosti, ki smo jih primerjali z vrednostjo  $\alpha$ . Vrednost p, ki je bila manjša od 0,025, je pomenila statistično značilno razliko med vzorcema, ki smo jih primerjali. V grafih so statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolo označene z zvezdico (\*). Statistično značilno razliko med posameznimi vzorci smo označevali z zavitim oklepajem.

## 4. REZULTATI

### 4.1 Testiranje citotoksičnosti BHA

Najprej nas je zanimalo, kako BHA vpliva na preživetje celic oziroma ali deluje citotoksično na celice HT-29. Celice smo 24 ur gojili ob prisotnosti 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$  in 500  $\mu\text{M}$  BHA.

Ugotovili smo, da pride do povišanega odstotka celične smrti v primerjavi s kontrolo že pri koncentraciji 100  $\mu\text{M}$  BHA. 300  $\mu\text{M}$  in 500  $\mu\text{M}$  BHA sta po 24 urah toksična za več kot 20 % celične populacije (slika 9). Za nadaljnje delo smo zato izbrali 100  $\mu\text{M}$  in 500  $\mu\text{M}$  BHA ter njuna učinka primerjali.

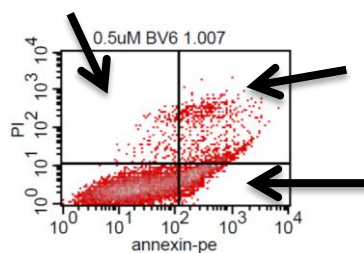


Slika 9: Celična smrt v odvisnosti od koncentracije BHA po 24-urni inkubaciji. Rezultat je povprečje treh vzporednih poskusov  $\pm$  SD.

\* Vrednosti se značilno razlikujejo od kontrole (0  $\mu\text{M}$  BHA).

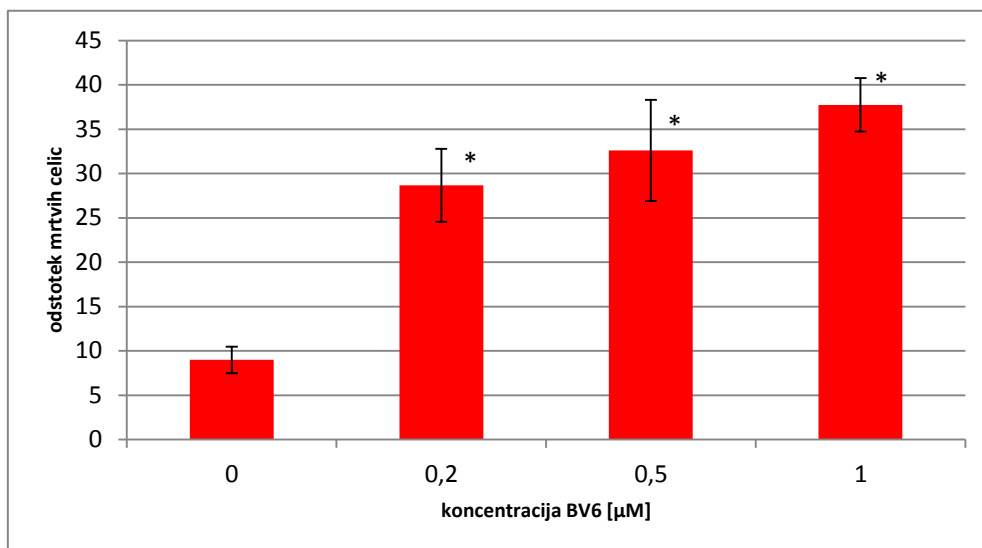
### 4.2 Testiranje citotoksičnosti BV6

Pri indukciji apoptoze s  $\text{TNF-}\alpha$  smo uporabljali BV6, ki deluje kot antagonist cIAP. Zaradi narave njegovega delovanja in skopih informacij v literaturi (19, 20, 21) smo najprej preverili, ali povzroči smrt pri celicah HT-29. Celicam smo dodali 0,2  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$  in 1  $\mu\text{M}$  BV6 ter inkubirali 24 ur. Mrtve celice se nahajajo v zgornjem levem, zgornjem desnem in spodnjem desnem kvadrantu točkovnega diagrama (slika 10).



Slika 10: Primer analize celične smrti s pretočnim citometrom. Delež mrtvih celic je seštevek treh kvadrantov, ki so označeni s puščicami. Kot mrtve celice so upoštevane vse, ki so aneksin V in/ali PI pozitivne.

Vse izbrane koncentracije so statistično značilno povišale delež mrtvih celic. Vendar se po učinku različne koncentracije med seboj bistveno ne razlikujejo (odstotek mrtvih celic od 28 % do 37 %) (slika 11). V nadaljevanju smo uporabili 1  $\mu$ M BV6.



Slika 11: Vpliv različnih koncentracij modificiranega peptida BV6 na celično smrt. Rezultat je povprečje treh vzporednih poskusov  $\pm$  SD.

\* Vrednosti se statistično značilno razlikujejo od kontrole (0  $\mu$ M BV6).

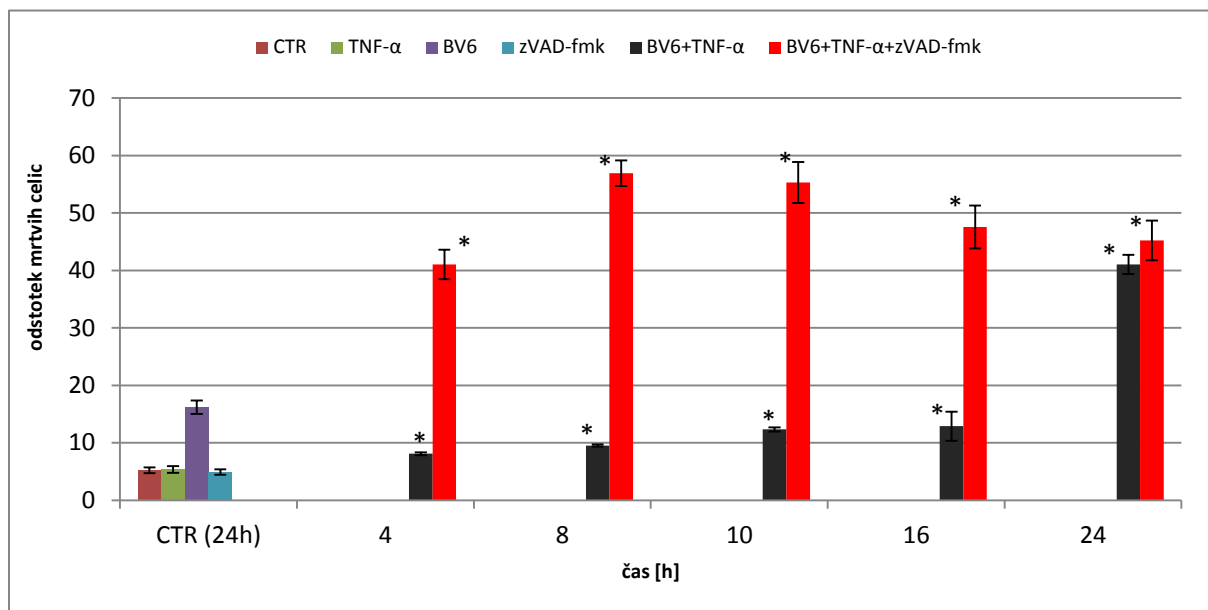
### 4.3 Vpliv TNF- $\alpha$ , BV6 in zVAD-fmk na celično smrt

Najprej smo določili časovni okvir, v katerem TNF- $\alpha$  izzove različne oblike celične smrti za kasnejše ugotavljanje vpliva BHA. Za apoptozo in nekroptozo smo si izbrali iste časovne točke in sicer 4, 8, 10, 16 in 24 ur.

Pri kontrolah smo opazili toksičnost BV6 (slika 12), medtem ko zVAD-fmk sam ni bil toksičen. Pri celicah z dodatkom kombinacije BV6, zVAD-fmk in TNF- $\alpha$  je prišlo do



statistično značilne spremembe že pri 4 urah, ko je bil delež mrtvih celic okrog 40 %. Pri celicah z dodatkom kombinacije TNF- $\alpha$  in BV6 ni povzročil tako nenadnega dviga, a vseeno je delež mrtvih celic s časom naraščal. Po sproženi apoptozi je odstotek mrtvih celic veliko manjši kot po sproženi nekroptozi, izjema je 24-urna inkubacija, ko je odstotek podoben. Odločili smo se, da bomo apoptozo in vpliv BHA opazovali po 24 urah, ko je odstotek smrtnost celic najvišja.

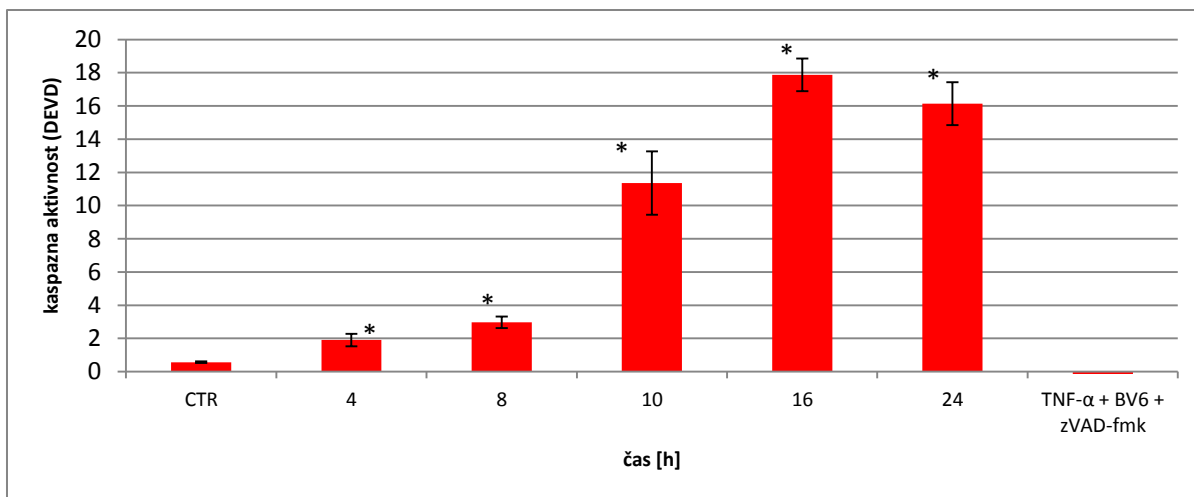


Slika 12: Prikaz odstotka celične smrti v različnih časovnih točkah. V prvem delu so prikazane kontrole (CTR 24h) in sicer celice brez dodatkov (CTR), BV6 (1 $\mu$ M), zVAD-fmk (20  $\mu$ M) in TNF- $\alpha$  (20 ng/mL). TNF- $\alpha$  smo dodajali s 30 minutnim zamikom glede na dodatek BV6 in zVAD-fmk. Rezultat je povprečje 3 vzporednih poskusov  $\pm$  SD.

\* Vrednosti se statistično značilno razlikujejo od celic brez dodatkov.

#### 4.4 Vpliv TNF- $\alpha$ , BV6 in zVAD-fmk na aktivnost kaspaz

Želeli smo preveriti, ali se ob dodatku kombinacije BV6 in TNF- $\alpha$  poveča aktivnost kaspaz. S poskusom smo dokazali, da se efektorske apoptotske kaspaze pod vplivom kombinacije TNF- $\alpha$  in BV6 aktivirajo (slika 13). Do statistično značilnega dviga kaspaz pride že po 4 urah in se s časom le še stopnjuje do 16 ur, nato pa začne aktivnost padati. Kot kontrolo smo uporabili tudi kombinacijo TNF- $\alpha$ , BV6 in zVAD-fmk in s tem dokazali, da zVAD-fmk zares inhibira delovanje kaspaz. Inkubacija je trajala 24 ur.

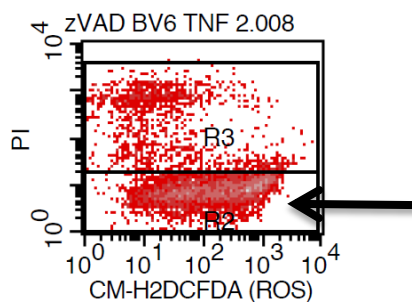


Slika 13: Aktivnost kaspaz po dodatku kombinacije TNF- $\alpha$  in BV6 po različno dolgih inkubacijah. Kot kontrolo smo kombinaciji TNF- $\alpha$  in BV6 dodal še zVAD-fmk. TNF- $\alpha$  (20 ng/mL) smo dodali 30 minut po dodatku BV6 (1  $\mu$ M) in zVAD-fmk (20  $\mu$ M) Rezultat je povprečje 3 vzporednih poskusov  $\pm$  SD.

\* Vrednosti se statistično značilno razlikujejo od kontrole brez dodatkov po 24 h (CTR).

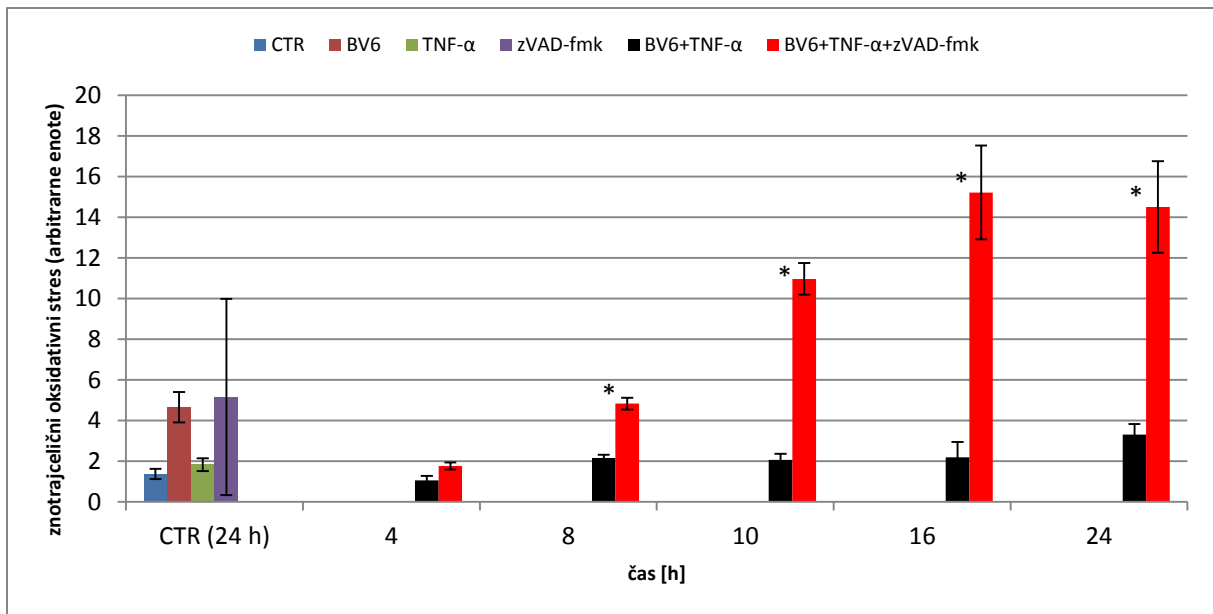
#### 4.5 Vpliv TNF- $\alpha$ , BV6 in zVAD-fmk na nastanek ROS

Nastanek ROS, ki je neposredni pokazatelj znotrajceličnega oksidativnega stresa, smo merili s pomočjo pretočne citometrije, celice pa smo pobarvali s kombinacijo barvila CM-H<sub>2</sub>DCFDA in PI (slika 14).



Slika 14: Točkovni diagram, ki ga izriše pretočni citometer, Količino ROS smo upoštevali le pri PI negativnih celicah oz. celicah, ki so imele intaktno membrano (označeno s puščico).

Sam BV6 poviša koncentracijo ROS bolj kot v kombinaciji s TNF- $\alpha$  (slika 15). Kombinacija BV6 in zVAD-fmk je imela pri kontroli brez TNF- $\alpha$  še skoraj 10-krat močnejši učinek kot sam BV6. TNF- $\alpha$  je učinek kombinacije BV6 in zVAD-fmk bistveno zmanjšal, a se je količina ROS s časom vseeno postopno povečevala.

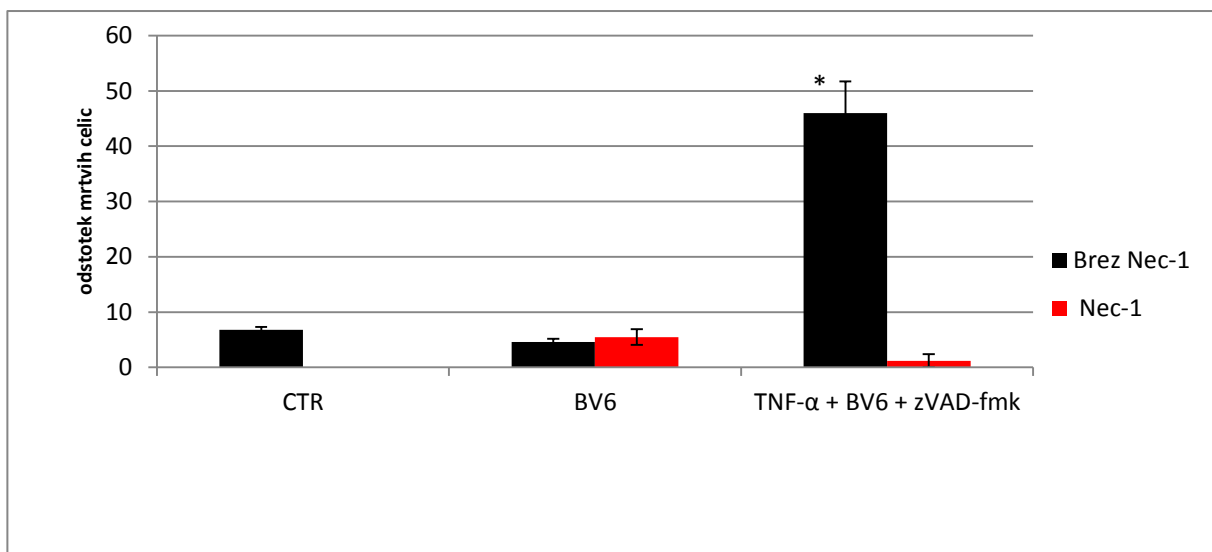


Slika 15: Nastanek ROS po različno dolgi inkubaciji celic HT-29 s kombinacijo TNF- $\alpha$  in BV6 ter kombinacijo TNF- $\alpha$ , BV6 in zVAD-fmk. V prvem delu so prikazane kontrole (CTR 24h) in sicer celice brez dodatkov (CTR), dodatek TNF- $\alpha$ , BV6 in zVAD-fmk posamezno. TNF- $\alpha$  (20 ng/mL) je bil dodan 30 minut po dodatku BV6 (1  $\mu$ M) in zVAD-fmk (20  $\mu$ M). Rezultat je povprečje 3 vzporednih poskusov  $\pm$  SD.

\* Vrednosti se statistično značilno razlikujejo od celic brez dodatkov.

#### 4.6 TNF- $\alpha$ v kombinaciji z BV6 in zVAD-fmk sproži nekroptozo

Želeli smo preveriti, katero vrsto celične smrti povzroči kombinacija BV6 in zVAD-fmk. Ob prisotnosti nekrostatina-1, ki prepreči nekroptozo, je bil učinek kombinacije BV6 in zVAD-fmk izničen (slika 16).



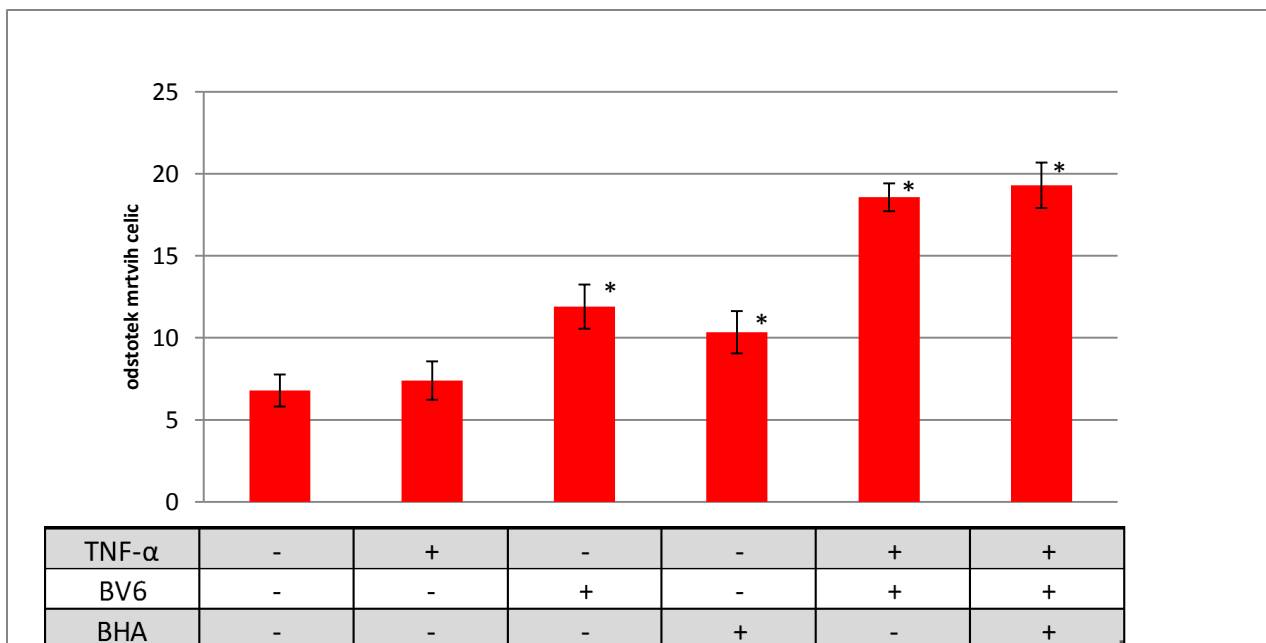
Slika 16: Vpliv nekrostatina-1 na celično smrt po 4-urni inkubaciji. TNF- $\alpha$  (20 ng/mL) smo dodali s 30 minutnim zamikom v primerjavi z BV6 (1  $\mu$ M), zVAD-fmk (20  $\mu$ M) in nekrostatinom-1 (Nec-1). Rezultat je povprečje 3 vzporednih poskusov  $\pm$  SD.

\* Vrednosti se statistično značilno razlikujejo od celic brez dodatka Nec-1, BV6 ali zVAD-fmk (CTR – kontrola).

## 4.7 Vpliv BHA na celično smrt

### 4.7.1 Vpliv 100 $\mu$ M BHA na celično smrt, aktivnost kaspaz in oksidativni stres

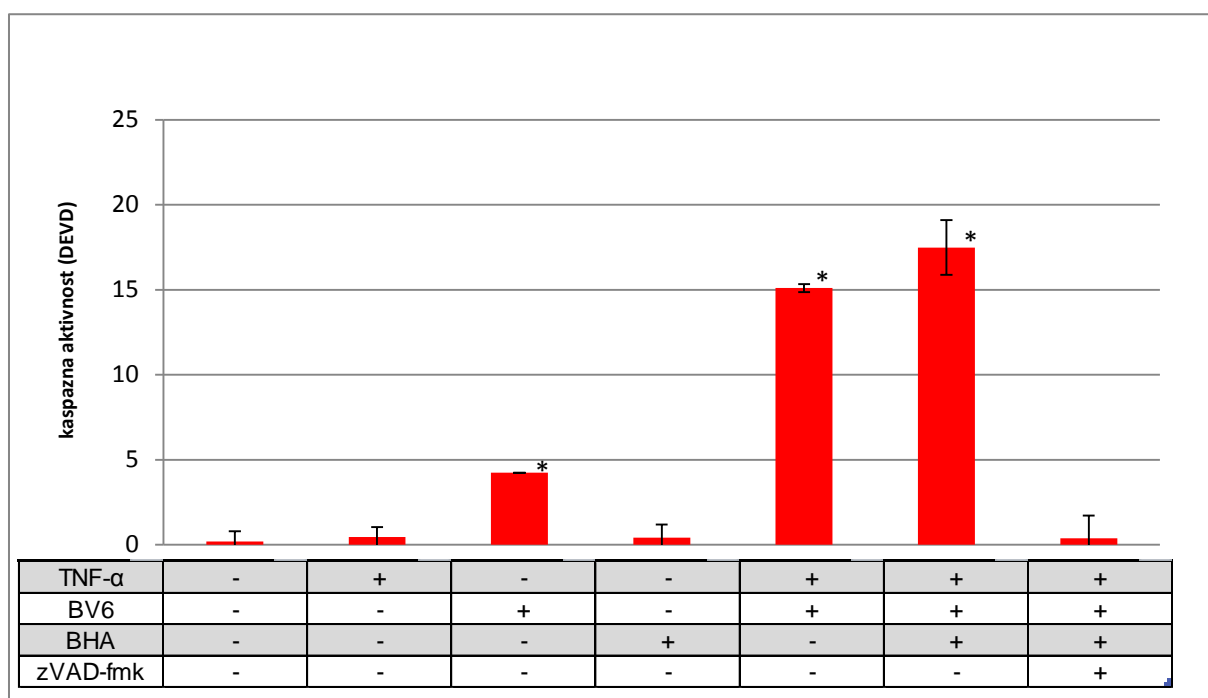
Do statistično značilnega zvišanja odstotka celične smrti v primerjavi z negativno kontrolo (7 %) je po 24 urah prišlo pri celicah po dodatku BV6 (12 %) oziroma BHA (10 %) (slika 17). Kombinacija BV6 in TNF- $\alpha$  je povzročila 18 % celično smrt. BHA ni imel vpliva na preživetje celic pri apoptozi, sproženi s kombinacijo BV6 in TNF- $\alpha$ .



Slika 17: Vpliv 100  $\mu$ M BHA na celično smrt sproženo s TNF- $\alpha$  (20 ng/mL) po 24-urni inkubaciji. BHA in BV6 (1  $\mu$ M) smo dodali 30 minut pred dodatkom TNF- $\alpha$ . Rezultat je povprečje 3 vzporednih poskusov  $\pm$  SD.

\* Vrednosti se statistično značilno razlikujejo od kontrole (celice brez dodatkov).

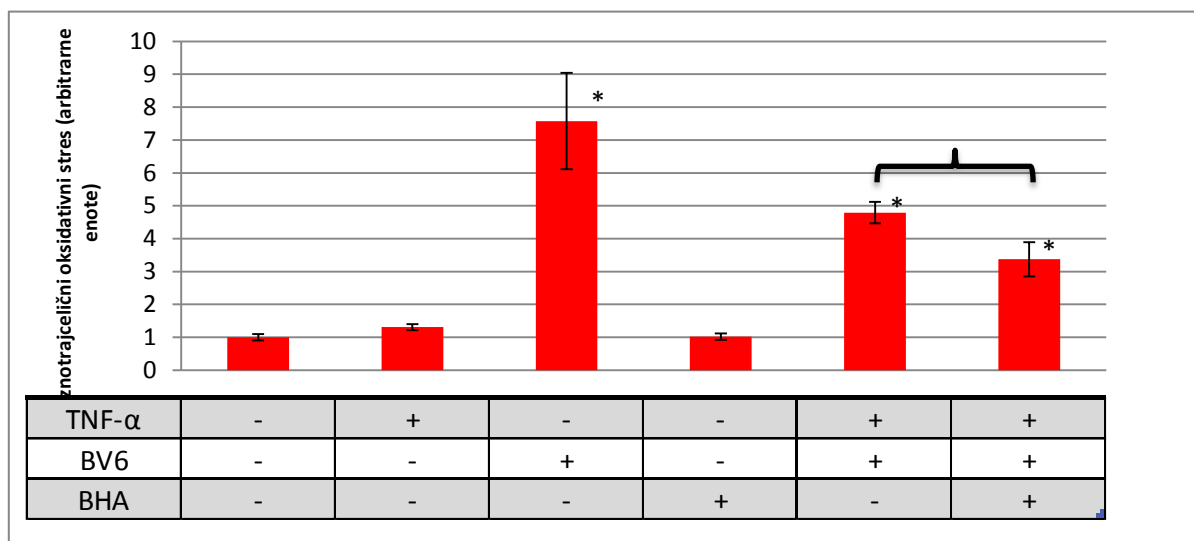
BHA ali TNF- $\alpha$  posamično ne povečata aktivnosti kaspaz, medtem ko jo BV6 statistično značilno poveča (slika 18). Še močneje se poveča kaspazna aktivnost po dodatku kombinacije BV6 in TNF- $\alpha$ . Hkratni dodatek BHA kaspazno aktivnost le nekoliko (statistično neznačilno) poveča.



Slika 18: Aktivnost kaspaz po 10-urni inkubaciji z označenimi spojinami. Negativno kontrolo predstavljajo celice, ki jim je poleg vseh treh spojin dodan še zVAD-fmk. TNF- $\alpha$  (20 ng/mL) smo dodali s polurnim zamikom glede na BV6 (1  $\mu$ M), BHA (100  $\mu$ M) in zVAD-fmk (20  $\mu$ M). Rezultat je povprečje 3 vzporednih poskusov  $\pm$  SD.

\* Vrednosti se statistično značilno razlikujejo od kontrole (celice brez dodatkov).

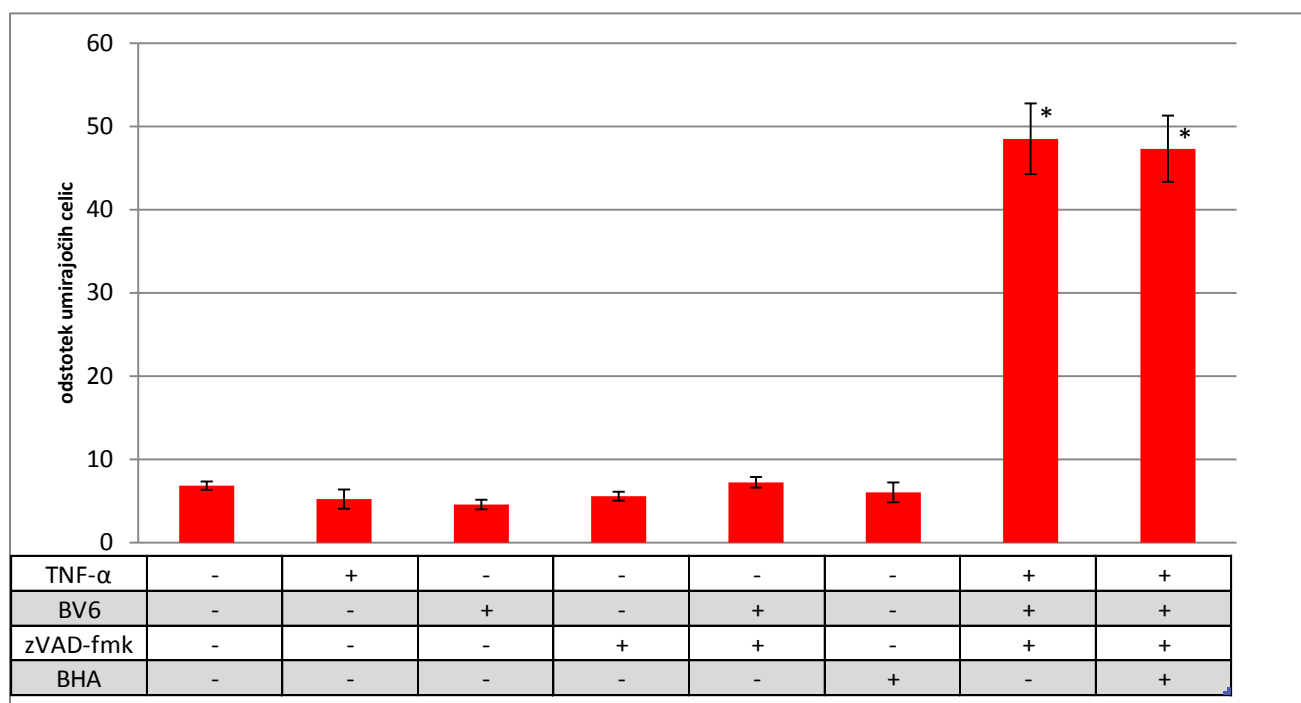
BV6 že sam po sebi po 24 urah zviša količino nastalih ROS za več kot 7-krat (slika 19). Tudi kombinacija BV6 in TNF- $\alpha$  ima podoben učinek (skoraj 5-kratno zvišanje). Po dodatku BHA h kombinaciji TNF- $\alpha$  in BV6 se je količina ROS statistično značilno znižala.



Slika 19: Vpliv 100  $\mu$ M BHA na oksidativni stres po 24-urni inkubaciji. BHA in BV6 (1  $\mu$ M) smo dodali 30 minut pred dodatkom TNF- $\alpha$  (20 ng/mL). Rezultat je povprečje 3 vzporednih poskusov  $\pm$  SD.

\* Vrednosti se statistično značilno razlikujejo od kontrole. Zaviti oklepaj označujestatistično značilno razliko v primerjavi s pozitivno kontrolo (celice z dodatkom TNF- $\alpha$  in BV6).

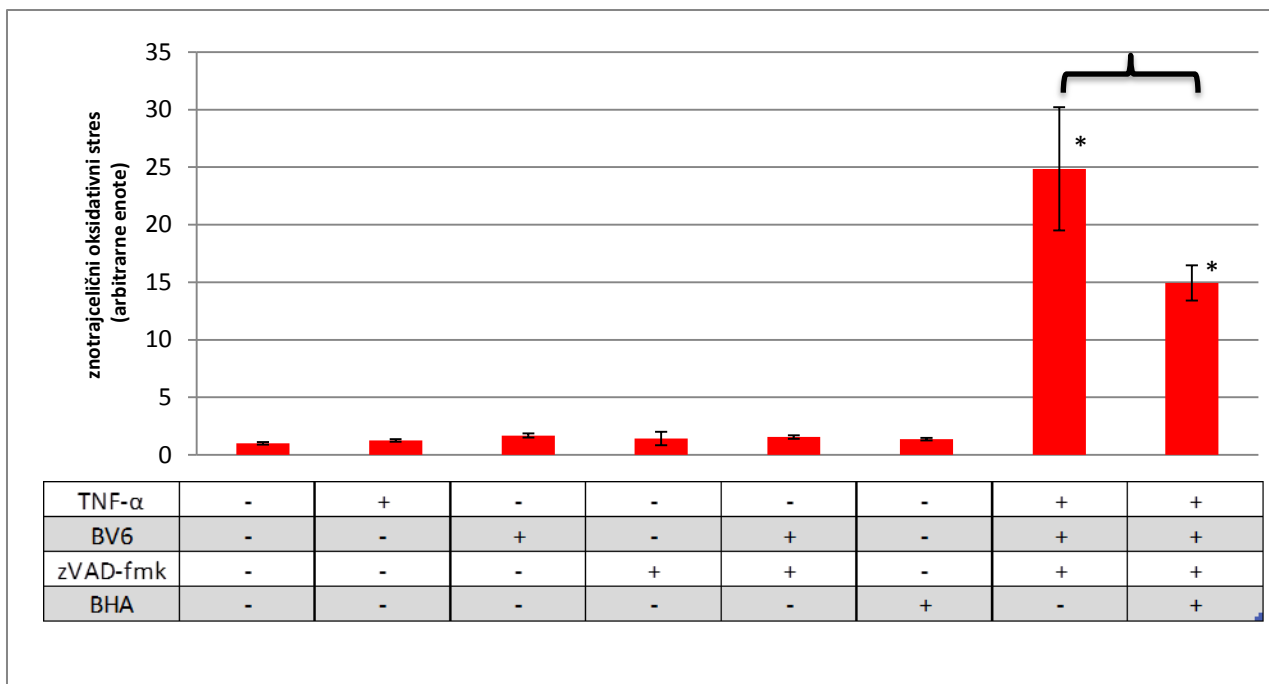
Nobena izmed posamično dodanih TNF- $\alpha$ , BV6, zVAD-fmk ali BHA po 4-urni inkubaciji statistično značilno ni povečala celične smrti (slika 20). Statistično značilno povečanje se pojavi po dodatku kombinacije TNF- $\alpha$ , BV6 in zVAD-fmk (pozitivna kontrola). Po dodatku 100  $\mu$ M BHA pozitivni kontroli ne pride do dodatnih statistično značilnih sprememb.



Slika 20: Vpliv 100  $\mu$ M BHA na nekroptozo po 4-urni inkubaciji. Celicam smo dodali BV6 (1  $\mu$ M), zVAD-fmk (20  $\mu$ M) in BHA 30 minut pred dodatkom TNF- $\alpha$  (20 ng/mL). Rezultat je povprečje 3 vzporednih poskusov  $\pm$  SD.

\* Vrednosti se statistično značilno razlikujejo od kontrole (celice brez dodatkov).

Nobena od uporabljenih posamično dodanih TNF- $\alpha$ , BV6, zVAD-fmk ali BHA po 4 urah ni statistično značilno povečala količino ROS (slika 21). Povečana količina ROS se pojavi po dodatku kombinacije BV6, zVAD-fmk in TNF- $\alpha$  (pozitivna kontrola). Dodatek 100  $\mu$ M BHA pozitivni kontroli statistično značilno zniža količino nastalih ROS.



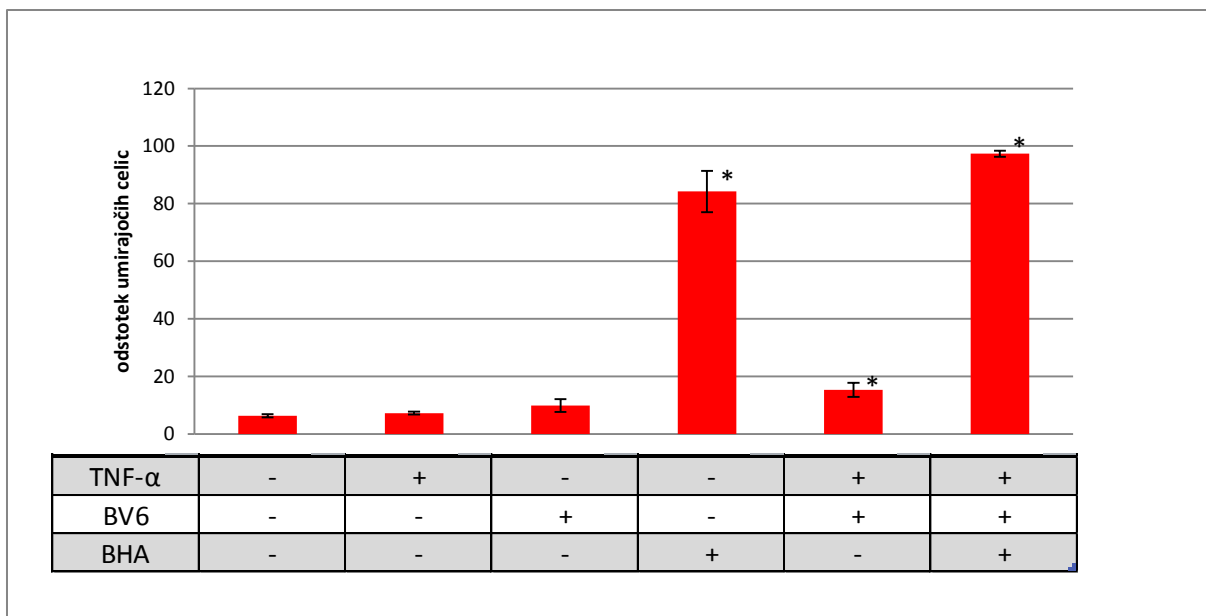
Slika 21: Vpliv 100  $\mu\text{M}$  BHA na znotrajcelični oksidativni stres po 4-urni inkubaciji. TNF- $\alpha$  (20 ng/mL) je bil dodan s polurnim zamikom glede na dodatek BV6 (1  $\mu\text{M}$ ), zVAD-fmk (20  $\mu\text{M}$ ) in BHA. Rezultate smo pridobili s pomočjo pretočne citometrije. Rezultat je povprečje 3 vzporednih poskusov  $\pm$  SD.

\* Vrednosti se statistično značilno razlikujejo od kontrole (celice brez dodatkov). Z zavitim oklepajem je prikazana statistično značilna razlika s pozitivno kontrolo (kombinacija TNF- $\alpha$ , BV6 in zVAD-fmk)

#### 4.7.2 Vpliv 500 $\mu\text{M}$ BHA na celično smrt, aktivnost kaspaz in oksidativni stres

500  $\mu\text{M}$  BHA po 24 urah povzroči smrt večinskega dela celic, v kombinaciji z BV6 in TNF- $\alpha$  pa se delež še dodatno (statistično neznačilno) poveča (slika 22). V 500  $\mu\text{M}$  koncentraciji torej BHA ne deluje kot lovilec radikalov, ampak citotoksično.

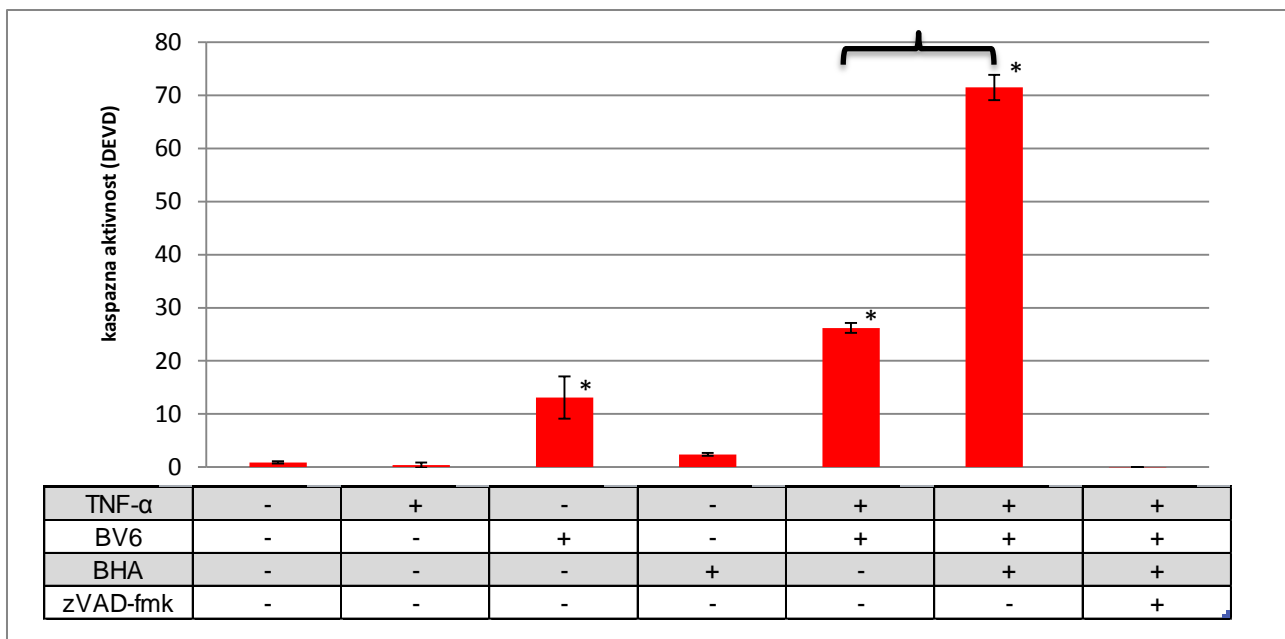




Slika 22: Vpliv 500  $\mu$ M BHA na celično smrt po 24-urni inkubaciji. Celicam smo dodali BV6 (1  $\mu$ M) in BHA 30 minut pred dodatkom TNF- $\alpha$  (20 ng/mL). Rezultat je povprečje 3 vzporednih poskusov  $\pm$  SD.

\* Vrednosti se statistično značilno razlikujejo od kontrole (celice brez dodatkov).

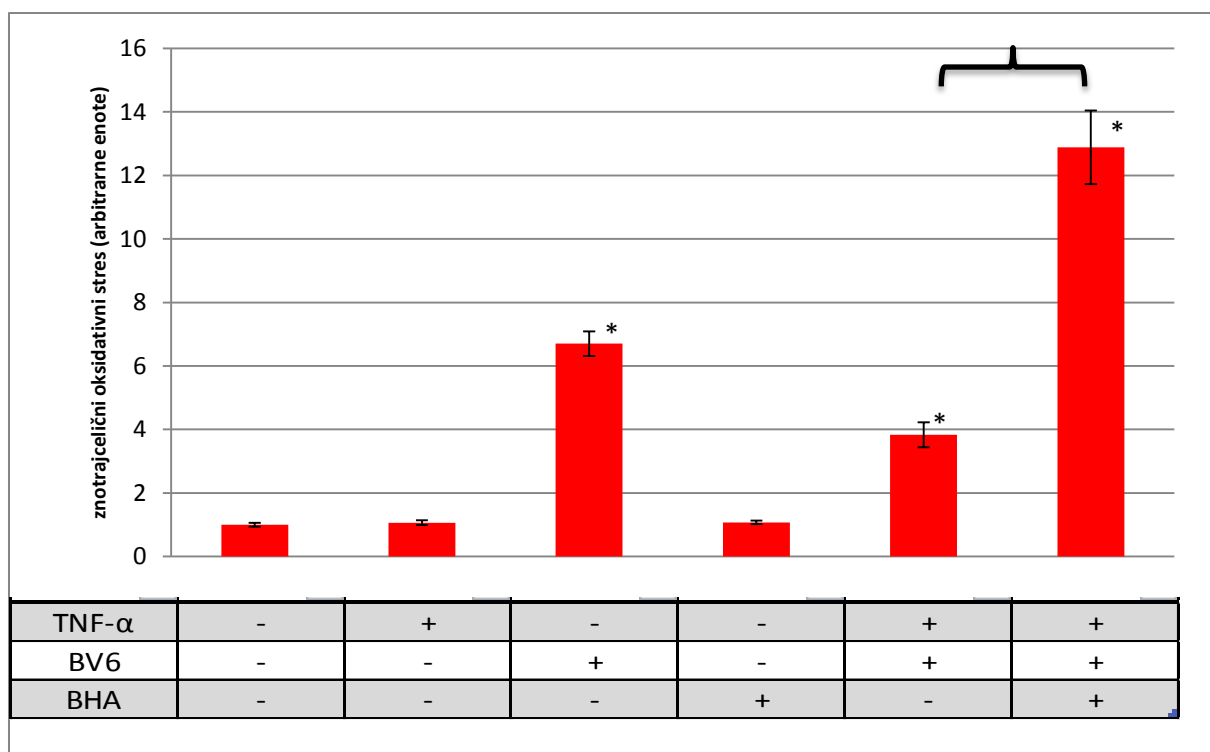
Celicam smo posamično dodali TNF- $\alpha$ , BV6 ali BHA, kombinacijo TNF- $\alpha$  in BV6 (pozitivna kontrola) oziroma kombinacijo TNF- $\alpha$ , BV6 in BHA in inkubirali 10 ur (slika 23). Posamični dodatek 500  $\mu$ M BHA ali TNF- $\alpha$  ne statistično značilno vpliva na kaspazno aktivnost. Do statistično značilnega povečanja aktivnosti kaspaz pride po dodatku BV6 posamično, po dodatku kombinacije BV6 in TNF- $\alpha$  ter po dodatku kombinacije BV6, TNF- $\alpha$  in BHA. Dodatek zVAD-fmk popolnoma zavre aktivnost kaspaz.



Slika 23: Vpliv 500  $\mu$ M BHA na aktivnost kaspaz po 10-urni inkubaciji. TNF- $\alpha$  (20 ng/mL) smo dodali s polurnim zamikom glede na BV6 (1  $\mu$ M), BHA (500  $\mu$ M) in zVAD-fmk (20  $\mu$ M). Rezultat je povprečje 3 vzporednih poskusov  $\pm$  SD.

\* Vrednosti se statistično značilno razlikujejo od kontrole (celice brez dodatkov). Z zavitim oklepajem je označena primerjava med pozitivno kontrolo (kombinacija TNF- $\alpha$  in BV6) in vzorcem s kombinacijo TNF- $\alpha$ , BV6 in BHA.

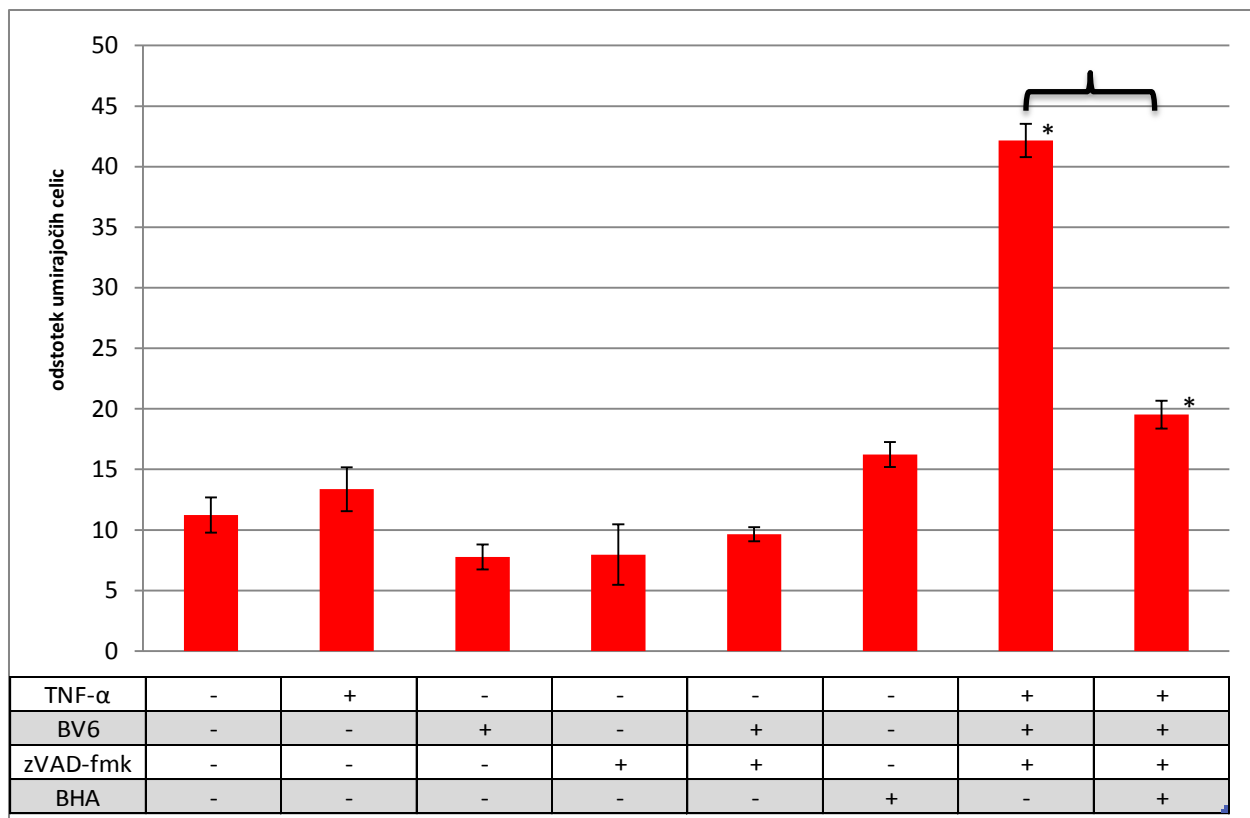
500  $\mu$ M BHA v kombinaciji s TNF- $\alpha$  in BV6 po 24 urah za več kot 3-krat poveča znotrajcelični oksidativni stres v primerjavi s pozitivno kontrolo (kombinacija BV6 in TNF- $\alpha$ ) (slika 24). Pri tej koncentraciji BHA ni več lovilec radikalov, ampak deluje prooksidativno.



Slika 24: Vpliv 500  $\mu$ M BHA na oksidativni stres po 24-urni inkubaciji. Za preverjanje nastanka ROS smo celicam dodali BV6 (1  $\mu$ M) in BHA 30 minut pred dodatkom TNF- $\alpha$  (20 ng/mL). Rezultat je povprečje 3 vzporednih poskusov  $\pm$  SD.

\* Vrednosti označujejo statistično značilno razliko s kontrolo (celice brez dodatkov). Z zavitim oklepajem je označena primerjava s pozitivno kontrolo (kombinacija TNF- $\alpha$  in BV6)

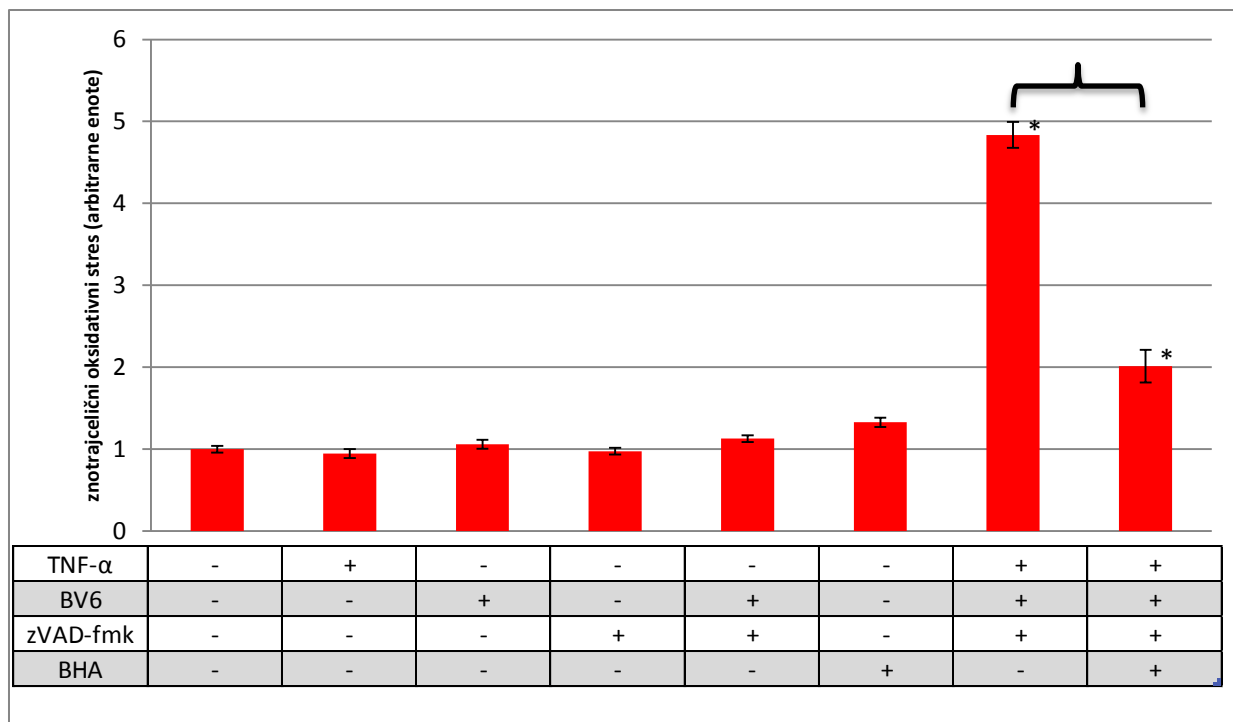
Nič izmed dodanih TNF- $\alpha$ , BV6, zVAD-fmk ali BHA po 4 urah ne statistično značilno poveča delež mrtvih celic v primerjavi s kontrolo (brez dodatkov) (slika 25). Do statistično značilnega porasta celične smrti pride pri pozitivni kontroli (kombinacija TNF- $\alpha$ , BV6 in zVAD-fmk). Po dodatku 500  $\mu$ M BHA pozitivni kontroli pa delež mrtvih celic statistično značilno upade.



Slika 25: Vpliv 500  $\mu\text{M}$  BHA na celično smrt po 4-urni inkubaciji. BV6 (1  $\mu\text{M}$ ), zVAD-fmk (20  $\mu\text{M}$ ) in BHA so bili dodani 30 minut pred dodatkom TNF- $\alpha$  (20 ng/mL). Rezultat je povprečje 3 vzporednih poskusov  $\pm$  SD.

\* Vrednosti označujejo statistično značilno razliko s kontrolo (celice brez dodatkov). Z zavitim oklepajem je označena primerjava med pozitivno kontrolo (dodatek TNF- $\alpha$ , BV6 in zVAD-fmk) in vzorcem z dodatkom BHA.

Nobena izmed dodanih TNF- $\alpha$ , BV6 ali zVAD-fmk po 4 urah nimajo statistično značilnega vpliva na dvig količine ROS (slika 26). Po dodatku BHA se količina ROS opazno dvigne, a porast ni statistično značilen. Pri nekroptози (kombinacija TNF- $\alpha$ , BV6 in zVAD-fmk) pride do velikega porasta ROS, ki pa ga dodatek 500  $\mu\text{M}$  statistično značilno zniža.



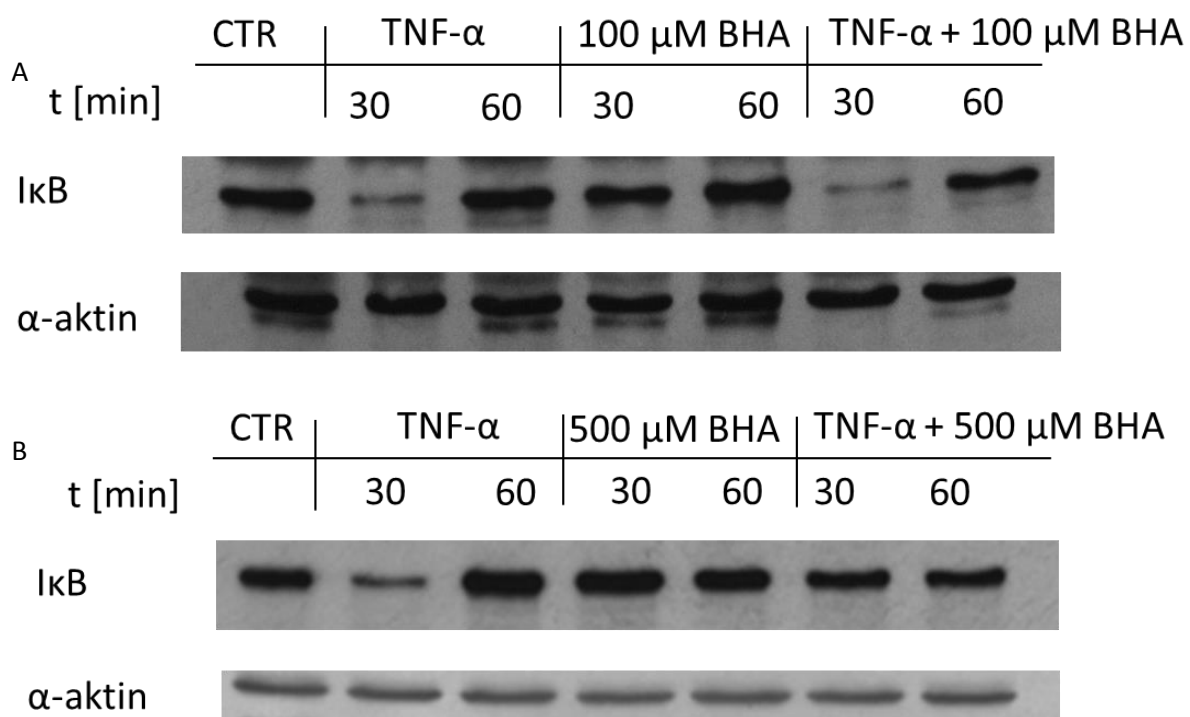
Slika 26: Vpliv 500  $\mu$ M BHA na znotrajcelični oksidativni stres po 4-urni inkubaciji. TNF- $\alpha$  (20 ng/mL) smo dodajali s polurnim zamikom glede na dodatek BV6 (1  $\mu$ M), zVAD-fmk (20  $\mu$ M) in BHA. Rezultat je povprečje 3 vzporednih poskusov  $\pm$  SD.

\* Vrednosti označujejo statistično značilno razliko s kontrolo (celice brez dodatkov). Z zavitim oklepajem je označena primerjava s pozitivno kontrolo (dodatek TNF- $\alpha$ , BV6 in zVAD-fmk)

#### 4.8 Vpliv BHA na preživetveno pot

Vpliv BHA na sprožitev preživetvene poti smo opazovali pri koncentracijah 100  $\mu$ M in 500  $\mu$ M. Glede na predhodne poskuse smo se odločili spremljati preživetveno pot po 30-minutni in 60-minutni inkubaciji. Pri kombinaciji TNF- $\alpha$  in BHA, smo BHA dodali 30 minut pred TNF- $\alpha$ . Po inkubaciji smo lizat izmerili celokupno količino proteinov. Na nitrocelulozni membrani smo sledili proteinu I $\kappa$ B. Enakomeren nanos smo preverili z detekcijo  $\alpha$ -aktina.

30 minut po dodatku TNF- $\alpha$  pride do aktivacije preživetvene poti (slika 27). Sam BHA ne sproži preživetvene poti. Na preživetveno pot sproženo s TNF- $\alpha$ , 100  $\mu$ M BHA ni imel vpliva. 500  $\mu$ M BHA je po 30-minutni inkubaciji skoraj zaustavil preživetveno pot, vendar se je po 60-minutni inkubaciji protein I $\kappa$ B ponovno pojavil.



Slika 27: Vpliv 100  $\mu$ M (A) in 500  $\mu$ M (B) BHA na prisotnost I $\kappa$ B v popolnih lizatih celic.

## 5. RAZPRAVA

### 5.1 Citotoksičnost BHA in BV6

Antioksidant BHA se v različnih koncentracijah uporablja kot konzervans v živilih, ki vsebujejo veliko maščob (margarina, rastlinska olja, živalske maščobe, pekovski izdelki, kosmiči) (preglednica V) (22).

Preglednica V: Deleži BHA v različnih izdelkih (22, 37).

| VRSTA IZDELKA           | DELEŽ BHA (%) | KOLIČINA ŽIVILA V ENEM OBROKU (g) |
|-------------------------|---------------|-----------------------------------|
| rastlinska olja         | 0,002-0,02    | 5 (1 čajna žlička)                |
| maslo                   | max 0,02      | 6 (1 čajna žlička)                |
| mast                    | max 0,02      | 6 (1 čajna žlička)                |
| pekovski izdelki        | 0,01-0,04     | 20-30                             |
| baza za žvečilni gumi   | do 0,1        | 1,4 (1 žvečilni gumi)             |
| kosmiči                 | 0,005-0,02    | 30                                |
| dehidriran pire krompir | 0,001         | 80                                |

Ko smo preverjali vpliv različnih koncentracij BHA na preživetje celic, smo ugotovili, da že 100  $\mu$ M BHA statistično značilno poveča delež mrtvih celic (22 %), medtem ko 500  $\mu$ M BHA povzroči skoraj 90 % celično smrt (slika 9). Pri priporočenem uživanju živil, ki vsebujejo BHA so celične koncentracije BHA daleč pod toksičnimi koncentracijami. Le tem se nekoliko približa baza za žvečilni gumi, a bi jo bilo potrebno za doseg citotoksičnega učinka zaužiti kar 100 g naenkrat.

Citotoksičnost BHA so preučevali tudi v drugih študijah, ki so bile izvedene na drugih celičnih linijah, kot so celična linija Vero, podganji hepatociti in HeLa celice (23, 24). Na omenjenih celičnih linijah je 500  $\mu$ M BHA povzročil skoraj 100 % celično smrt. BHA pri koncentracijah nižjih od 200  $\mu$ M pa skorajda ni imel vpliva na celično viabilnost. Naše ugotovitve se delno skladajo z objavljenim, saj 50  $\mu$ M BHA ne povzroči statistično značilnih sprememb. V nasprotju z objavami na drugih celicah, pa je 100  $\mu$ M BHA za celice HT-29 že citotoksičen (slika 9). Zato smo se odločili uporabiti delovni koncentraciji 100  $\mu$ M in 500  $\mu$ M BHA.

Ravno tako smo morali prilagoditi koncentracije BV6 (antagonista cIAP), ki sam po sebi sproži celično smrt (25). Prisotnost BV6 omogoči celicam sprožitev apoptoze ob dodatku

TNF- $\alpha$ . Brez BV6 bi se namreč ob dodatku TNF- $\alpha$  samodejno sprožila preživetvena pot preko aktivacije NF- $\kappa$ B. Optimalna koncentracija BV6 bi bila 0,2  $\mu$ M, saj povzroči najmanj celične smrti. Vendar niti 0,2 niti 0,5  $\mu$ M BV6 ob dodatku TNF- $\alpha$  ne povzročita dovolj velikega odstotka celične smrti za preučevanje vpliva BHA na sprožene signalne poti s TNF- $\alpha$  (slika 11). Ker v literaturi pogosto uporabljajo BV6 v koncentraciji 1  $\mu$ M, smo se zanjo odločili tudi mi (38, 39).

## **5.2 Določitev časovnih točk in opredelitev vrste celične smrti: vpliv TNF- $\alpha$ , BV6 in zVAD-fmk na nastanek ROS, aktivnosti kaspaz in sprožitev nekroptoze**

Učinek BHA smo želeli preverjati na robustnih modelih celične smrti, zato smo izbrali časovno točko 24 ur, v kateri TNF- $\alpha$  povzroči vsaj 30 % smrtnost ne glede na vrsto celične smrti. Celice, pri katerih smo sprožili nekroptozo, so umirale v večji meri pri isti časovni točki v primerjavi z apoptozo (slika 12). Pri sproženi apoptozi je bil delež mrtvih celic viden šele po 24-urni inkubaciji.

Zaščitni učinek BHA na celice pred delovanjem TNF- $\alpha$  smo vrednotili preko merjenja znotrajceličnega nastajanja ROS v še živih celicah v enakih časovnih intervalih kot celično smrt (slika 15). Z nevtralizacijo ROS se namreč v celici prekinejo tudi kaskadne poti tako apoptoze kot nekroptoze. Pri sproženi apoptozi je bil, podobno kot celična smrt, nastanek ROS, vidno povečan šele po 24 urah. Pri sproženi nekroptozi je prišlo do statistično značilnega dviga količine ROS že po 8 urah. Količina ROS se je večala vse do časovne točke 16 ur. Kljub vsemu, da je bil maksimalen nivo ROS po 16 urah, smo tudi za merjenje znotrajceličnih količin ROS izbrali časovno točko 4 ure, saj smo pri sproženi nekroptozi v isti časovni točki (4 ure) določali tudi delež mrtvih celic. Količina ROS je bila tudi po 4 urni inkubaciji dovolj velika, da smo lahko opazovali vpliv BHA, kot lovilca radikalov.

Aktivnost kaspaz smo spremljali po 4, 8, 10, 16 in 24 urah (slika 13). Kaspazna aktivnost se je s časom dvigovala in s tem smo potrdili, da na celicah HT-29 kombinacija BV6 in TNF- $\alpha$  zares sproži apoptozo. Odločili smo se, da bomo nadalje aktivnost kaspaz spremljali po 10-urni inkubaciji.

Sprožitev nekroptoze smo preverili z dodatkom nekrostatina-1, ki zavira RIP1 in posledično onemogoči sprožitev nekroptotične kaskade reakcij. Nekrostatin-1 celicam omogoča višje preživetje ob prisotnosti kombinacije BV6, TNF- $\alpha$  in zVAD-fmk. Dejstvo, da je nekrostatin-1 po 4-urni inkubaciji statistično značilno znižal smrtnost celic, potrjuje, da kombinacija BV6, TNF- $\alpha$  in zVAD-fmk dejansko sproži nekroptozo. Inkubacija samo z BV6 ni statistično značilno vplivala na preživetje celic (slika 16).



### 5.3 Vpliv BHA na procese, ki jih sproži TNF- $\alpha$

V različnih časovnih točkah smo preverjali vpliv 100  $\mu$ M BHA na sproženo nekroptozo (4 ur), na aktivnost kaspaz (10 ur) in na sproženo apoptozo (24 ur). 24-urna inkubacija BHA ni statistično značilno vplivala na preživetje celic, kljub evidentnemu trendu povečanja odstotka mrtvih celic (slika 17). Po dodatku kombinacije TNF- $\alpha$  in BV6 je bilo povečano nastajanje ROS, ki se je ob dodatku BHA statistično značilno zmanjšalo (slika 19). BHA je statistično neznačilno povečal kaspazno aktivnost po dodatku kombinacije TNF- $\alpha$  in BV6 (slika 18). Sam BHA v koncentraciji 100  $\mu$ M ni povečal kaspazne aktivnosti.

Ravno tako BHA po 4-urni inkubaciji ne vpliva na nekroptozo, sproženo s kombinacijo TNF- $\alpha$ , BV6 in zVAD-fmk (slika 20). Je pa BHA statistično značilno zmanjšal količino ROS pri sproženi nekroptози (slika 19).

Vpliv BHA na procese, ki jih sproži TNF- $\alpha$ , je bil že potrjen na celični liniji L929, ko so s kombinacijo TNF- $\alpha$ , BV6 in zVAD-fmk sprožali nekroptozo. 100  $\mu$ M BHA je učinkovito zaščitil celice L929 pred smrtjo in tako so potrdili vpletenost ROS pri poteku kaskade nekroptotičnih reakcij (19). Pri celicah HT-29 tega pojava nismo opazili pri nobeni vrsti celične smrti. Možnost je, da ROS niso nevtralizirani v dovolj veliki meri ali pa steče proces celične smrti, kjer ROS ne igrajo ključne vloge.

Citiotoksičnost BHA so potrdili že na drugih celičnih linijah (23, 24), in naj bi bila posledica povečanja kaspazne aktivnosti (23), ne poročajo pa o vplivu kombinacije naših preučevanih spojin in BHA. Postavilo se nam je vprašanje, zakaj se po 10 urah aktivnost kaspaz statistično značilno poveča (slika 18), medtem ko se po 24 urah delež smrtnosti ne statistično značilno poveča. Da bi našli odgovor na vprašanje zakaj BHA ne vpliva na potek nekroptoze, glede na to, da je delovanje kaspaz zavrto, smo se odločili, da uporabimo višjo – 500  $\mu$ M koncentracijo BHA .

Po 24 urah nismo dobili koristnih informacij o vplivu 500  $\mu$ M BHA preko njegovega antioksidativnega delovanja, saj je bila celična smrt visoka že zaradi samega BHA, ob dodatku kombinacije TNF- $\alpha$  in BV6 pa se je še povečala. Posledično nismo mogli opazovati vpliva na nastanek ROS, saj je bilo živih celic zelo malo. BHA po 10 urah ni povečal kaspazne aktivnosti, je pa prišlo do velikega povečanja pri hkratni inkubaciji s kombinacijo TNF- $\alpha$  in BV6, kar se je nakazovalo že pri koncentraciji 100  $\mu$ M BHA (sliki 18 in 23). S tem poskusom smo lahko potrdili predvidevanje, da pri celicah HT-29 zgoraj omenjena kombinacija sproži povečano aktivnost kaspaz, česar sam BHA ne povzroči. Glede na to, da smo apoptozo in kaspazno aktivnost merili v različnih časih, ne moremo z gotovostjo trditi, da celična smrt, ki jo sproži BHA, ni posledica aktivacije kaspaz. Možno je, da je časovni zamik

posledica delovanja na mitohondrije in sprostitve citokroma c. Pri tem pride do aktivacije intrinzične poti apoptoze, kjer se kaspaze aktivirajo naknadno (23). Ali ta mehanizem velja tudi za celice HT-29, bi lahko preverili s pomočjo merjenja membranskega potenciala mitohondrijev ali pa bi izvedli poskuse z izoliranimi mitohondriji in ugotavljali, ali pride do sprostitve citokroma c v celično gojišče ali ne.

Pri sprožanju nekroptoze smo ugotovili statistično značilen padec po dodatku 500  $\mu\text{M}$  BHA tako pri deležu mrtvih celic kot pri nastanku ROS (sliki 25 in 26). Potrdili smo, da pri sproženi nekroptozni ROS igrajo pomembno vlogo kot sekundarni prenašalci v kaskadi reakcij, ki se aktivirajo ob vezavi TNF- $\alpha$  na receptor. 500  $\mu\text{M}$  koncentracija BHA je dovolj visoka, da prepreči nastanek ROS in s tem prepreči pojav nekroptoze. Pri sproženi apoptozni tega nismo uspeli dokazati. Pri celicah HT-29 se apoptozo sproži veliko težje kot nekroptozo. Ni bilo mogoče skrajšati časa inkubacije in ugotoviti vpliv BHA in ROS na potek apoptoze v časovnih točkah, ko 500  $\mu\text{M}$  BHA še ne deluje citotoksično.

TNF- $\alpha$  lahko sproži tudi preživetveno pot. Po 30 minutah pride do razgradnje I $\kappa$ B, po 60 minutah pa se le ta zopet pojavi, saj gre za negativno povratno zanko v odnosu med NF $\kappa$ B in njegovim zaviralcem I $\kappa$ B (slika 27).

Časovni točki 30 in 60 minut smo uporabili tudi pri dodajanju BHA v obeh delovnih koncentracijah posamično in hkrati s TNF- $\alpha$ . Sam BHA ob odsotnosti TNF- $\alpha$  ne vpliva na aktivacijo preživetvene poti, kar se sklada s prejšnjimi ugotovitvami glede različnih vrst celične smrti (slika 27).

Ugotovili so že, da imajo ROS koncentracijsko odvisen učinek na preživetveno pot. Nižje koncentracije ROS preživetveno pot stimulirajo, visoke pa jo zavirajo (9). Predvidevali smo torej, da BHA kot lovilec radikalov preprečuje sprožitev preživetvene poti.

Na osnovi spremljanja koncentracije I $\kappa$ B je razvidno, da 100  $\mu\text{M}$  BHA ne vpliva na potek preživetvene poti. 500  $\mu\text{M}$  BHA po 30 minutah prepreči razgradnjo I $\kappa$ B in s tem zaustavi preživetveno pot. 100  $\mu\text{M}$  koncentracija BHA je očitno prešibka, da bi opazno zaustavila preživetveno pot.

Zaključimo lahko, da pri celicah HT-29 ROS igrajo pomembno vlogo pri poteku nekroptoze in jih s 500  $\mu\text{M}$  BHA učinkovito nevtraliziramo. Tega žal nismo mogli potrditi v primeru sprožene apoptoze, saj nismo mogli preučiti vpliva BHA na potek apoptoze, poleg tega smo pri celicah HT-29 apoptozo veliko težje sprožili kot nekroptozo. Vrednost praktičnega dela magistrske naloge je tudi ta, da smo med prvimi poskušali ustvariti sistem sprožitve vseh signalnih poti TNF- $\alpha$  pri celicah HT-29. To je namreč ena od redkih celičnih linij, ki vsebuje vse proteinske sisteme za izpeljavo vseh treh signalizacijskih kanalov po kateri vpliva TNF- $\alpha$ .

za celično smrt oziroma preživetje. 500  $\mu\text{M}$  BHA preko inaktivacije ROS zaustavlja preživetveno pot. Sam BHA je že pri 100  $\mu\text{M}$  koncentraciji po 24-urni inkubaciji pri celicah HT-29 povzročil statistično značilno povečanje deleža smrtnosti celic torej ni dvoma, da je BHA citotoksičen.

## 6. ZAKLJUČEK

Preglednica VI: Potrditev ali ovrženje hipotez, ki smo jih postavili na začetku.

| HIPOTEZA  |                                     |
|---|-------------------------------------|
| Sam BHA v nižjih koncentracijah (do 500 $\mu$ M) za celice ni toksičen. | OVRŽENA                             |
| BHA vpliva na aktivacijo NF- $\kappa$ B                                 | POTRJENA                            |
| BHA vpliva na apoptozo, ki jo sprožimo s TNF- $\alpha$ .                | NE MOREMO NITI POTRDITI NITI OVREČI |
| BHA vpliva na nekroptozo, ki jo sprožimo s TNF- $\alpha$ .              | POTRJENA                            |

Učinki antioksidanta BHA na celice HT-29 so koncentracijsko in časovno odvisni. 100  $\mu$ M BHA ne vpliva na nobeno izmed treh poti, ki smo jih sprožili s TNF- $\alpha$ . 500  $\mu$ M BHA po 24 urah izkazuje preveliko citotoksičnost, zato nismo mogli preučiti vpliva na apoptozo, uspešno pa prepreči nekroptozo in preživetveno pot. Sam BHA ne poveča kaspazne aktivnosti, ampak le v kombinaciji s TNF- $\alpha$  in BV6.

Glede na to, da smo ugotovili koncentracijsko odvisnost, je možno, da BHA deluje tudi preko kakšnega drugega mehanizma in ne samo kot lovilec radikalov. Še vedno ostaja odprto vprašanje, kaj se zgodi pri kombinaciji TNF- $\alpha$ , BV6 in BHA, ki privede do povečanja kaspazne aktivnosti. Če bi BHA deloval zgolj samo kot lovilec radikalov in bi s tem zmanjšal količino ROS, bi morala biti kaspazna aktivnost nižja.

Za nadaljne raziskave je potrebno optimizirati model apoptoze, saj kombinacija TNF- $\alpha$  in BV6 v uporabljenih koncentracijah ne daje zadovoljivih rezultatov, višje koncentracije BV6 pa so za celice toksične.

## 7. LITERATURA

1. Broker E. L, Kruyt A. E. F, Giaccone G: Cell death independent of caspases: A review. *Clin Cancer Res* 2005; 11 (9): 3155-3162.
2. Edinger L. A, Thompson B. C: Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology* 2004; 16: 663-669.
3. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N: Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013; 1833: 3448-3459.
4. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang t. F, Zhou T. T, Liu B, Bao K. J: Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation* 2012; 45: 487-498.
5. Galluzi 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.
6. Vandenaabele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G: Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature* 2010; 11: 700-714.
7. Gilmore T. D: Introduction to NF- $\kappa$ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 2006; 25: 6680-6684.
8. Male D, Brostoff M, Roth B. D, Roitt M. I: Immunology, Eighth edition, Elsevier, China, 2013: 111-113.
9. Bubici C, Papa S, Dean K, Franzoso G: Mutual cross-talk between reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B: molecular basis and biological significance. *Oncogene* 2006; 25: 6731-6748.
10. Kaminsky O. V, Zhivotovsky B: Free radicals in crosstalk between autophagy and apoptosis. *Neobjavljena verzija članka*.
11. European Pharmacopeia 7th edition.
12. Decachimie s.a.: Butylhydroxyanisole / BHA. Dostopno na svetovnem spletu: <https://www.ulprospector.com/en/eu/Food/Detail/11520/368790/Butylhydroxyanisole---BHA/2.6.2016>.
13. Daley F. R, Daley J. S: Organic chemistry. Učbenik dostopen na: [www.ochem4free.com/30.5.2016](http://www.ochem4free.com/30.5.2016).
14. Held P, Newick K: Using BioTek's Synergy™ HT Reader to Measure Reactive Oxygen Species (ROS) Generation in Stimulated Cells Detecting Cell Growth Stimulation. BioTek 2008.

15. Dostopno na svetovnem spletu: <http://www.jove.com/science-education/5650/annexin-v-and-propidium-iodide-labeling/3.6.201.6>
16. Spierings D, McStay G, Saleh M, Bender C, Chipuk J, Maurer U, Green D R: Connected to death: The mitochondrial pathway of apoptosis. *Science* 2005; 310: 66-67.
17. Elmore S: Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35: 495–516.
18. Vercammen D, Beyaert R, Denecker G: Inhibition of Caspases Increases the Sensitivity of L929Cells to Necrosis Mediated by Tumor Necrosis Factor. *J Exp Med.* 1998; 187: 1477-85.
19. Vercammen D, Beyaert R, Denecker G, Goossens V, Van Loo G, Declercq W, Grooten J, Fiers W, Vandenabeele P: Smac mimetics triggers necroptosis in pancreatic carcinoma cells when caspase activation is blocked. *J Exp Med.* 1998; 187:1477-85.
20. Graber T. E, Holcik M: Distinct roles of the cellular inhibitors of apoptosis proteins 1 and 2. *Cell Death Dis.* 2011; 2: e135.
21. Muller-Sienerth N, Dietz L, Holtz P, Kapp M, Grigoleit U. G, Schmuck C, Wajant H, Siegmund D: SMAC Mimetic BV6 Induces Cell Death in Monocytes and Maturation of Monocyte-Derived Dendritic Cells. *PLoS ONE* 2011; 6: e21556.
22. Yasho industries: Food Antioxidants. Dostopno na svetovnem spletu: [yashoindustries.com/uploads/1/2/7/0/.../yasho\\_food\\_anti-oxidant\\_brochure.pdf/12.6.2016](http://yashoindustries.com/uploads/1/2/7/0/.../yasho_food_anti-oxidant_brochure.pdf/12.6.2016)
23. Yu R, Mandlekar S, Kong A. N: Molecular mechanisms of butylated hydroxyanisole-induced toxicity: induction of apoptosis through direct release of cytochrome c. *Mol Pharmacol.* 2000; 58(2):431-437.
24. Labrador V, Fernández Freire P, Pérez Martín J.M , Hazen M. J: Cytotoxicity of butylated hydroxyanisole in Vero cells. *Cell Biol Toxicol.* 2007; 23(3):189-99.
25. Hannes S, Abhari B. A, Fulda S: Smac mimetic triggers necroptosis in pancreatic carcinoma cells when caspase activation is blocked. *Cancer Lett.* 2016; 380(1):31-38.
26. Kroemer G et al.:Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation* 2009; 16: 3–11.
27. Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P: Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2014; 15: 135–147.
28. Alt, F. W: *Advances In Immunology*, volume 88. Dostopno na svetovnem spletu: [https://books.google.si/books?id=DV6fcnf717sC&printsec=frontcover&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false/15.6.2016](https://books.google.si/books?id=DV6fcnf717sC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false/15.6.2016)

29. Aggarwal B. B, Gupta C. S, Hye Kim J: Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*. 2012; 119(3):651-665.
30. Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P: More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 1999; 18: 7719-7730.
31. Chen X, Andresen T. B, Hill M, Zhang J, Booth F, Zhang C: Role of Reactive Oxygen Species in Tumor Necrosis Factor-alpha Induced Endothelial Dysfunction. *Curr Hypertens Rev.* 2008; 4(4): 245–255.
32. Sakon S, Xue X, Takekawa M, Sasazuki T, Okazaki T, Kojima Y, Piao JH, Yagita H, Okumura K, Doi T, Nakano H: NF-kappaB inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *EMBO J.* 2003; 22(15): 3898-909.
33. Vercammen D, Beyaert R, Denecker G, Goossens V, Van Loo G, Declercq W, Grooten J, Fiers W, Vandenabeele P: Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J Exp Med.* 1998; 187(9): 1477-85.
34. Kerr J. F, Wyllie A. H, Currie A. R: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; 26(4): 239-57.
35. Guicciardi M. E, Mott J. L, Bronk S. F, Kurita S, Fingas C. D, Gores G. J: Cellular inhibitor of apoptosis 1 (cIAP-1) degradation by caspase 8 during TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis. *Exp Cell Res.* 2011; 317(1):107-16.
36. Kroemer G et al.: Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2005. *Cell Death Differ.* 2005;12 Suppl 2:1463-7.
37. Priporočeno število dnevno zaužitih enot živil. Dostopno na svetovnem spletu: <http://www.zdravstvena.info/vsznj/priporoceno-stevilo-dnevno-zauzutih-enot-zivil-prehrana-in-dietetika/> /16.7.2016.
38. Bertrand M. J, Lippens S, Staes A, Gilbert B, Roelandt R, De Medts J, Gevaert K, Declercq W, Vandenabeele P: cIAP1/2 Are Direct E3 Ligases Conjugating Diverse Types of Ubiquitin Chains to Receptor Interacting Proteins Kinases 1 to 4 (RIP1–4). *PLoS One.* 2011;6(9):e22356.
39. Li W, Li B, Giacalone N. J, Torossian A, Sun Y, Niu K, Lin-Tsai O, Lu B: BV6, an IAP Antagonist, Activates Apoptosis and Enhances Radiosensitization of Non-small Cell Lung Carcinoma In Vitro. *J Thorac Oncol.* 2011; 6(11): 1801-9.
40. Cabal-Hierro L, Lazo P. S: Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal.* 2012; 24(6): 1297-305.

41. dostopno na svetovnem spletu: [physics.cancer.gov/docs/bioresource/.../NCI-PBCF-HTB38\\_HT-29\\_SOP-508.pdf](https://physics.cancer.gov/docs/bioresource/.../NCI-PBCF-HTB38_HT-29_SOP-508.pdf)/ 31.8.2016.