

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREA KROŠNJA

**UGOTAVLJANJE CITOTOKSIČNOSTI RDEČEGA  
PIGMENTA BAKTERIJE *Vibrio* sp.**

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREA KROŠNJAK

**UGOTAVLJANJE CITOTOKSIČNOSTI RDEČEGA  
PIGMENTA BAKTERIJE *Vibrio* sp.**

**CITOTOXICITY OF RED PIGMENT FROM  
BACTERIUM *Vibrio* sp.**

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo sem opravljala na Biotehniški fakulteti, na Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo, pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa in somentorstvom dr. Irene Oven.

### **Zahvala**

Na začetku bi se zahvalila prof. dr. Janku Kosu za strokoven pregled diplomske naloge. Zahvala za pomoč in nasvete pri izvedbi in pisanju gre somentorici dr. Ireni Oven in prof. dr. Mojci Narat. Posebno bi se rada zahvalila prijateljici Daliborki Dušanić za vso pomoč, razumevanje ter usmerjanje pri izdelavi diplomske naloge.

Hvala družini, ki mi je omogočila študij in mi vedno stala ob strani, ko sem potrebovala tolažilno besedo.

Hvala Marinu, da je vedno verjel v mene in me spravljal v dobro voljo v najtežjih trenutkih.

Na koncu bi se zahvalila vsem prijateljem, posebno ekipi iz Kersnikove 8 za nepozabna študijska leta.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa in somentorstvom dr. Irene Oven.

Andrea Krošnjak

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Slavko Pečar

Član diplomske komisije: asist. dr. Miha Milek

# Vsebina

|   |             |
|---|-------------|
| <b>Vsebina .....</b>  | <b>i</b>    |
| <b>Seznam okrajšav.....</b>                                     | <b>iii</b>  |
| <b>Povzetek.....</b>  | <b>vi</b>   |
| <b>Abstract .....</b>   | <b>vii</b>  |
| <b>Kazalo preglednic .....</b>                                  | <b>viii</b> |
| <b>Kazalo slik .....</b>  | <b>ix</b>   |
| <b>1 UVOD .....</b>   | <b>1</b>    |
| <b>1.1 BAKTERIJA VIBRIO SP. IN NJEN RDEČI PIGMENT.....</b>      | <b>2</b>    |
| <b>1.2 PRODIGININI IN PRODIGIOZIN .....</b>                     | <b>3</b>    |
| 1.2.1 Biosinteza prodigininov .....                             | 4           |
| 1.2.2 Kemijska struktura prodigininov.....                      | 4           |
| 1.1.3 Farmakološke lastnosti.....                               | 6           |
| 1.2.2.1 Citotoksičnost prodigininov .....                       | 6           |
| <b>1.3 APOPTOZA.....</b>  | <b>9</b>    |
| 1.3.1 Kaspaze .....   | 9           |
| 1.3.2 Potek in uravnavanje apoptoze .....                       | 11          |
| 1.3.2.1 Notranja (intrinzična) pot .....                        | 11          |
| 1.3.2.2 Zunanja (ekstrinzična) pot.....                         | 12          |
| 1.3.3 Prodiginini in apoptoza .....                             | 14          |
| 1.3.3.1 Mehанизem delovanja .....                               | 15          |
| 1.3.3.1.1 Prodiginini kot modulatorji znotrajceličnega pH ..... | 15          |
| 1.3.3.1.2 Prodiginini cepijo molekulo DNA .....                 | 16          |
| 1.3.3.1.3 Prodiginini kot regulatorji signalnih poti .....      | 17          |
| 1.3.3.1.4 Prodiginini kot inhibitorji celičnega cikla .....     | 17          |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>2 NAMEN DELA .....</b>  | <b>18</b> |
| <b>3 MATERIALI IN METODE.....</b>  | <b>19</b> |
| <b>3.1 REAGENTI IN LABORATORIJSKA OPREMA.....</b>                              | <b>19</b> |
| 3.1.1 Reagenti.....  | 19        |
| 3.1.2 Laboratorijska oprema.....   | 19        |
| 3.1.3 Celična linija NS0 .....   | 20        |
| <b>3.2 METODE .....</b>  | <b>21</b> |
| 3.2.1 Vzdrževanje celic .....  | 21        |
| 3.2.1.1 Odmrzovanje celic.....   | 21        |
| 3.2.2 Priprava vzorčnih raztopin .....   | 22        |
| 3.2.3 Določanje citotoksičnosti .....  | 23        |
| 3.2.3.1 Štetje celic s tripan modrim.....                                      | 23        |
| 3.2.3.2 Test XTT .....   | 24        |
| 3.2.4 Merjenje aktivnosti kaspaze–3 .....                                      | 26        |
| <b>4 REZULTATI .....</b>   | <b>28</b> |
| <b>4.1 DOLOČANJE CITOTOKSIČNOSTI.....</b>                                      | <b>28</b> |
| 4.1.1 Število živih celic, določeno s štetjem s tripansko modrim barvilom..... | 28        |
| 4.1.2 Test XTT .....   | 32        |
| <b>4.2 MERJENJE AKTIVNOSTI KASPAZE-3.....</b>                                  | <b>37</b> |
| <b>5 RAZPRAVA .....</b>  | <b>40</b> |
| <b>5.1 CITOTOKSIČNOST RDEČEGA PIGMENTA BAKTERIJE Vibrio sp. .....</b>          | <b>40</b> |
| <b>5.2 MERJENJE AKTIVNOSTI KASPAZE-3.....</b>                                  | <b>42</b> |
| <b>6 SKLEPI.....</b>   | <b>44</b> |
| <b>7 LITERATURA .....</b>  | <b>45</b> |
| <b>Priloga.....</b>  | <b>50</b> |

## **Seznam okrajšav**

ABC: ATP- vezavna kaseta (ang. ATP binding cassette)

AIDS: sindrom pridobljene imunske pomanjkljivosti

AIF: induksijski faktor apoptoze

APAF-1: ang. apoptotic protease activating factor-1

ATP: adenozin-5-trifosfat

BCL-2: ang: B-cell lymphoma 2

BCRP: ang: breast cancer resistant protein

CARD: dopolnilna domena ( ang.caspase activation and recruitment domain)

CD95: Fas receptor

DD: domena smrti (ang. death domain)

DED: efektorska domena smrti (ang. death effector domain)

DEVD: zaporedje asparaginska kislina-glutaminska kislina-valin-asparaginska kislina

DMEM : Dulbeccovo modificirano gojišče (ang. Dulbecco's modified Eagle's medium)

DMSO: dimetilsulfoksid

DNA: deoksiribonukleinska kislina

DR-4: receptor smrti 4 (ang: death receptor 4)

DR-5: receptor smrti 5 (ang: death receptor 5)

DTT: ditiotreitol

ERK: ekstracelularno regulirana kinaza

FADD: ang. Fas-associating protein with death domain

FBS: fetalni goveji serum (ang. fetal bovine serume)

GLC4/ADR: humana celična linija drobnoceličnega pljučnega raka

GSK-3 $\beta$ : glikogen sintaza kinaza-3 $\beta$

ICAD: ang. caspase activated DNase inhibitor

ICE: interlevkin konvertirajoči encim

JNK: c-jun N terminalna kinaza

LC50: 50 % letalna koncentracija

MAP: 2-metil-3-N-amil-pirol

MAPK: proteinska kinaza aktivirana z mitogeni

MBC: 4-metoksi-2,2'-bipirol-5-karbaldehid

MCF-7: humana celična linija raka na dojki

MDR: odpornost proti več snovem (ang. multidrug resistance)

MRP1: multidrug resistance protein 1

MXR: mitoksantron

NAG-1: nesteroidni protiinflamatorni gen-1

NS0: mišja mielomska celična linija

PARP: ang. poly(ADPribose)polymerase

PBS: fosfatni pufer s soljo (ang: phosphate buffered saline)

P-gp: P-glikoprotein

pH<sub>e</sub>: zunajcelični pH

pH<sub>i</sub>: znotrajcelični pH

PMS: fenazin metosulfat

RPMI: gojišče Roswell Park Memorial Institute

SAR: odnos med strukturo in delovanjem (ang. structure-activity relationship)

Smac/ DIABLO: ang. second mitochondrial activator of caspases

TNFR-1: receptor za dejavnik tumorske nekroze tipa 1

TRADD: ang. TNF receptor associated protein with death domain

TRAIL: apoptozo inducirajoči ligand, soroden TNF (ang: TNF related apoptosis inducing ligand)

V-ATPaza: vakuolarna H<sup>+</sup>-ATPaza

XTT: natrijev 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolijev-5-karboksanilid

Z-VAD.fmk: benziloksikarbonil-valil-alanil-aspartil-fluorometilketon

## Povzetek

Rdeči pigment bakterije *Vibrio* sp. sodi v skupino prodigiozinom podobnih spojin. Prodiginini, med katere uvrščamo tudi prodigiozin, so skupina bioaktivnih rdečih pigmentov, ki jih proizvajajo določene gram (+) in gram (-) bakterije. Bakterijski prodiginini imajo širok spekter delovanja in so znani po svojih protibakterijskih, protiglivnih, protiprotzojskih, protimalarijskih, protirakavih, imunosupresivnih in citotoksičnih učinkih. V diplomski nalogi smo se osredotočili na ugotavljanje citotoksičnega učinka rdečega pigmenta bakterije *Vibrio* sp. Želeli smo ugotoviti, ali rdeči pigment vpliva na viabilnost celic NS0. Preživetje celic, ki smo jih za določen čas izpostavili različnim koncentracijam pigmenta, smo ugotavljali s pomočjo barvila tripan modro in s testom XTT, ki omogoča določitev živih celic na osnovi njihove presnovne aktivnosti. Zanimalo nas je tudi, ali je mehanizem citotoksičnega učinka pigmenta sprožanje programirane celične smrti oz. apoptoze. Ugotavljali smo stopnjo aktivnosti kaspaze-3, ene izmed glavnih izvrševalnih kspaz apoptotičnega procesa. Rezultati citotoksičnih testov so pokazali, da rdeči pigment bakterije *Vibrio* sp. povzroča znižanje števila živih celic in da je takšen učinek odvisen od koncentracije pigmenta in časa inkubacije. Po 4-urni inkubaciji pri najvišji koncentraciji pigmenta nismo zasledili presnovne aktivnosti celic, iz česar lahko sklepamo, da je ta koncentracija toksična za vse celice. Po 24 in 48 urni izpostavljenosti pigmentu je prišlo do nadaljnjega upada viabilnosti celic. Z rezultati apoptotičnega testa smo dokazali, da je mehanizem citotoksičnega delovanja našega pigmenta sprožanje apoptoze po poti aktivacije kaspaze-3.

## **Abstract**

Red pigment isolated from bacterium *Vibrio* sp. belongs to a group of prodigiosin-like compounds. Prodiginines, including prodigiosin, are a group of bioactive red pigments produced by some gram (+) and gram (-) bacteria. Bacterial prodiginines have a broad spectrum of activity and are known for their antibacterial, antifungal, antiprotozoal, antimalarial, anticancer, immunosuppressive and cytotoxic effects. In this thesis we focused on the determination of biological activity of a red pigment from bacterium *Vibrio* sp. We wanted to determine whether red pigment affects the viability of NS0 cell line. Cells were exposed to different concentrations of pigment and cell viability was assessed after different time periods using trypan blue dye and XTT assay. XTT assay allows us to determine viable cells based on their metabolic activity. We investigated whether the cytotoxic action of red pigment involves induction of programmed cell death or apoptosis. We determined the activity of caspase-3, one of the most important executive caspases involved in apoptotic process. Results of cytotoxicity test showed that the red pigment from bacterium *Vibrio* sp. causes reduction in the number of the living cells. This effect is time and concentration dependent. At the highest concentration of pigment after 4 hours of incubation, we did not observe any metabolic activity. Therefore we can conclude that this concentration is toxic for all cells. Further decline in cell viability was detected after 24 and 48 hour exposure to the pigment. The results obtained from apoptotic assay demonstrate that mechanism of red pigment citotoxicity is the induction of apoptosis which involves the activation od caspase-3 pathway.

## Kazalo preglednic

|  |    |
|--|----|
| <b>Preglednica I:</b> Citotoksični učinki prodigininov .....                       | 7  |
| <b>Preglednica II:</b> Seznam uporabljenih reagentov .....                         | 19 |
| <b>Preglednica III:</b> Seznam uporabljene laboratorijske opreme.....              | 19 |
| <b>Preglednica IV:</b> Redčitve in končne koncentracije etanola ter pigmenta. .... | 22 |

## Kazalo slik

|  |    |
|--|----|
| <b>Slika 1:</b> Kolonije bakterije <i>Serratia marcescens</i> (12) (levo) in <i>Vibrio sp.</i> DSM14379 (8) (desno) .....  | 3  |
| <b>Slika 2:</b> Strukturni tipi prodigininov (9). ....   | 4  |
| <b>Slika 3:</b> Tetrapeptidno zaporedje, ki ga prepozna jo kaspaze.....  | 10 |
| <b>Slika 4:</b> Zunanja in notranja pot apoptoze (39).....   | 13 |
| <b>Slika 5:</b> Celična linija NS0.....  | 20 |
| <b>Slika 6:</b> Shematski prikaz redukcije substrata XTT.....  | 25 |
| <b>Slika 7:</b> Koncentracija živih celic NS0 v odvisnosti od časa izpostavljenosti etanolu. ....  | 28 |
| <b>Slika 8 (A, B, C):</b> Koncentracija živih NS0, določena s štetjem celic po barvanju z tripan modrim barvilkom, po 4-urni (A), 24-urni (B) in 48-urni (C) izpostavljenosti pigmentu v različnih končnih koncentracijah..... | 30 |
| <b>Slika 9:</b> Umeritvena premica za določitev koncentracije živih celic (št. celic/ml) v vzorcih. ....   | 32 |
| <b>Slika 10:</b> Koncentracija živih celic NS0 v odvisnosti od časa izpostavljenosti etanolu .....   | 33 |
| <b>Slika 11 (A, B, C):</b> Koncentracija živih celic NS0, določena s testom XTT, po 4-urni (A), 24-urni (B) in 48-urni (C) izpostavljenosti pigmentu v različnih končnih koncentracijah..                                      | 34 |
| <b>Slika 12:</b> Koncentracija živih celic glede na čas inkubacije in glede na koncentracijo pigmenta. ....  | 36 |
| <b>Slika 13:</b> Umeritvena premica za določitev koncentracije pNA .....   | 37 |
| <b>Slika 14:</b> Aktivnost kapaze-3 po 24-urni izpostavljenosti pigmentu .....   | 38 |
| <b>Slika 15:</b> Celice NS0 po 24-urni izpostaviti etanolu in različnim koncentracijam pigmenta .....  | 39 |

# 1 UVOD

Narava je dragocen vir različnih zdravilnih učinkovin. Od odkritja in uspeha penicilina, mikroorganizme intenzivno raziskujejo kot vir strukturno različnih bioaktivnih snovi. Skoraj 60 % vseh protirakovih učinkovin je pridobljenih iz naravnih virov, kot so rastline (npr. vinkristin, irinotekan, kamptotecin) in mikroorganizmi (npr. doksorubicin, daktinomicin, mitomicin in bleomicin). Zaradi pojava odpornosti na antibiotike in nizke selektivne toksičnosti številnih kemoterapevtikov, obstaja potreba po odkritju novih učinkovin z manj izraženimi neželenimi učinki (1).

Od začetka šesdesetih let prejšnjega stoletja raziskovalci obravnavajo morja kot nov in predvsem neraziskan vir potencialno uporabnih spojin. Medtem ko so zgodnje študije morskih organizmov temeljile predvsem na raziskovanju sekundarnega metabolizma, je večina današnjih študij osredotočenih na odkrivanje biološke aktivnosti sekundarnih metabolitov (2).

V diplomski nalogi smo preučevali biološko aktivnost sekundarnega metabolita morske bakterije *Vibrio* sp.

## **1.1 BAKTERIJA VIBRIO SP. IN NJEN RDEČI PIGMENT**

Bakterijo *Vibrio* sp. DSM14379 so izolirali iz brakičnih voda Tržaškega zaliva (3). Je po Gramu negativna, anaerobna bakterija z obliko ukrivljene palčke, ki sodi v družino *Vibrionaceae*, razred  $\gamma$  *Proteobacteria*, deblo *Proteobacteria* (4). Gre za halotoleranten mikroorganizem, ki za rast nujno potrebuje NaCl. Optimalna koncentracija soli je 1,7 % (w/v), tolerira pa do 17 % (w/v) NaCl v gojišču. Fiziologija te bakterije je še slabo poznana. Raziskave vpliva različnih koncentracij soli na bakterijo *Vibrio* sp. so pokazale spremembe na fiziološkem in biokemijskem nivoju. Osmotski stres vpliva na bakterijsko rast, sestavo, aktivnost in strukturiranost membrane ter metabolno aktivnost. Pod pogoji osmotskega stresa prihaja do sprememb v sestavi acilnih verig in polarnih glavnih lipidov. Prav tako se več energije porabi za vzdrževalne procese v celici, kot za samo rast. Poveča se hitrost respiracije, dehidrogenazna aktivnost, glikolitična aktivnost in koncentracija ATP v celici, zmanjša pa se njena reduksijska sposobnost. Odič in sod. so ugotovili, da z naraščajočo slanostjo pada vsebnost makroelementov C, N, P in S v celici, spreminja se pa tudi kopičenje mikroelementov kot so Na, K, Ca, Mg, Zn in Fe (5).

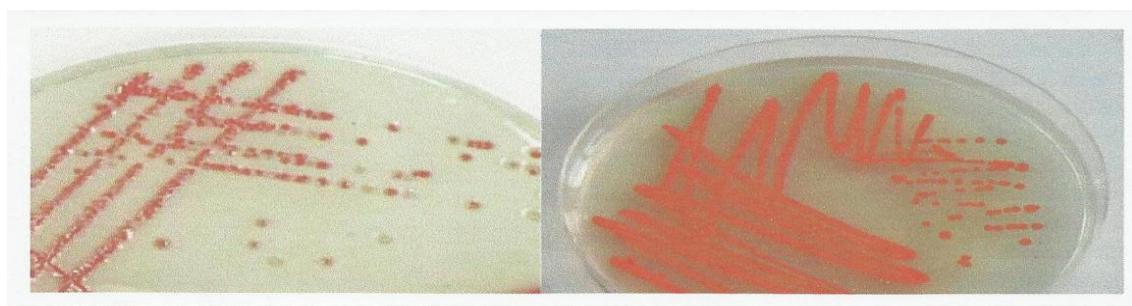
Poznavanje vpliva okoljskih dejavnikov, kot sta temperatura in slanost, na fiziološke in biokemijske procese v bakterijski celici, je predvsem zanimivo zaradi optimizacije procesa izolacije rdečega pigmenta bakterije *Vibrio* sp.

Rdeči pigment bakterije *Vibrio* sp. so glede na obliko UV/VIS absorpcijskega spektra uvrstili v skupino prodigiozinom podobnih molekul (6). Prodiginini, med katere uvrščamo tudi prodigiozin, so družina bioaktivnih rdečih pigmentov, ki jih proizvajajo določene gram (+) in gram (-) bakterije, kot so aktinomicete, *Serratia* sp., *Haella* sp., *Vibrio* sp. in *Pseudoalteromonas* sp. Zanimivi so zaradi svojih protibakterijskih, protiglivnih, protiprotazojskih, protimalarijskih, protitumorskih in imunosupresivnih učinkov (7). Rdeči pigment bakterije *Vibrio* sp. je, podobno kot ostali prodiginini, sekundarni metabolit, katerega sinteza je najbolj izražena v stacionarni fazi rasti. Na produkcijo pigmenta močno vplivajo različni okoljski dejavniki kot so koncentracija NaCl, temperatura in različni viri ogljika. Največja produkcija pigmenta je opažena pri 28° C, 3 % (w/v) NaCl v gojišču PKS in pri koncentraciji glukoze 5 g/L v gojišču M9 (8).

## 1.2 PRODIGININI IN PRODIGIOZIN

Bakterijski prodiginini so skupina tripirolnih spojin s karakteristično piroldipirolmetensko strukturo, ki jo imenujemo prodigiozen. Prodigiozin, glavni pigment bakterije *Serratia marcescens*, je bil prvi prodiginin, ki so mu določili strukturo leta 1960 z delno in popolno kemijsko sintezo. Ime prodigiozin izhaja iz lat. besede prodigious in pomeni „nekaj čudovitega“. V literaturi ga pogosto najdemo kot splošen izraz za skupino podobnih spojin (9). Pridobivanje prodigiozina s pomočjo te bakterije ima dolgo in zanimivo zgodovino. Bakterijo *S. marcescens* so uporabljali kot označevalec pri modeliranju razširjanja bakterij pri biološkem vojskovjanju in za pridobivanje prodigiozina, rdečega pigmenta, ki je služil kot naravno barvilo pred razvojem sintezne kemije barvil. Znana je tudi uporaba Coleyevega toksina, mešanice steriliziranih kultur *Streptococcus sp.* in *S. marcescens*, za zdravljenje kancerogenih tumorjev. Kolonije bakterije *S. Marcescens* imajo zaradi produkcije prodigiozina značilno rdečo barvo in spominjajo na barvo krvi. Mogoče eno od najbolj zanimivih zgodb, ki se je zgodila leta 1263 in je vezana na pojav bakterije, ki proizvaja prodigiozin, *S. marcescens*, danes poznamo pod imenom „Čudež v Bolseni“. Duhovnik je med mašo opazil, kako kri kaplja s hostije in je o dogodku obvestil papeža Urbana IV, ki je v spomin na ta dogodek ustanovil praznik Sv. Rešnjega telesa in krvi (7, 10).

Fiziološka vloga prodigiozina in prodigiozinom podobnih molekul, ki so tipični sekundarni metaboliti, v bakterijski celici še ni jasno definirana (11). Tudi natančna lokacija prodigiozina v celici še ni znana, saj so ga odkrili znotraj in zunajcelično. Na začetku je kazalo, da je prodigiozin kot močno hidrofobna molekula povezan z celičnim ovojem. Nadaljnje študije pa so pokazale, da je prodigiozin prisoten v notranji celični membrani, v kompleksu s 100 kDa velikim proteinom (10).



Slika 1: Kolonije bakterije *Serratia marcescens* (12) (levo) in *Vibrio sp. DSM14379* (8) (desno).

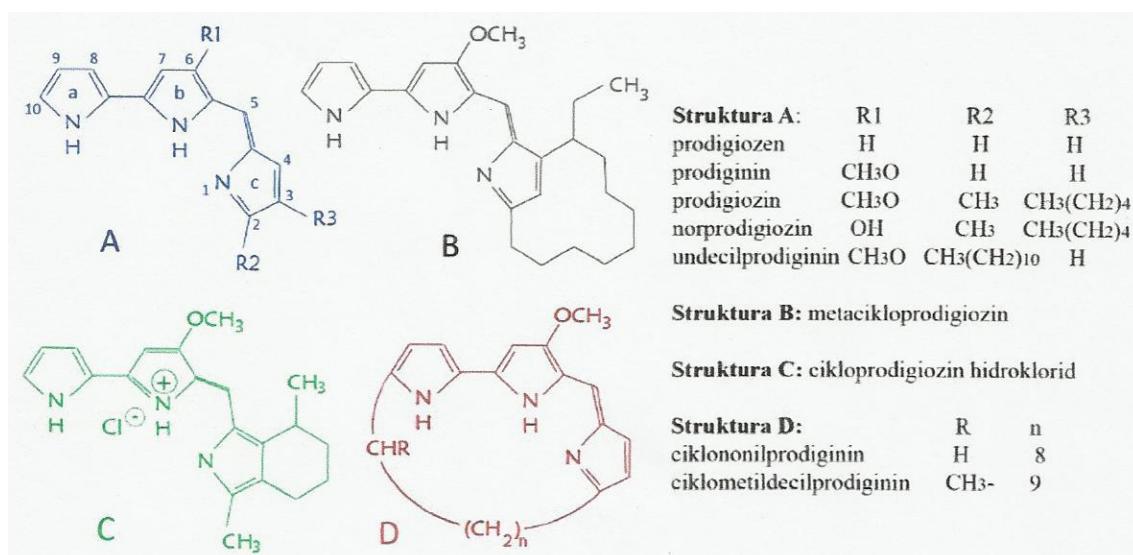
### 1.2.1 Biosinteza prodigininov

Biosinteza prodigininov poteka po razcepljeni poti, ki se zaključi z encimsko kondenzacijo dveh prekurzorjev, 2-metil-3-N-amil-pirola (MAP) in 4-metoksi-2,2'-bipirol-5-karbaldehida (MBC) (10).

Sinteza bipirolne enote (MBC) je enaka za celo skupino prodigininskih pigmentov. Prekurzorji so prolin, serin, metionin in malonil Co-A. Sinteza monopirolnega obroča se nekoliko razlikuje od prodiginina do prodiginina. Tako so za sintezo MAP obroča pri prodigiozinu potrebni piruvat, 2-octenal in ena od aminokislin, za sintezo 2-undecipirolnega obroča pri undecilprodigiozinu pa malonil Co-A, acetil Co-A in glicin (7, 9).

### 1.2.2 Kemijska struktura prodigininov

Obstajajo štirje osnovni strukturni razredi prodigininov. Prvi razred obsega prodiginine z ravnimi alkilnimi substituenti. Glavna predstavnika sta prodigoizin in undecilprodigiozin. Ostali razredi vključujejo ciklične oblike prodigininov (slika 2, A B,C,D) (10).



Slika 2: Strukturni tipi prodigininov (9).

Primerjava *in vitro* citotoksičnih učinkov prodigozina (2-metil-3-pentil-6-metoksiprodigiosena), prodigosena in 2-metil-3-pentilprodigiosena je pokazala, da izreden citotoksični potencial prodigozina lahko pripisemo metoksi substituentu na mestu 6 B-pirolnega obroča (11).

D'Allesio in sodelavci so ustanovili projekt farmacevtske kemije s ciljem odkriti sintezne derivate prodigozina, ki naj bi imeli povečano imunosupresivno delovanje in boljši farmakotoksikološki profil v primerjavi z naravnimi prodigozini. V svojih raziskavah odnosa med strukturo in delovanjem (structure-activity relationship, SAR) so ugotovili, da sta za biološko aktivnost pomembna metoksi skupina na mestu 6 B-pirolnega obroča in heterociklični A obroč, ki vsebuje dušik ter tvori s preostalim delom molekule konjugiran  $\Pi$  elektronski sistem. Odstranitev alkoxi skupine, in posledično znižana bazičnost, povzroči močen upad aktivnosti. Zamenjava metoksi skupine z večjim alkoxi substituentom reducira aktivnost in citotoksičnost, toda poveča selektivnost (13). Na podlagi teh raziskav sta Jolicœur in Lubell sintetizirala amino analoge prodigozina, ki namesto alkoxi substituenta vsebujejo elektron donorsko morfolinsko skupino. Tovrstna zamenjava naj bi povečala terapevtski potencial prodigozinov (14). Pokazalo se, da je pirolni obroč A pomemben tudi za nukleazno aktivnost bakra in citotoksični potencial prodigozinov (11).

Intenzivna pigmentacija teh spojin je posledica konjugiranega sistema sedmih dvojnih vezi, ki ga ustvarja značilna tripirolna struktura v kateri sta dva obroča direktno povezana med seboj, tretji je pa pripet preko metenskega mostička (9).

### **1.1.3 Farmakološke lastnosti**

Bakterijski prodiginini imajo širok spekter delovanja in so znani po svojih protibakterijskih, protiglivnih, protiprotazojskih, protimalarijskih, protirakavih, imunosupresivnih in citotoksičnih učinkih (7, 15).

Prodigiozin in prodigiozinom podobne spojine so v preteklosti raziskovali kot potencialne protibakterijske učinkovine. Ugotovili so, da zaradi nizkega terapevtskega indeksa in visoke sistemske toksičnosti, niso primerni za nadaljnji razvoj v medicinske namene (12).

Bolj obetavna je njihova protimalarijska aktivnost, ki so je preučevali na parazitu *Plasmodium falciparum*, ki okuži ljudi. Izolat bakterije *Streptomyces spectabilis*, metacikloprodigiozin, je že pri koncentraciji  $0,005 \pm 0,001$  ug/ml dosegal inhibicijo rasti parazita za 50 % (16, 17).

V preteklem desetletju so številne študije pokazale, da določeni prodiginini in njihovi analogi izkazujejo apoptoške in imunosupresivne učinke pri koncentracijah, ki niso toksične (18). Farmacevtska industrija je že zaznala terapevtski potencial teh spojin za pripravo novih imunosupresivnih in protirakavih zdravil. Uporaba prodigiozina kot učinkovine za zdravljenje raka trebušne slinavke je trenutno v predklinični fazi testiranja. Drugi primer je sintezi indolil-dipirometenski derivat prodiginina, Obatoclax (GX15-070), ki deluje kot inhibitor Bcl-2 (ang. B-cell lymphoma 2) in je trenutno v I/II fazi kliničnega preizkušanja za zdravljenje multiplih, solidnih tumorjev in hematoloških malignosti (7).

#### **1.2.2.1 Citotoksičnost prodigininov**

Citotoksični učinki tripirolnih rdečih pigmentov prodigininov so znani že nekaj časa. Fullan in sod. so že leta 1977 preučevali antitumorsko aktivnost prodigiozinov na mišjih modelih. Od tedaj so številne *in vitro* in *in vivo* študije pokazale, da so prodigiozin in njemu podobne spojine morebitne nove protitumorske učinkovine (15).

Kljub temu, da natančen mehanizem citotoksičnega delovanja teh spojin še ni popolnoma razjasnjen, naj bi bilo protitumorsko delovanje posledica sposobnosti indukcije apoptoze v številnih tumorskih celicah (19, 20).

**Preglednica I:** Citotoksični učinki prodigininov.

| Ref. <sup>1</sup> | celična linija  | tip celic                              | vir pigmenta                           | konc. pigmenta                  | čas inkubacije | metoda            | učinek                                       |
|-------------------|---|--|--|---------------------------------|----------------|-------------------|--|
| 21                | hematopoetska rakava  | Jurkat, NS0, HL-60, Ramos              | <i>Serratia marcescens</i> 2170        | 1-10 µg/ml                      | 4 h            | MTT               | upad celične viabilnosti                     |
| 21                | nemaligna   | NIH-3T3, MDCK                          | <i>Serratia marcescens</i> 2170        | 1-10 µg/ml                      | 4 h            | MTT               | ni opažen                                    |
| 22                | humane rakave celice raka debelega črevesja                     | DLD-1, SW-620                          | <i>Serratia marcescens</i> 2170        | 400-1600 nM                     | 8 h            | MTT               | upad celične viabilnosti                     |
| 22                | nemaligna   | NRK-52E, Swiss-3T3                     | <i>Serratia marcescens</i> 2170        | 400-1600 nM                     | 8 h            | MTT               | ni opažen                                    |
| 23                | primarna celična linija kronične B-celične limfocitne levkemije | B in T celice                          | <i>Serratia marcescens</i> 2170        | 40-190 nM                       | 48 h           | MTT               | upad celične viabilnosti                     |
| 24                | humana nevroblastomska  | SH-SY5Y, LAN-1, IMR-32, SK-N-AS        | ni znan                                | 30 µM in manj                   | 24 h           | MTT, štetje celic | upad celične viabilnosti (razen pri SK-N-AS) |
| 25                | humane celične linije raka na dojki                             | KPL-1, T-47D, MCF-7, MKL-F, MDA-MB-231 | <i>Pseudoalteromonas denitrificans</i> | IC <sub>50</sub> = 0,46-0,62 µM | 72 h           | MTT               | inhibicija celične rasti                     |
| 25                | humane epitelijske celice dojke                                 | HBL-100                                | <i>Pseudoalteromonas denitrificans</i> | IC <sub>50</sub> = 1,75 µM      | 72 h           | MTT               | rahla inhibicija celične rasti               |
| 25                | humana fibroblastna celična linija                              | WI-38-40                               | <i>Pseudoalteromonas denitrificans</i> | IC <sub>50</sub> = 2,26 µM      | 72 h           | MTT               | rahla inhibicija celične rasti               |
| 26                | tumorske celice mišega fibrosarkoma                             | S-180                                  | <i>Serratia marcescens</i> ost3        | IC <sub>50</sub> = 0,211 µM     | 48 h           | MTT               | zmanjšanje celične rasti                     |
| 26                | celična linija T-limfoma  | EL-4                                   | <i>Serratia marcescens</i> ost3        | IC <sub>50</sub> = 0,254 µM     | 48 h           | MTT               | zmanjšanje celične rasti                     |
| 27                | humana adenokarcinomska pljučna celična linija                  | A549                                   | <i>Serratia marcescens</i>             | 1-10 mg/L                       | 24 h           | MTT               | upad celične viabilnosti                     |
| 27                | zarodne celice kostnega mozga                                   | BMSC                                   | <i>Serratia marcescens</i>             | 1-10 mg/L                       | 24 h           | MTT               | šibka inhibicija celične rasti               |

1 referenca: številka, pod katero je članek citiran v poglavju Literatura.

Na Nacionalnem inštitutu za rakava obolenja (Bethesda, ZDA) so testirali citotoksični potencial prodigiozina na približno šestdesetih tumorskih celičnih linijah. Ugotovili so, da je povprečna vrednost 50 % letalne koncentracije (LC50) za prodigiozin 2,1  $\mu\text{M}$  (19).

Odpornost na zdravila (ang. multidrug resistance; MDR) je pogosta težava pri zdravljenju rakavih obolenj in je povezana z delovanjem ABC (ATP- binding cassette) naddružine transportnih proteinov. P-glikoprotein (P-gp/MDR-1/ABCB1), MRP1 (MRP1/ABCC1) in mitoksantron odporni protein (MXR/BCRP/ABCG2) so ABC transportni proteini, udeleženi pri pojavu odpornosti na zdravila v tumorjih (28).

Pomembna prednost prodigininov kot protirakavih učinkovin je odpornost le-teh na delovanje proteinskih črpalk (7). Citotoksični učinek prodigiozina je dokazan na celicah raka dojke MCF-7, kjer so dokazali prekomerno izražanje mitoksantronskega odpornega proteina (28) ter na celicah drobnoceličnega pljučnega raka GLC4/ADR, kjer so dokazali prekomerno izražanje MRP1 (29).

## 1.3 APOPTOZA

Apotoza ali programirana celična smrt je normalen fiziološki proces, ki omogoča razvoj organizma, vzdrževanje homeostaze, uravnavanje imunskega odziva ter odstranjevanje celic.

Izraz «apoptoza» je prvič uporabil Kerr (1972) za opis morfoloških sprememb citoplazme in jedra odmirajočih celic. Odmirajoče celice prepoznamo po krčenju volumna, kondenzaciji kromatina, fragmentaciji jedra, oblikovanju citoplazemskih brstičev, izgubi adhezije ter tvorbi apoptotskih teles, ki jih fagocitirajo makrofagi.

Motnje in okvare v uravnavanju apoptoze vodijo v številna patološka stanja. Prekomerna apoptoza je povezana z nevrodegerenativnimi boleznimi, možgansko kapjo, sindromom pridobljene imunske pomanjkljivosti (AIDS) in ishemičnimi poškodbami tkiv. Odsotnost apoptoze oz. nezmožnost odstranitve celic lahko privede do nastanka raka, avtoimunskih bolezni ali do širjenja virusnih okužb (30, 31).

Osrednjo vlogo pri uravnavanju apoptoze imajo encimi, ki jih imenujemo kaspaze. Kaspaze, ki sodelujejo pri apoptizi, delimo v sprožitvene in izvršiteljske (32).

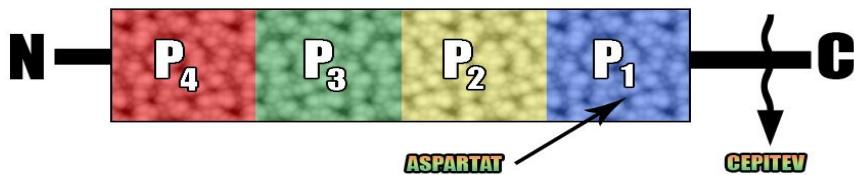
### 1.3.1 Kaspaze

Kaspaze so aspartat specifične cisteinske proteaze. Pri sesalcih je poznanih 14 kaspaz. Prva odkrita kaspaza, kaspaza-1, je interlevkin-1  $\beta$  konvertirajoči encim (ang. interlevkin-1  $\beta$  converting enzyme; ICE). Skupaj z kspazami 4,5,11,12,13 in 14 sodeluje pri vnetnem odzivu. Kaspaze 2,3,6,7,8,9 in 10 sodijo med apoptotske kaspaze, od tega so kaspaze 2,8,9 in 10 sprožitvene, kaspaze 3,6 in 7 pa izvršiteljske.

Kaspaze so v celicah prisotne kot neaktivni proencimi (zimogeni), ki so sestavljeni iz treh delov: N-terminalne prodomene, velike podenote s cisteinom v aktivnem mestu in C-terminalne male podenote. Po aktivaciji se oblikujejo tetramere iz dveh malih in dveh velikih podenot (31, 33).

Kaspaze cepijo peptidno verigo za aminokislino aspartat. Tetrapeptidno zaporedje označujemo s P1, P2, P3 in P4 (P- za ang. position) pri čemer je P4 na N- koncu in P1 na C- koncu peptidne verige. Na poziciji P1 je vedno aspartat, na P2 različne aminokisline, na

P3 najpogosteje glutamat, medtem ko aminokislina na P4 določa substratno specifičnost različnih kspaz.



Slika 3: Tetrapeptidno zaporedje, ki ga prepozna kspaze.

Sprožitvene kspaze imajo dolge prodomene, kot je domena smrti (DED) in dopolnilna domena (CARD). Vezava prokaspaznih domen na molekule, ki delujejo kot alosterični modulatorji, poveča proteolitično aktivnost prokaspaz. Sposobne so aktivirati druge kspaze, afiniteta do lastnega tetrapeptidnega zaporedja jim hkrati daje tudi sposobnost samoaktivacije.

Izvršiteljske kspaze pa imajo kratke prodomene, niso sposobne samoaktivacije in jih preko kaskade proteolitičnih reakcij aktivirajo sprožitvene kspaze. Razgrajujejo proteine jedra, ki omogočajo popravljanje DNA, inhibitorje deoksiribonukleaz, lamininske proteine, proteine citoskeleta in številne druge celične komponente, potrebne za normalno delovanje in preživetje celic (32, 34).

Kspaza 3 je osrednja izvršiteljska kspaza, ki skupaj z kspazami 6 in 7 razgrajuje številne celične proteine. Ena od najbolj raziskanih tarčnih beljakovin kspaze 3 je molekula ICAD (caspase activated DNase inhibitor). V celici je prisotna kot neaktivni kompleks z encimom CAD. Cepitev ICAD aktivira nukleazo, ki razgradi molekulo DNA na fragmente različnih velikosti (31).

Kspaza 3 cepi tudi jedrni encim PARP (poly(ADPribose)polymerase), ki omogoča obnovo molekule DNA in protein gelsolin, ki regulira aktin (35).

### **1.3.2 Potek in uravnavanje apoptoze**

Apoptoza je natančno regulirana, programirana celična smrt. Sprožijo jo lahko različni dogodki, kot so vezava specifičnih ligandov na celične receptorje ( t.i. receptorje smrti), odsotnost signalov za preživetje (hormoni, rastni faktorji, hrana) in poškodba DNA zaradi napak v popravljalnih mehanizmih, celičnega stresa, radiacije ter delovanja citotoksičnih spojin (30).

Obstajata dve glavni poti, ki vodita v apoptozo :

- notranja (intrinzična pot);
- zunanjega (ekstrinzična pot).

#### **1.3.2.1 Notranja (intrinzična) pot**

Notranja pot poteka preko mitohondrijev in je regulirana z strani družine proteinov Bcl-2, katerih značilnost je, da v svojem sekvenčnem zaporedju vsebujejo eno ali več konservativnih domen ( BH1, BH2, BH3, BH4).

Glede na funkcijo in strukturo člane družine proteinov Bcl-2 uvrščamo v tri kategorije:

- antiapoptotski proteini z vsemi štirimi domenami (proteini Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mc1-1 in A1);
- proapoptotski proteini z domenami BH1, BH2, BH3 (proteini Bax, Bak, Bok);
- proapoptotski proteini z BH3 domeno (Bid, Bad, Bim).

Občutljivost celic na apoptotske signale je odvisna od razmerja med proapoptotskimi in antiapoptotskimi člani družine proteinov Bcl-2.

Antiapoptotski proteini se nahajajo na zunanjih mitohondrijskih membranah, medtem ko so proapoptotski proteini prisotni tako na mitohondrijskih membranah kot tudi v citosolu. Zaradi apoptotskih signalov prihaja do konformacijskih sprememb, izpostavitve domen BH3 in prenosa proapoptotskih proteinov na mitohondrijsko membrano, kjer reagirajo z antiapoptotskimi proteini in povzročijo nastanek por ter sproščanje citokroma c,

indukcijskega faktorja apoptoze (AIF), proteina Smac/DIABLO in drugih proapoptočnih faktorjev (31, 36).

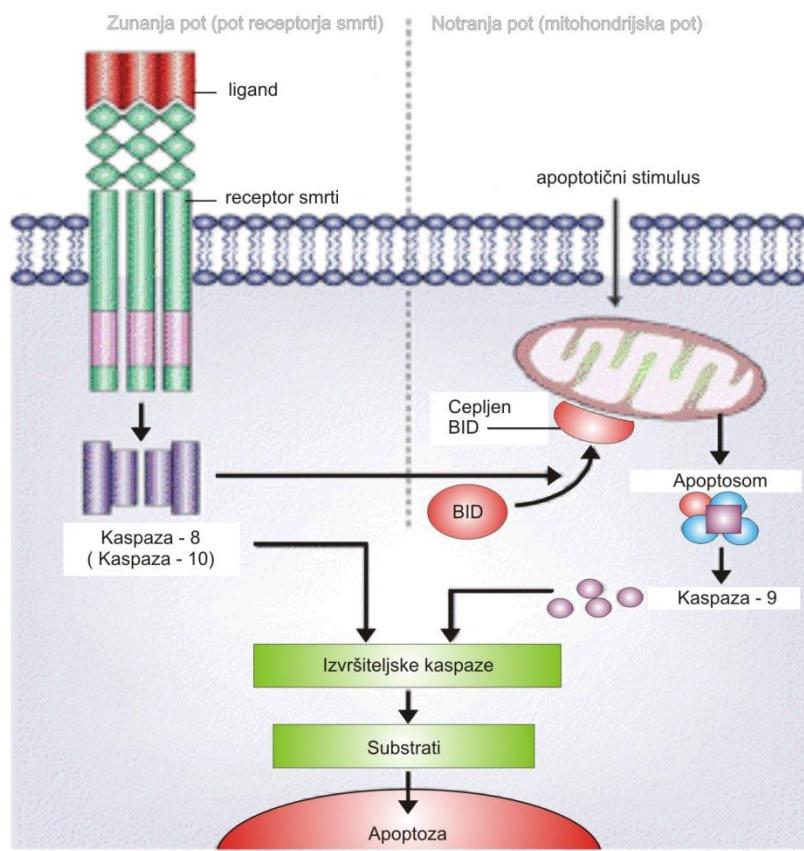
Vezava sproščenega citokroma c na Apaf-1 (ang. apoptosis protease activating factor- 1) v odvisnosti od ATP povzroči oligomerizacijo Apaf-1 in nastanek kompleksa med Apaf-1, citokromom c in prokaspazo 9. Ta kompleks, poimenovan apoptosom, aktivira prokaspazo 9, kaspaza 9 pa potem aktivira kaspazi 3 in 7 (37).

#### 1.3.2.2 Zunanja (ekstrinzična) pot

Zunanja (ekstrinzična) pot poteka preko t.i. receptortjev smrti med katere uvrščamo TNFR-1, CD95 (Fas) in TRAIL receptorje (DR-4 IN DR-5). Ta skupina receptorjev na zunani strani vsebuje s cisteinom bogata prepoznavna mesta za specifične ligande, medtem ko je na notranji, citoplazemski strani področje DD (ang. death domain), na katerega se veže adaptorska molekula.

Adaptorske molekule, kot so FADD (ang. Fas-associating protein with death domain) in TRADD (ang. TNF receptor associated protein with death domain) imajo dve vezavni mestni. Z domeno DD se vežejo na DD domeno receptorja, s domeno DED (ang. death effector domain) na istoimensko domeno prokaspaze 8. Aktivirana kaspaza 8 potem cepi izvršiteljske kaspaze.

V določenih celicah aktivacija receptorjev smrti ne zadostuje za sprožitev kaskadne reakcije, ampak je apoptočni signal potrebno ojačati z aktivacijo mitohondrijske poti. Obe poti povezuje protein BID, ki se po cepitvi s kaspazo 8 premakne do mitohondrija in skupaj z drugimi proapoptočnimi proteinimi inducira sprostitev citokroma c in ostalih proapoptočnih mitohondrijskih faktorjev (30, 32).



Slika 4: Zunanja in notranja pot apoptoze (39).

### **1.3.3 Prodiginini in apoptoza**

Prodiginini imajo citotoksičen učinek in sprožijo apoptozo v številnih tumorskih celičnih linijah.

Lagostera in sod. so ugotovili, da prodigiozin inducira apoptozo v celicah GLC4 (celice drobnoceličnega pljučnega raka) preko mitohondrijske poti, ki privede do sproščanja citokroma c in molekule AIF (29).

V celicah Jurkat (celice akutne humane T-celične levkemije) je prodigiozin sprožil aktivacijo kapaz 8, 9 in 3, kar dokazuje vpletenost obeh kaspazno odvisnih poti. Celice so bile tretirane z različnimi količinami prodigiozina, od 100 do 400 nM in inkubirane 3 ure. S pomočjo specifičnih protiteles so dokazali prisotnost kaspaz 8, 9, 3, citokroma c, molekule PARP in njenega cepljenega fragmenta (39).

Soto in sod. poročajo, da s prodigozinom inducirana apoptoza celic MCF-7 (celice raka dojke) poteka preko mitohondrijske poti. Po 16 urni inkubaciji z različnimi koncentracijami prodigiozina, v območju od 0,2 µM do 1 µM, so z uporabo specifičnih protiteles dokazali prisotnost apoptotičnih mediatorjev. Ugotovili so, da prodigiozin povzroča sproščanje citokroma c, aktivira kaspaze 9, 8 in 7 ter da prihaja do cepitve PARP. Ob prisotnosti kaspaznega inhibitorja Z-VAD.fmk ni prišlo do zaviranja sprostitve citokroma c iz mitohondrija, kaj naj bi potrdilo hipotezo o mitohondrijski poti apoptoze. Po drugi strani pa so dokazali tudi aktivnost kaspaze 8 (28).

Prodigiozin, izoliran iz bakterije *S. marcescens* 2170, povzroča apoptozo hematopoetskih tumorskih celičnih linijah (Jurkat, NS0, HL-60 in Ramos). Ob dodatku kaspaznega inhibitorja Z-VAD.fmk ta učinek ni bil opažen, kar nam pove, da imajo kaspaze ključno vlogo v indukciji apoptoze tumorskih hematopoetskih celičnih linijah (21).

Druge študije so pokazale, da prodigiozin poveča ekspresijo receptorjev smrti DR-4 in DR-5, ki omogočajo sprožitev apoptoze preko ekstrinzične poti aktivacije (40).

Mitohondrijsko pot apoptoze uravnavajo proapoptotski in antiapoptotski proteini iz družine proteinov Bcl-2. Številne tumorske celice lahko razvijejo določene antiapoptotske mehanizme, kot npr. povečano ekspresijo antiapoptotskih proteinov, ki vodijo do pojava rezistence na klasične kemoterapevtike. Prodiginini delujejo neodvisno od Bcl-2 proteinov.

Novejše študije so pokazale, da undecilprodigiozin poveča izražanje proapoptotskih in zniža izraženje antiapoptotskih Bcl-2 proteinov v MCL-7 celicah (19).

### 1.3.3.1 Mehanizem delovanja

Apoptotske poti, ki jih sprožijo prodiginini, so zapletene in zahtevajo nadaljnje raziskave. Natančen mehanizem njihovega delovanja še ni znan. Predlagani so štiri mehanizmi:

- prodiginini kot modulatorji znotrajceličnega pH;
- prodiginini cepijo molekulo DNA;
- prodiginini kot regulatorji signalnih poti;
- prodiginini kot inhibitorji celičnega cikla.

#### 1.3.3.1.1 *Prodiginini kot modulatorji pH*

Ohranjanje in regulacija ustreznega znotrajceličnega pH ( $pH_i$ ) s pomočjo  $\text{Na}/\text{H}$  izmenjevalca,  $\text{Cl}/\text{HCO}_3$  izmenjevalca in vakuolarne  $\text{H}^+$ -ATPaze (V-ATPaze) omogoča normalno delovanje celic (19).

Zunajcelični pH ( $pH_e$ ) je v tumorskem tkivu nižji kot v normalnem tkivu, medtem ko je citosolni pH transformiranih in tumorskih celic nevtralen do rahlo alkalen v primerjavi z nemalignimi celicami. Rakovo spremenjene celice se bolj občutljive na spremembo znotrajceličnega pH ( $pH_i$ ). Visok  $pH_i$  vzdržujejo preko povečane ekspresije in aktivnosti različnih ionskih izmenjevalcev, kot je V-ATPaza. Apoptozo lahko sprožijo spremembe  $pH_i$ . V zgodnji fazi mitohondrijske poti prihaja do alkalizacije mitohondrijske notranjosti, acidifikacije citosola in sproščanja citokroma c. V-ATPaza omogoča vzdrževanje kislega okolja znotraj celičnih organelov. Bafilomicin A1 je specifični inhibitor V-ATPaze, ki povzroča apoptozo tumorskih celic. Ugotovljeno je, da tudi prodigiozini inhibirajo aktivnost V-ATPaze preko promocije simporta  $\text{H}^+/\text{Cl}^-$ , kar privede do nevtralizacije notranjosti organelov ter acidifikacije citosola. Odgovor celic na te dogodke je lahko sprožitev apoptoze (11).

Yamamoto in sod. so dokazali, da je takšen mehanizem delovanja cikloprodigiozin hidroklorida vzrok sprožitve apoptoze v humanih celicah raka dojke, ki prekomerno izražajo V-ATPazo (25), v humanih celicah raka debelega črevesja (41) in HL-60 celicah (humane celice promielocitične levkemije) (42).

#### *1.3.3.1.2 Prodiginini cepijo molekulo DNA*

Poškodba DNA izzove ustavitev celičnega cikla, aktivacijo popravljalnih mehanizmov in v primeru nepopravljivih okvar indukcijo apoptoze. Planarna struktura prodigininov omogoča vezavo na molekulo DNA z interkelacijo. Metoksi skupina in obročni dušiki tvorijo vodikove vezi, kationska narava prodigininov pri nevtralnem pH pa omogoča vzpostavitev elektrostatskih interakcij z fosfatnimi skupinami DNA (15).

Prodigiozin olajša od bakra odvisno oksidativno cepitev dvojne vijačnice DNA. SAR študije so pokazale, da je pirolni obroč A pomemben za nukleazno aktivnost in citotoksični učinek prodigiozina. Prodigiozin reducira baker (Cu (II)), nastane kationski radikal, ki lahko dimerizira ali reagira z nukleofili, kot sta DNA ali H<sub>2</sub>O. Istočasno, reducirana oblika bakra (Cu (I)) reagira z kisikom in tvori reaktivne kisikove zvrsti, ki privedejo do poškodb in cepitve molekule DNA. Pomembna lastnost tumorskih celic je povisana koncentracija bakra, ki je v sledovih normalno prisoten v celičnih organelih in jedru (43, 44).

Na osnovi teh podatkov lahko rečemo, da je povezanost med nukleazno aktivnostjo prodigiozina in njegovim citotoksičnim delovanjem na tumorske celice pomembna za proapoptične učinke prodigininov. Po drugi strani, ta korelacija ni opažena pri vseh prodigininih. Prav tako je težko določiti vpliv neposredne cepitve dvojne vijačnice na proapoptični učinek prodigininov, glede na dejstvo, da tudi ostale s prodiginini inducirane apoptotske poti, privedejo do fragmentacije DNA.

Novejše študije so pokazale, da prodigiozin poškoduje DNA z inhibicijo aktivnosti topoizomeraze I in II. Mehanizem takega delovanja še ni znan (7).

#### *1.3.3.1.3 Prodiginini kot regulatorji signalnih poti*

Družina proteinskih kinaz, aktiviranih z mitogeni, (MAPK) je vpletena v številne fiziološke procese in vključuje tri poddružine: JNK (c-jun N terminalna kinaza), p38-MAPK (p38- mitogen aktivirana proteinska kinaza) in ERK (ekstracelularno regulirana kinaza) (7).

Različni zunanji dražljaji lahko aktivirajo površinske celične receptorje in sprožijo kinazne signalne poti MAP. ERK aktivirajo rastni faktorji, medtem ko proteinske kinaze povezane s stresom (JNK in p38-MAPK) inducirajo citokini, stres, mediatorji diferenciacije in celične smrti. Prodiginini vplivajo na kinazne signalne poti MAP in sprožijo apoptozo (11, 15). Ugotovljeno je, da cikloprodigiozin z aktivacijo JNK poveča ekspresijo apoptoznega liganda FasL. Dokazano je, da prodigiozin inducira fosforilacijo p38-MAPK, brez vpliva na JNK in tako poveča izražanje določenih onkogenov (7).

Genske raziskave na celicah MCF-7 (humane celice raka dojke), ki so jih tretirali s prodigiozinom, so pokazale vpletenost GSK-3 $\beta$  (glikogen sintaze kinaze-3 $\beta$ ) v procesu apoptoze. GSK-3 $\beta$  poveča ekspresijo NAG-1 (nesteroidnega protiinflamatornega gena 1), proapoptotskega proteina, kar privede do indukcije receptorjev smrti DR4 in DR5 in celične smrti preko aktivacije kaspaze 8 (19).

#### *1.3.3.1.4 Prodiginini kot inhibitorji celičnega cikla*

Vpliv prodigininov je lahko proapoptotičen ali le inhibitoren za celično rast in je odvisen od tipa celic in koncentracije prodiginina. Zapleten mehanizem delovanja na različne molekule, ključne za kontrolu proliferacije in apoptoze ni še pojasnjen (7).

## **2 NAMEN DELA**

Namen diplomske naloge je bil proučiti citotoksični učinek rdečega pigmenta bakterije *Vibrio* sp., ki je uvrščen v skupino prodigiozinom podobnih molekul. Prodiginini so znani po svojem citotoksičnem učinku na različne rakave celične linije. Na podlagi teh ugotovitev bi lahko rdeči pigment bakterije *Vibrio* sp. predstavljal novo protitumorsko učinkovino.

Želimo ugotoviti, ali rdeči pigment bakterije *Vibrio* sp. vpliva na celično viabilnost. Ta vpliv bomo proučevali na celicah NS0 (mišja mielomska celična linija), ki jih bomo za določen čas izpostavili različnim koncentracijam pigmenta. Nato bomo ugotavljeni število živih celic, in sicer s pomočjo barvila tripan modro in s testom XTT, ki omogoča določitev viabilnosti celic na osnovi njihove presnovne aktivnosti.

V nadaljevanju bomo skušali ugotoviti, ali je za zmanjšanje števila živih celic ob delovanju pigmenta odgovorna od kspaz odvisna apoptoza. Le-to bomo določili s merjenjem aktivnosti kaspaze-3, osrednje izvršiteljske kaspaze v procesu apoptoze.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 REAGENTI IN LABORATORIJSKA OPREMA

##### 3.1.1 Reagenti

**Preglednica II:** Seznam uporabljenih reagentov.

| Reagenti                                  | Proizvajalec  |
|---|---------------|
| 96 % etanol                               | Sigma-Aldrich |
| APOPCYTO Caspase-3 Colorimetric Assay kit | MBL           |
| DMEM                                      | Sigma-Aldrich |
| FBS (fetalni goveji serum)                | Sigma-Aldrich |
| Gentamicin                                | Krka          |
| RPMI                                      | Sigma-Aldrich |
| Tripansko modrilo                         | Sigma-Aldrich |
| XTT                                       | Sigma-Aldrich |

##### 3.1.2 Laboratorijska oprema

**Preglednica III:** Seznam uporabljene laboratorijske opreme.

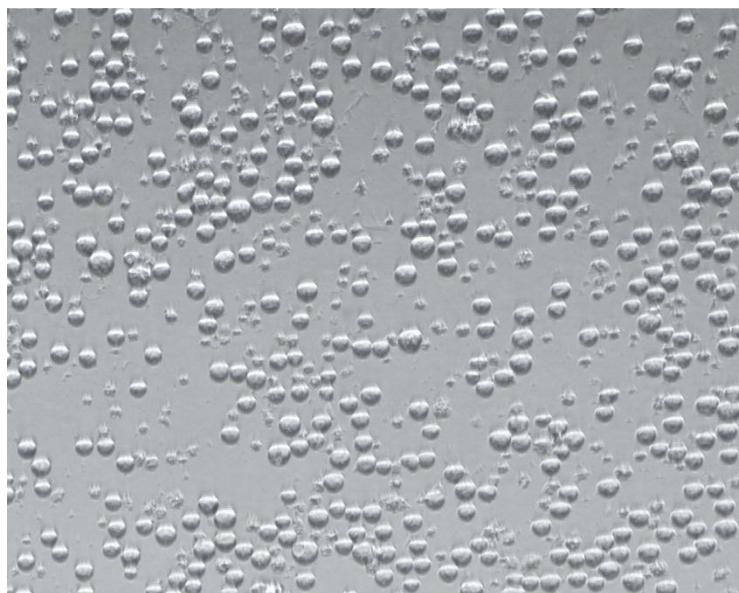
| Oprema   | Proizvajalec    |
|--|-----------------|
| Avtomatske pipete  | Biohit          |
| Večkanalna pipeta  | Transferpette-8 |
| Pipete za enkratno uporabo 5,10 ml   | Cellstar        |
| Hemocitometer  | Brand           |
| Krovna stekla  | Brand           |
| Injekcijske brizge 5 ml  | BD Microlane    |
| Sterilizacijski filter 0,2 µm  | Ministar        |
| Pipetni nastavki 1-10 µl, 10-100 µl in 100-1000 µl                         | Brand           |
| Plastenke za celične kulture s perforiranim zamaškom (25 cm <sup>2</sup> ) | Cellstar        |
| Gojlne plošče s 6 in 96 vdolbinami   | Brand           |
| Centrifugirke 15 in 50 ml  | TPP             |

se nadaljuje

| Oprema                         | Proizvajalec                |
|--------------------------------|-----------------------------|
| Stojalo za centrifugirke       | Assistant                   |
| Pipetor za pipete              | Brand                       |
| Čaše 10 ml                     | Boro 3,3                    |
| Centrifuga                     | Centric 322A Tehnica        |
| Mikrocentrifuga                | Eppendorf centrifuge 5417 R |
| Hladilnik (+ 4 °C)             | LTH                         |
| Zamrzovalnik (- 20 °C)         | Gorenje                     |
| Vodna kopel                    | Uniequip                    |
| CO <sub>2</sub> inkubator      | Sanyo                       |
| Bezprašna mikrobiološka komora | Telestar Biostar            |
| Spektrofluorimeter             | Biotek                      |
| Invertni mikroskop             | Olympus CK2                 |

### 3.1.3 Celična linija NS0

Celična linija NS0 je trajna transformirana celična linija mišjih limfocitov B. Mielomske celice NS0 so okrogle, limfoblastoidne oblike in rastejo v suspenzijski kulturi posamično ter v obliki skupkov. Gojili smo jih v gojišču DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) z dodatkom 10% FBS (Fetal Bovine Serum) in 0,1% gentamicina.



**Slika 5:** Celična linija NS0.

Celice so slikane pod invertnim mikroskopom pri povečavi 20x.

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Vzdrževanje celic

Delo s celicami poteka v brezprašni komori z laminarnim pretokom zraka. Celične kulture rastejo v CO<sub>2</sub> inkubatorju, pri 37 °C, v 5 % atmosferi CO<sub>2</sub>. Za svoje preživetje in rast potrebujejo gojišče z ustrezno sestavo (različne hrnilne snovi, rastni faktorji, antibiotiki), pH vrednostjo (7,2-7,4) in temperaturo (37 °C).

Celično linijo NS0 smo gojili v sterilnih plastičnih gojitvenih posodah s površino 25 cm<sup>2</sup>, v gojišču DMEM z dodatkom 10 % (v/v) FBS in 0,1 % (v/v) gentamicina. Gojišče smo hranili v hladilniku in ga vedno pred uporabo segreli v vodni kopeli na 37 °C.

Celice smo presajali vsake 2 do 3 dni, dokler jih ni bilo dovolj za izvedbo posameznega poskusa. Z rahlim stresanjem gojitvene posodice smo skupke celic odstranili od podlage. Celično suspenzijo smo prenesli s pipeto za enkratno uporabo v mikrocentrifugirko ter centrifugirali 10 minut pri 200 x g. Po končanem centrifugiranju smo odpipetirali izrabljeno gojišče, celice resuspendirali v svežem gojišču in prenesli v nove gojitvene posode, ki smo jih predhodno pravilno označili.

#### 3.2.1.1 Odmrzovanje celic

Zamrzovalno vialo s celicami smo vzeli iz posode z tekočim dušikom, hitro odtajali pri 37 °C, razkužili s etanolom in prenesli v brazprašno komoro. V vialo smo dodajali segreto gojišče in odtaljeno celično suspenzijo prenašali v 15 ml centrifugirko. Po končanem prenosu smo celicam dodali še 10 ml gojišča in jih centrifugirali 10 minut pri 200 x g ter potem odstranili supernatant in znova resuspendirali v 10 ml gojišča. Na ta način smo popolnoma odstranili sledi krioprotektanta dimetilisulfoksida (DMSO) in preprečili njegovo citotoksično delovanje pri temperaturah nad 4 °C. Celično suspenzijo smo potem nasadili v 25 cm<sup>2</sup> gojitveno posodo in prenesli v inkubator.

### **3.2.2 Priprava vzorčnih raztopin**

Izhodno založno raztopino pigmenta v 96 % etanolu nam je podaril prof. dr. David Stopar z Oddelka za živilstvo, Katedra za mikrobiologijo, Biotehniška fakulteta. Koncentracija pigmenta bakterije *Vibrio* sp. v izhodni raztopini je bila 1,6 mg/ml. Na podlagi predhodnih raziskav smo se odločili, da bomo vpliv pigmenta na celično viabilnost proučevali pri koncentracijah, pri katerih etanol naj ne bi imel učinkov na celice NS0. Pripravili smo 10, 100, 1000 in 10000-kratno redčitev osnovne raztopine pigmenta v destilirani vodi. Kot kontrolo smo upoštevali morebitni vpliv etanola na viabilnost celic in sicer pri enakih razredčinah, kot pri raztopini pigmenta. Pri pripravi vzorčnih raztopin pigmenta oz. kontrole smo uporabljali 1,5 ml mikrocentrifugirke Eppendorf in destilirano H<sub>2</sub>O, ki smo jo predhodno sterilizirali s pomočjo sterilizacijskega filtra z velikostjo por 20 µm. Preglednica 4 prikazuje redčitve in končne koncentracije etanola (kontrole) ter pigmenta v vzorčnih raztopinah.

**Preglednica IV:** Redčitve in končne koncentracije etanola ter pigmenta.

| Redčitev | Končna koncentracija etanola (%) | Končna koncentracija pigmenta (µg/ml) |
|----------|----------------------------------|---------------------------------------|
| 10 x     | 9,6                              | 160                                   |
| 100 x    | 0,96                             | 16                                    |
| 1000 x   | 0,096                            | 1,6                                   |
| 10 000 x | 0,0096                           | 0,16                                  |

### **3.2.3 Določanje citotoksičnosti**

Proučevali smo citotoksični učinek pigmenta v različnih koncentracijah in po različnih časih inkubacije. Viabilnost celic smo določali z dvema metodama :

- s štetjem živih celic z barvilo tripan modro;
- z testom XTT.

#### **3.2.3.1 Štetje celic s tripan modrim**

Tripan modro je vitalno barvilo, ki modro obarva mrtve celice s poškodovano celično membrano. Žive, nepoškodovane celice, ki imajo ohranjeno integriteto celične membrane, se ne obarvajo. Metoda barvanja s tripan modrim nam torej omogoča ločevanje in štetje živih in mrtvih celic pod mikroskopom.

Eksperimentalni del:

Opravili smo tri preskuse. Vpliv različnih koncentracij pigmenta smo spremeljali v treh časovnih intervalih: po 4, 24 in 48 urah delovanja pigmenta.

Celicam, ki so rasle v gojitveni posodi, smo po centrifugiraju odstranili izrabljeno gojišče in jih resuspendirali v 10 ml svežega gojitvenega medija. Celice smo prešteli in izračunali skupno število živih celic v suspenziji po enačbi 1:

$$N = n/4 \times R \times V \times 10^4$$

N - skupno število živih celic v suspenziji

n - povprečno število celic v štirih kvadratih hemocitometra

R - faktor redčenja zaradi redčitve z gojiščem in mešanja z tripan modrim (10)

V - volumen celične suspenzije, iz katere smo vzeli vzorec (ml)

$10^4$  – volumen celične suspenzije nad kvadratkom (1/ml)

V vsakem poskusu smo vsako koncentracijo pigmenta in kontrole (preglednica 4) testirali v treh paralelkah. V posamezno vdolbino na mikrotitrski plošči s 96 vdolbinami smo nasadili 200 µl celične suspenzije z  $10^5$  celicami. Po nasaditvi smo mikrotitrsko ploščo prenesli v inkubator za 24 ur. Naslednji dan smo v 1,5 ml mikrocentrifugirkah pripravili vzorčne raztopine pigmenta in kontrole (postopek je opisan v poglavju 3.2.2) ter v vsako vdolbino dodali po 22 µl ustrezne raztopine pigmenta oz. kontrole ter prenesli nazaj v inkubator. Vpliv pigmenta na preživetje celic smo prvič preverjali po štirih urah inkubacije. S pipeto smo odpipetirali po 20 µl celične suspenzije, ki smo jo predhodno dobro resuspendirali, dodali 80 µl gojišča in iz tako pripravljene suspenzije vzeli 20 µl ter ji primešali 20 µl 0,4 % (w/v) tripan modrega. Mešanico smo nanesli na hemocitometer in pod svetlobnim mikroskopom posebno prešteli žive in mrtve celice. Skupno število živih oz. mrtvih celic smo izračunali po enačbi 1. Enak postopek je sledil po 24 in 48 urnem delovanju pigmenta.

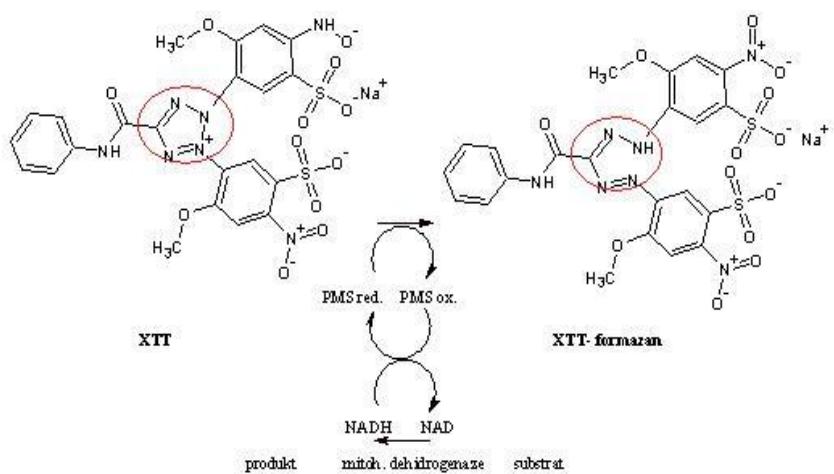
### 3.2.3.2 Test XTT

Test smo opravili s kompletom In Vitro Toxicology Assay Kit, XTT based, TOX2 (Sigma-Aldrich).

Eden od bolj pomembnih kriterijev živosti celic je prisotnost celične presnove.

Osnovna komponenta XTT (natrijev 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolijev-5-karboksanilid) je rumena tetrazolijeva sol, ki jo mitohondrijske dehidrogenaze živih, presnovno aktivnih celic, preko mediatorja elektronskega prenosa fenazin metosulfata (PMS), reducirajo do oranžnoobarvanega, vodotopnega formazana.

Količina nastalega formazana je direktno proporcionalna številu živih celic in jo določamo spektrofotmetrično z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 450-690 nm. Test XTT je enostavna, natančna, kvantitativna kolorimetrična metoda za določanje celične rasti in razmnoževanja ter citotoksičnosti snovi.



**Slika 6:** Shematski prikaz redukcije substrata XTT

Eksperimentalni del:

Nasadili smo enako število celic/vdolbino mikrotitirske plošče, jih tretirali z enakimi koncentracijami pigmenta oz. kontrole ter spremljali učinek v enakih časovnih intervalih kot pri testu štetja z tripan modrim (opisano v poglavju 3.2.3.1). Istočasno smo pripravili redčitveno vrsto netretiranih celic, ki so nam služile kot standard. Namesto gojišča DMEM, smo uporabili gojišče RPMI brez fenol rdečega, ter se na ta način izognili njegovem motečem vplivu na absorbanco. Po 4, 24 in 48 urah delovanja pigmenta, v posamezno vdolbino plošče smo dodajali XTT v končni koncentraciji 20 % (v/v) (volumen je bil enak 20 % volumna gojišča v vdolbini) ter inkubirali nadaljnje 3 ure. Absorbanco

smo izmerili pri valovni dolžini 450 nm. Iz absorbanc standardnih raztopin in znanih koncentracij celic v redčitveni vrsti smo narisali umeritveno krivuljo. Zaradi značilne rdeče obarvanosti raztopine pigmenta v 96 % etanolu, smo izmerili tudi absorbance vzorčnih raztopin samega pigmenta ter vrednosti odšteli od absorbanc vzorcev. Na podlagi tako pridobljenih absorbanc smo s pomočjo umeritvene krivulje (grafični prikaz umeritvene krivulje je podan v poglavju rezultati) izračunali koncentracijo živih celic v naših vzorcih.

### 3.2.4 Merjenje aktivnosti kaspaze-3

Stopnjo apoptoze smo preverjali z merjenjem aktivnosti izvrševalne kaspaze-3 s pomočjo reagenčnega kompleta APOPCYTO Caspase-3 Colorimetric Assay kit. Kaspaze-3, ki so prisotne v celičnem lizatu selektivno prepoznajo in cepijo DEVD zaporedje iz sinteznega substrata DEVD- pNA (p-nitroanilid). Absorbenco sproščenega pNA merimo pri valovni dolžini 405 nm.

Eksperimentalni del:

Celice smo gojili na mikrotitrski plošči s 6 vdolbinami. V posamezno vdolbino smo odpipetirali 2 ml celične suspenzije, ki je vsebovala  $3 \times 10^6$  celic, dodali po 222 µl ustrezne razredčine založne raztopine pigmenta v 96 % etanolu (naredili smo 10, 100 in 1000-kratno redčitev) in prenesli v CO<sub>2</sub> inkubator za 24 ur. Istočasno smo kot kontrolo uporabili po 222 µl 9,6 %, 0,96 % in 0,0096 % etanola. Naslednji dan smo celotni volumen prenesli v označeno 15 ml epruveto, dno vdolbine spirali z 1x PBS ter epruveto napolnili do skupnega volumena 3 ml. Celično suspenzijo iz epruvet smo dobro resuspendirali, vzeli 20 µl, primešali 20 µl 0,4 % (w/v) tripan modrega, mešanico nanesli na hemocitometer, prešteli in nato še izračunali skupno število celic v vzorcu (po enačbi 1). Glede na to število, smo določili potrebno količino pufra za lizo celic (proizvajalec v navodilih navaja, da za  $10^6$  celic potrebujemo 25 µl pufra za lizo). Epruvete smo centrifugirali 10 minut pri 200 x g, odstranili gojišče in celice resuspendirali v 3 ml 1x PBS. Celice smo znova centrifugirali, odstranili PBS, močno resuspendirali v predhodno določenem volumenu ledeno mrzlega pufra za lizo, vsebino epruvet prenesli v mikrocentrifugirke in jih shranili v zamrzovalniku čez noč. Naslednji dan smo vzorce počasi odtalili na ledu, centrifugirali 1 minuto pri 10000 x g in 4 °C ter supernatant previdno odpipetirali v nove mikrocentrifugirke. V vdolbino mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinami smo odpipetirali 50 µl

2 x reakcijskega pufra, ki je vseboval 10 mM DTT, 50 µl celičnega lizata posameznega vzorca oz. 50 µl lizirajočega pufra pri slepem vzorcu in 5 µl kaspaznega-3 substrata. Ploščo smo prenesli v inkubator in po dveh urah merili absorbanco pri valovni dolžini 405 nm. Pripravili smo tudi standardne raztopine pNA in jim merili absorbanco, ter na podlagi dobljenih vrednosti narisali umeritveno krivuljo (grafični prikaz umeritvene krivulje je podan v poglavju rezultati). Iz osnovne založne standardne raztopine pNA s koncentracijo 100 mM smo pripravili 5 mM raztopino. Z ustreznim redčenjem z lizirajočim pufrom smo iz 5 mM raztopine pripravili standardne raztopine z naslednjimi koncentracijami: 500 µM, 250 µM, 125 µM, 62,5 µM, 31,25 µM, 15,625 µM. Aktivnost kaspaze-3 je sorazmerna koncentraciji prostega pNA v vzorcu. Iz enačbe umeritvene krivulje smo izračunali količino prostega pNA v naših vzorcih in aktivnost kaspaze-3 izračunali po enačbi 2:

$$\text{Aktivnost kaspaze-3 [nmol/h]} = \frac{\text{konz. sproščenega pNA (\mu M)}}{\text{čas inkubacije (h)}} \times 0,1 \text{ ml cel. lizata}$$

## 4 REZULTATI

### 4.1 DOLOČANJE CITOTOKSIČNOSTI

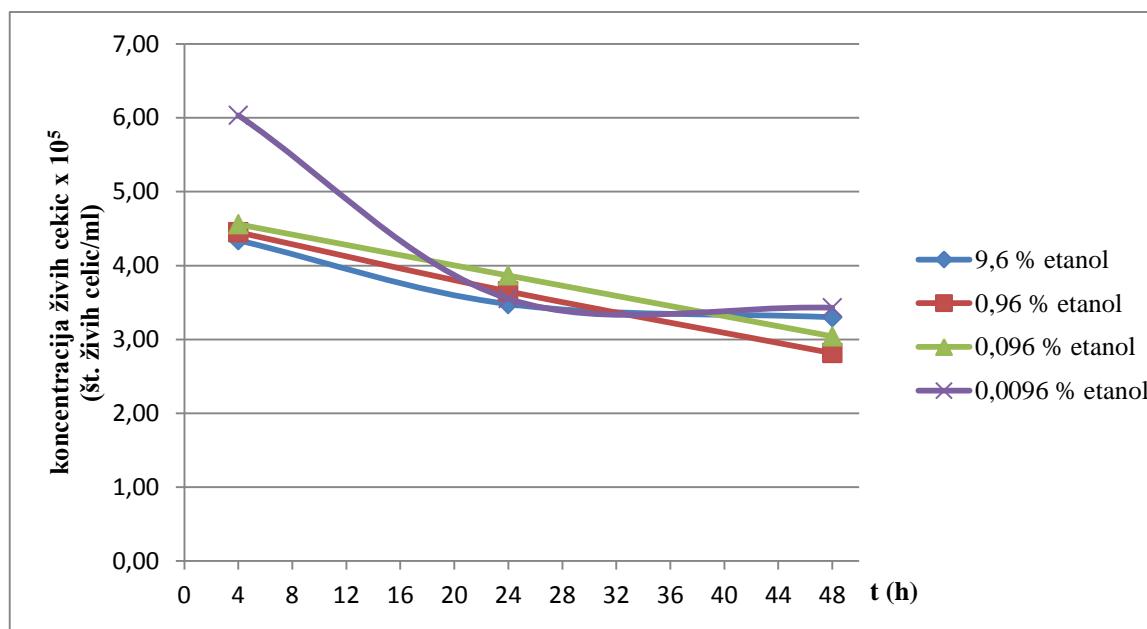
Preverjali smo citotoksično delovanje rdečega pigmenta bakterije *Vibrio* sp. na celično linijo NS0. Spremljali smo učinek štirih koncentracij pigmenta ( $160 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $1,6 \mu\text{g}/\text{ml}$  in  $0,16 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) po 4, 24 in 48-urni inkubaciji.

#### 4.1.1 Število živih celic, določeno s štetjem s tripansko modrim barvilom

Viabilnost celic smo določili z metodo štetja živih celic z barvilm tripan modro.

Iz preštetega števila celic v štirih kvadratih hemocitometra smo s pomočjo enačbe 1 določili koncentracijo živih celic v suspenzijski kulturi. Upoštevali smo, da je faktor redčenja (R) 2.

Ker je izolirani pigment raztopljen v 96 % etanolu, smo najprej preverili morebitni učinek raztopin etanola na preživetje celic.

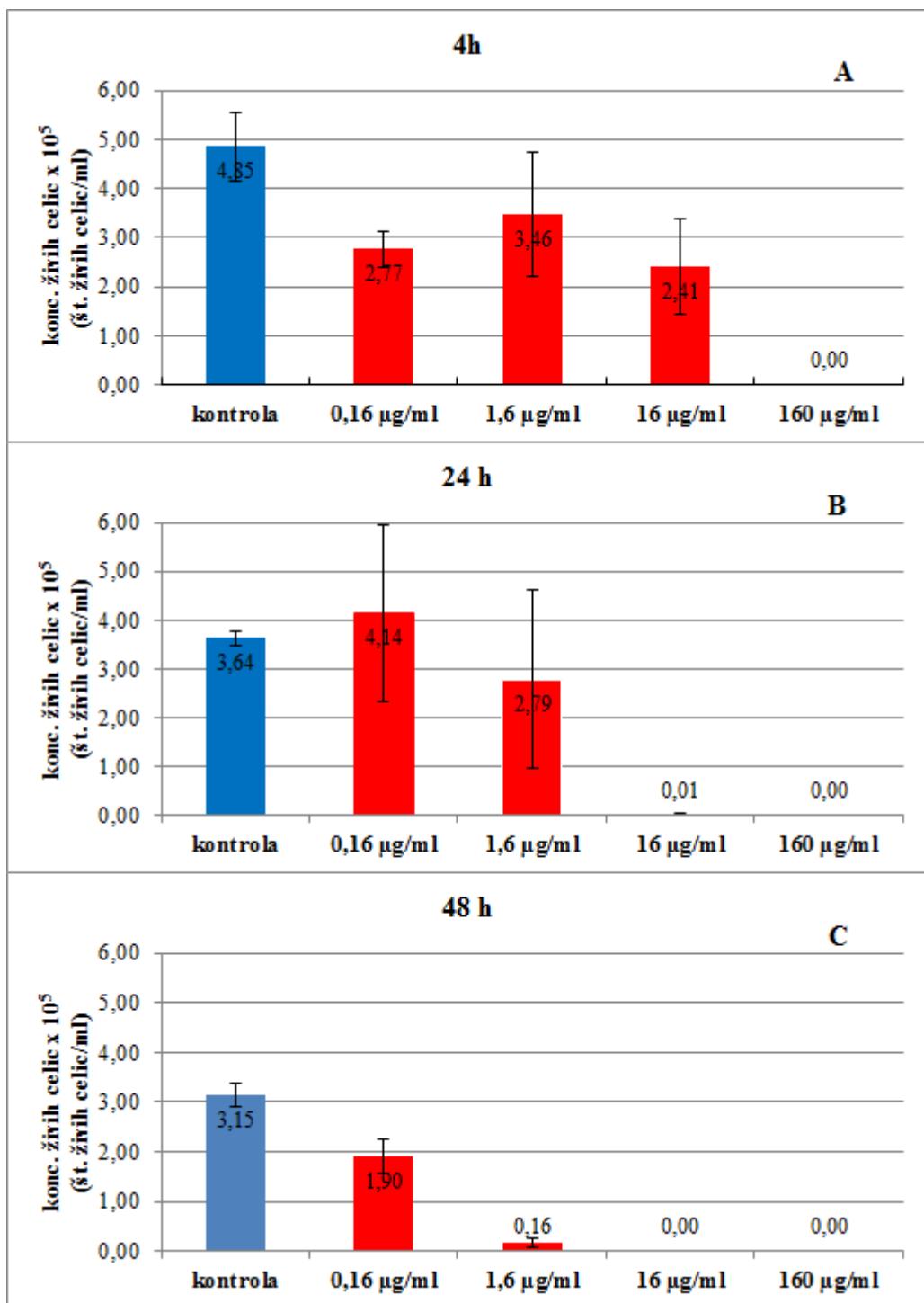


Slika 7: Koncentracija živih celic NS0 v odvisnosti od časa izpostavljenosti etanolu.

Celice smo inkubirali 4, 24, 48 ur v gojišču, kjer je bil prisoten etanol v končnih koncentracijah: 9,6 %, 0,96 %, 0,096 %, 0,0096 %. Pikazane so povprečne vrednosti treh neodvisnih poskusov v treh zaporednih ponovitvah.

Iz slike (7) je razvidno, da izbrane koncentracije etanola nimajo vpliva na preživetje celic. Rahlo znižanje števila živih celic v odvisnosti od časa izpostavljenosti etanolu lahko pripisemo normalnem odmiranju celic zaradi pomanjkanja hraničnih snovi v gojišču.

Celice NS0 smo nato gojili v prisotnosti pigmenta. Začetna koncentracija celic v posamezni vdolbini mikrotitrsko plošče je znašala  $5 \times 10^5$  celic/ml. Ker izbrane koncentracije etanola niso vplivale na preživetje celic (slika 7) v izbranih časih inkubacije, smo kot kontrolo upoštevali povprečno koncentracijo živih celic, določeno pri vzorcih, ki smo jih tretirali z etanolom.



Slika 8 (A, B, C): Koncentracija živih NS0, določena s štetjem celic po barvanju z tripan modrim barvilom, po 4-urni (A), 24-urni (B) in 48-urni (C) izpostavljenosti pigmentu v različnih končnih koncentracijah.

Prikazane so povprečne vrednosti treh neodvisnih poskusov v treh zaporednih ponovitvah in standardni odklon.

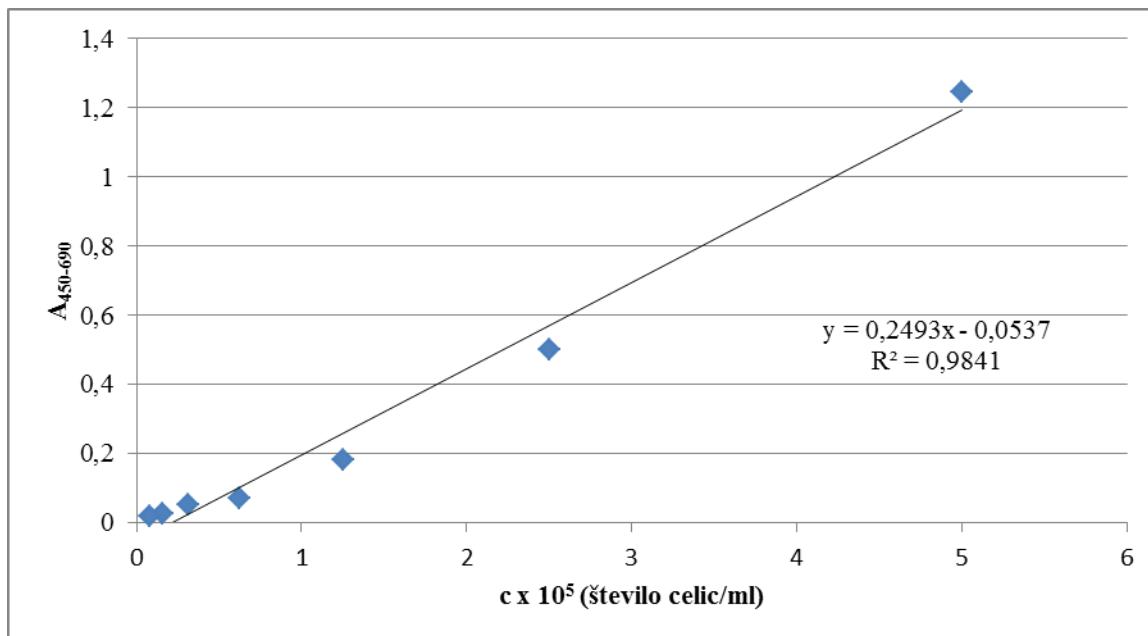
Na sliki 8 (A) vidimo, da je po 4-urni izpostavljenosti celic različnim koncentracijam pigmenta ( $0,16$ - $160 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), pri vseh vzorcih prišlo do zmanjšanja števila živih celic. Najvišja koncentracija pigmenta ( $160 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) je bila že po 4 urah toksična za vse celice, medtem ko pri drugih koncentracijah pigmenta opazimo le upad celične viabilnosti.

Po 24-urni izpostavljenosti pigmentu, je bila raztopina pigmenta s koncentracijo  $16 \mu\text{g}/\text{ml}$  toksična za večino celic (slika 8, B). Najnižja koncentracija pigmenta ( $0,16 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) ni imela vpliva na viabilnost celic, saj je bilo celic celo več kot pri kontroli in več, kot po 4-ih urah, medtem ko je raztopina pigmenta z koncentracijo  $1,6 \mu\text{g}/\text{ml}$  nekoliko zmanjšala število živih celic tako glede na kontrolo kot tudi glede na 4-urno izpostavljenost. Po 24-urni izpostavljenosti pigmentu smo imeli težave pri razlikovanju živih in mrtvih celic. Celice, ki smo jih tretirali z najnižjo koncentracijo pigmenta ( $0,16 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) in 10-krat večjo koncentracijo ( $1,6 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) se niso obarvale s tripan modrim, vendar so istočasno njihove morfološke spremembe nakazovale, da prihaja do celične smrti. Zaradi krčenja volumna smo določene celice zamenjali za netopne delce, kristale, delce prahu in razpadle celice, zaradi česar je med rezultati posameznih ponovitev prišlo do večjih odstopanj.

Po 48-urni inkubaciji s pigmentom (slika 8, C) se je izkazalo, da je le-to toksično tudi v koncentraciji  $1,6 \mu\text{g}/\text{ml}$  za večino celic, medtem ko je raztopina pigmenta z koncentracijo  $0,16 \mu\text{g}/\text{ml}$  povzročila znižanje števila živih celic.

#### 4.1.2 Test XTT

Viabilnost celic smo natančneje določili z merjenjem presnovne aktivnosti po dodatku reagenta XTT. Najprej smo test XTT izvedli s celicami NS0, in sicer z znanimi koncentracijami celic. Na grafu odvisnosti med absorbancijo ( $A_{450-690}$ ) in številom celic smo določili linearno območje testa XTT in enačbo umeritvene krivulje (slika 9).

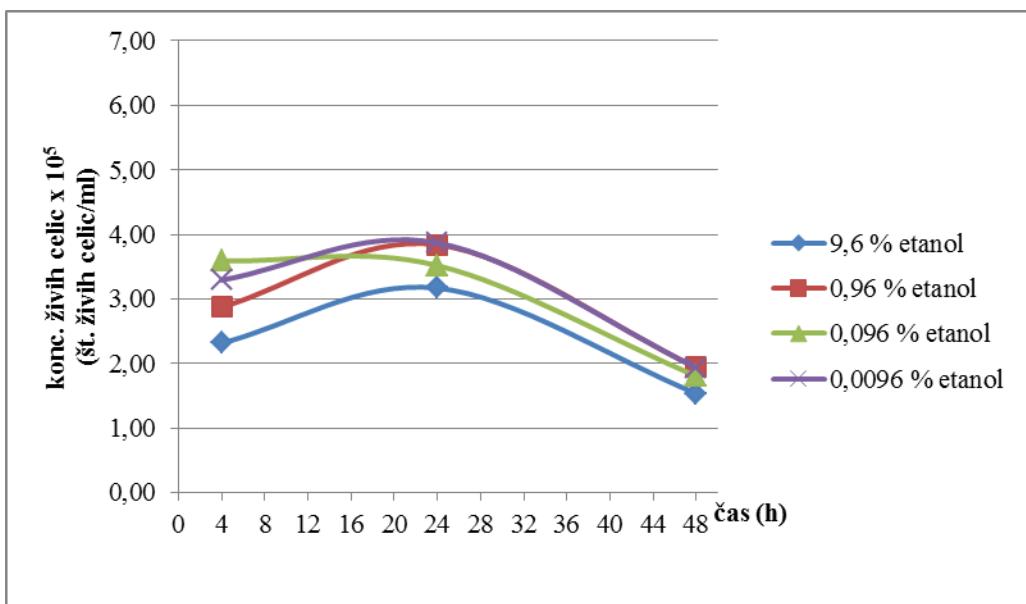


Slika 9: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije živih celic (št. celic/ml) v vzorcih.

Absorbanca (A) v odvisnosti od koncentracije celic NS0 (št.celic/ml) je bila merjena pri valovni dolžini 450-690 nm.

Iz enačbe umeritvene premice in izmerjenih absorbanc smemo lahko določili koncentracijo živih celic v naših vzorcih po 4, 24, 48-urni izpostavljenosti različnim koncentracijam pigmenta in etanola.

Celice NS0 smo najprej izpostavili etanolu v končnih koncentracijah: 9,6 %, 0,96 %, 0,096 % in 0,0096 % in sicer za 4, 24, 48 ur ter izvedli test XTT.

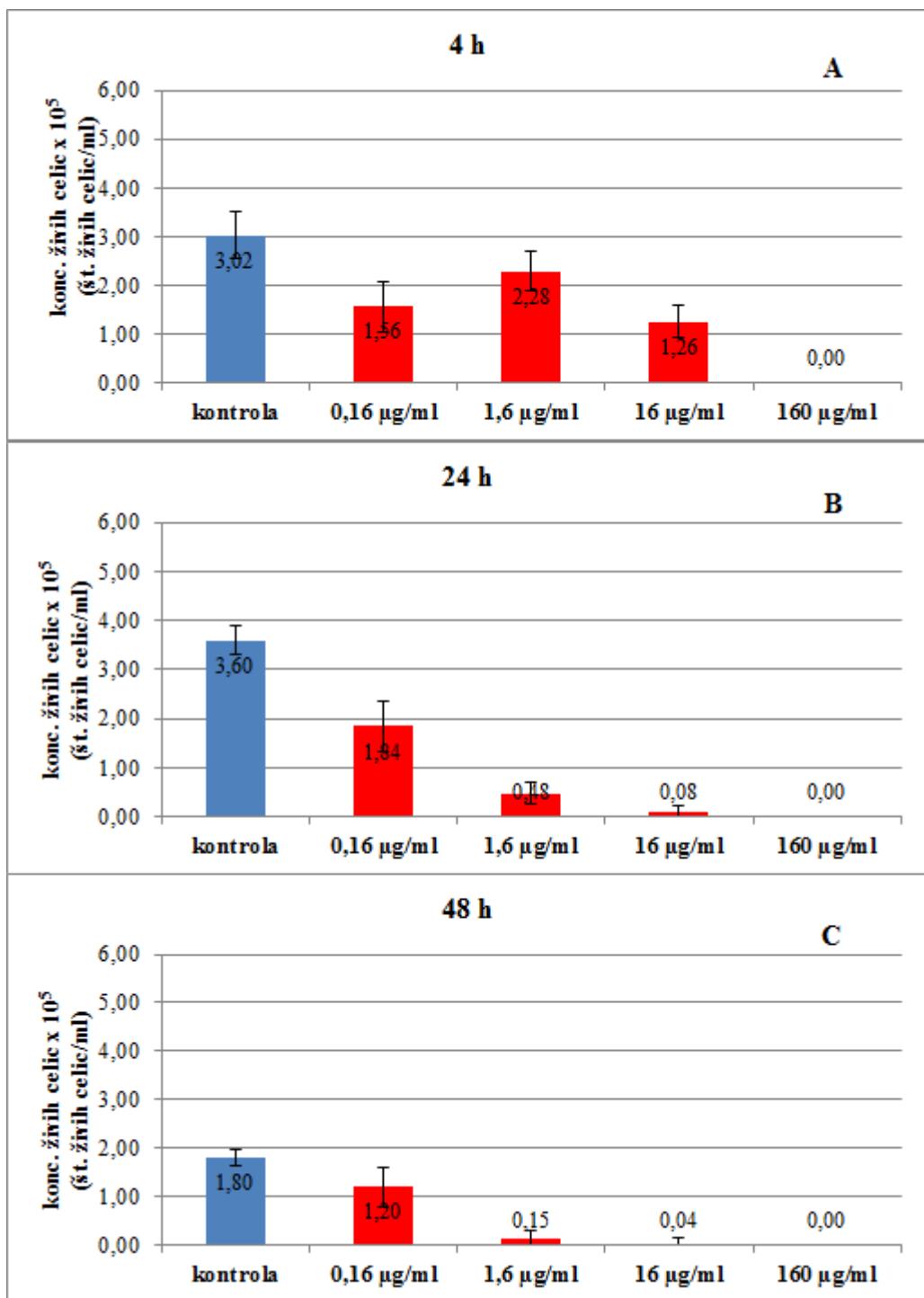


**Slika 10: Koncentracija živih celic NS0 v odvisnosti od časa izpostavljenosti etanolu.**

Celice smo inkubirali 4, 24, 48 ur v gojišču, kjer je bil prisoten etanol v končnih koncentracijah: 9,6 %, 0,96 %, 0,096 %, 0,0096 %. Pikazane so povprečne vrednosti treh neodvisnih poskusov v treh zaporednih ponovitvah.

Na sliki 10 vidimo, da je preživelost celic, ki smo jih izpostavili za določen čas (4, 24, 48 h) različnim koncentracijam etanola, približno enaka pri vseh vzorcih, kar pomeni, da etanol sam v teh koncentracijah nima vpliva na preživetje celic. Na podlagi teh podatkov in dejstva, da je izolirani pigment raztopljen v 96 % etanolu, smo se odločili, da bomo kot kontrolo upoštevali povprečno koncentracijo živih celic, določeno pri vzorcih, ki smo jih tretirali z raztopinami etanola.

Celice smo nato izpostavili različnim koncentracijam pigmenta in po 4, 24 in 48 urah izvedli test XTT.



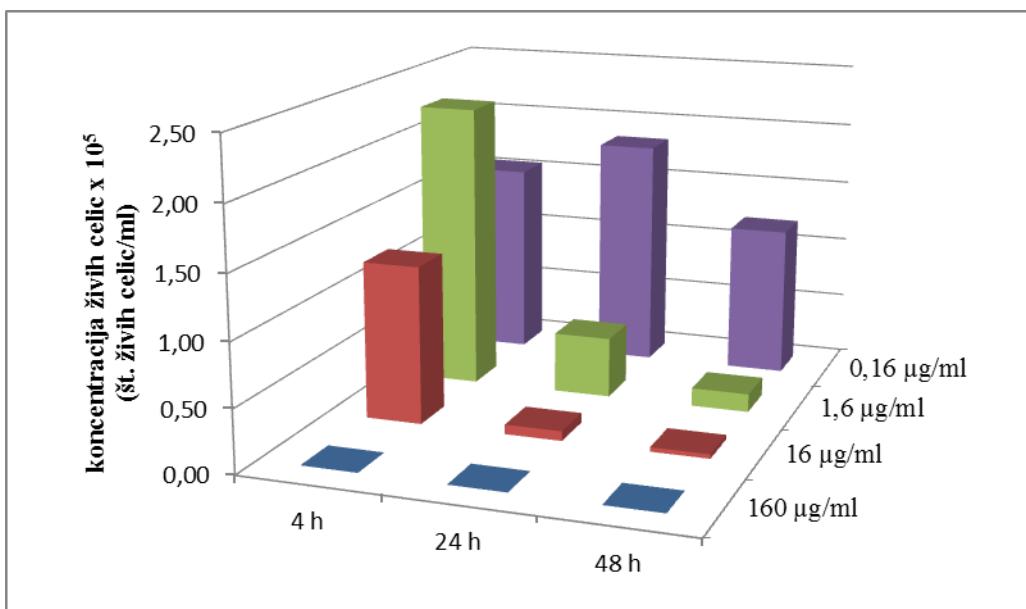
Slika 11 (A, B, C): Koncentracija živih celic NS0, določena s testom XTT, po 4-urni (A), 24-urni (B) in 48-urni (C) izpostavljenosti pigmentu v različnih končnih koncentracijah.

Prikazane so povprečne vrednosti štirih neodvisnih poskusov v treh zaporednih ponovitvah in standardni odklon.

Na sliki 11 (A) lahko vidimo, da je po 4-urni izpostavljenosti celic različnim koncentracijam pigmenta prišlo do znižanja celične viabilnosti glede na kontrolo. Po 4-urni inkubaciji pri najvišji koncentraciji pigmenta ( $160 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) ni več presnovne aktivnosti celic, iz česar lahko sklepamo, da je ta koncentracija pigmenta toksična za vse celice. Najnižja koncentracija ( $0,16 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) je imela močnejši citotoksični učinek kot 10-krat večja koncentracija, kar se je pokazalo tudi pri štetju s tripanskim barvilom.

Po 24-urni izpostavljenosti (slika 11, B) vidimo, da sta raztopini pigmenta s koncentracijo  $16 \mu\text{g}/\text{ml}$  in  $1,6 \mu\text{g}/\text{ml}$  delovali citotoksično in sta v primerjavi s 4-urno inkubacijo še dodatno znižali koncentracijo živih celic. Pri koncentraciji  $16 \mu\text{g}/\text{ml}$  je bil pigment toksičen za večino celic, pri koncentraciji  $1,6 \mu\text{g}/\text{ml}$  pa opazimo skoraj petkratno znižanje koncentracije živih celic. Najnižja koncentracija pigmenta po 24 urah ni bila citotoksična. Zaradi razmnoževanja je bilo število živih celic nekoliko višje kot tisto, določeno po 4-urni izpostavitvi najnižji koncentraciji pigmenta.

Kot kaže slika 11 (C), po 48 urah vidimo znižanje preživelosti celic tako pri kontroli kot tudi pri vzorcih, tretiranih z raztopinami pigmenta. Pri kontroli je prišlo do 2-kratnega znižanja viabilnosti (glede na 4 in 24-urno inkubacijo) medtem ko pri raztopinah pigmenta opazimo, da je najnižja koncentracija pigmenta nekoliko znižala število živih celic, vse druge (večje) koncentracije pigmenta pa so bile toksične za večino celic NS0.

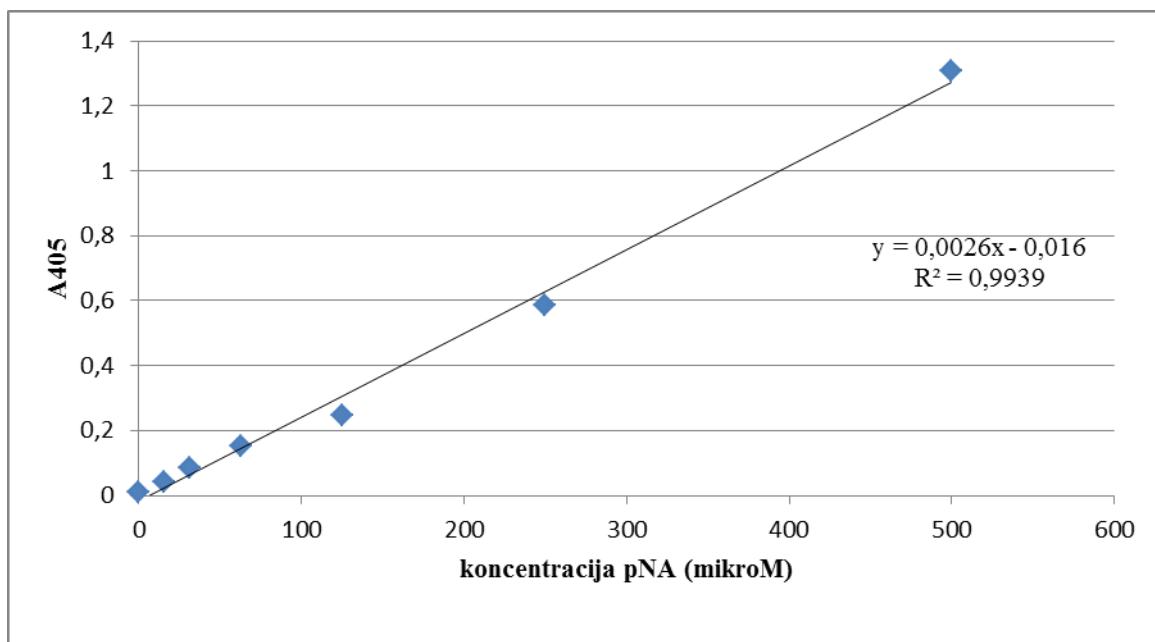


**Slika 12: Koncentracija živih celic glede na čas inkubacije in glede na koncentracijo pigmenta.**

Kot vidimo iz slike 12, je koncentracija živih celic po izpostavitvi pigmentu odvisna od časa izpostavitve in odmerka pigmenta. Citotoksični učinek najvišje koncentracije pigmenta je takojšen, saj že po štirih urah ni več živih celic. Po 48 urah imajo vse raztopine pigmenta, razen najnižje, skoraj 100 % citotoksični učinek na celično linijo NS0.

## 4.2 MERJENJE AKTIVNOSTI KASPAZE-3

Kaspaza-3 je izvrševalna kaspaza, ki je prisotna v citoplazmi celic in se izraža v pozni fazi apoptoze. Z določanjem njene aktivnosti, lahko določimo, če se v celicah sprožil proces apoptoze. Kaspaza-3 je proteaza, ki cepi substrate v specifičnem vezavnem mestu. V kompletu reagentov za določanje aktivnosti kaspaze-3 v celicah smo zato uporabili sintetični substrat DEVD-pNA, ki ga kaspaza-3 cepi do produkta pNA. Koncentracijo produkta smo določili z merjenjem absorbance pri 405 nm. Iz enačbe umeritvene krivulje (slika 13), ki smo jo pridobili iz absorbanc standardiziranih koncentracij pNA, smo preko izmerjenih absorbanc izračunali količino proste pNA v naših vzorcih ter aktivnost kaspaze-3 izrazili s pomočjo enačbe 2 (podpoglavlje 3.2.4).

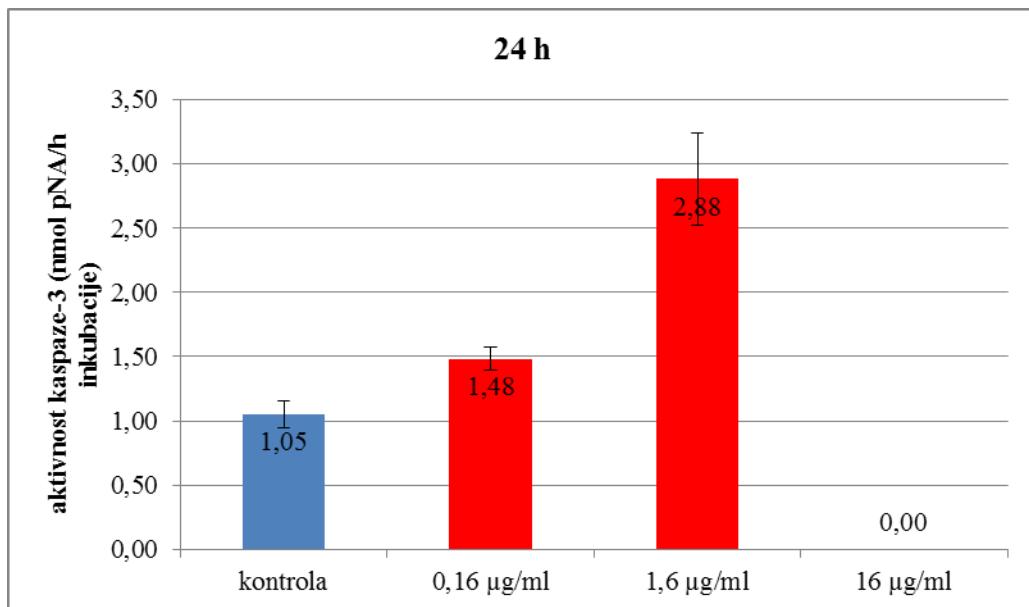


Slika 13: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije pNA.

Absorbanca (A) v odvisnosti od koncentracije standardne raztopine pNa (mikroM) pri valovni dolžini 405 nm.

Na podlagi rezultatov testa XTT, ki so pokazali, da je citotoksičnost različnih koncentracij pigmenta najbolj izražena po 24-urni inkubaciji, smo to časovno obdobje izbrali za določenje aktivnost kaspaze-3. Ker je kaspaza-3 citoplazemska kaspaza, smo za določanje njene aktivnosti morali pridobiti citoplazemske frakcije celic. Celično suspenzijo smo najprej centrifugirali, odstranili supernatant in s tem citoplazemsko vsebino mrtvih, že

razgrajenih celic ter celično vsedlino lizirali s pomočjo pufra za lizo. Po končani lizi smo celice znova centrifugirali in v pridobljenem supernatantu, ki je vseboval citoplazemske frakcije živih in apoptotskih celic, določali morebitno prisotnost kaspaze-3.



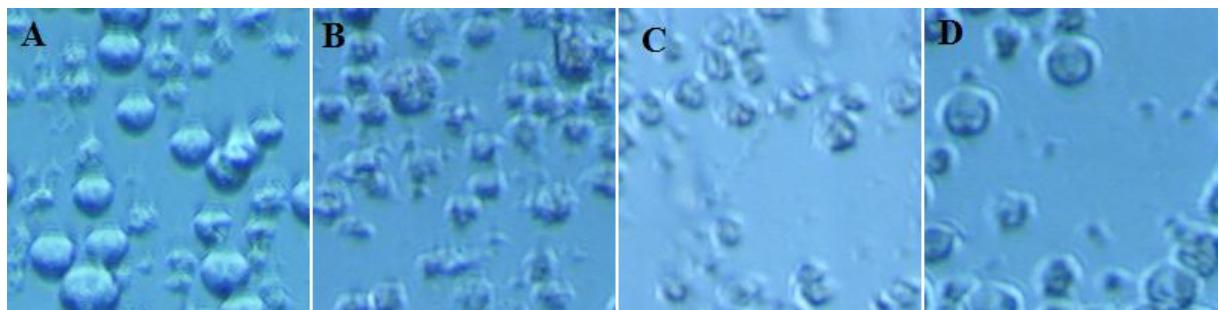
**Slika 14: Aktivnost kapaze-3 po 24-urni izpostavljenosti pigmentu.**

Prikazane so povprečne vrednosti dveh neodvisnih poskusov v treh zaporednih ponovitvah in standardni odklon.

Slika 14 prikazuje aktivnost kaspaze-3 po 24-urni inkubaciji celic NS0 s pigmentom različnih koncentracij.

Pri koncentraciji pigmenta 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$  nismo zasledili kaspazne aktivnosti.

Najvišjo stopnjo aktivnosti kaspaze-3 smo izmerili pri koncentraciji pigmenta 1,6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , in je bila za več kot 2,5-krat višja od vrednosti v kontrolnem vzorcu. Pri najnižji koncentraciji pigmenta smo izmerili nekoliko nižjo stopnjo aktivnosti kaspaze-3, vendar še vedno višjo od kontrole.



**Slika 15:** Celice NS0 po 24-urni izpostavitvi etanolu in različnim koncentracijam pigmenta.

Celice so fotografirane pod invertnim mikroskopom pri povečavi 20x.

Legenda :

A: celice tretirane z etanolom (kontrola)

B: celice tretirane s pigmentom v koncentraciji 16 µg/ml

C: celice tretirane s pigmentom v koncentraciji 1,6 µg/ml

D: celice tretirane s pigmentom v koncentraciji 0,16 µg/ml.

Iz slike 15 je razvidno, da je pri celicah NS0 prišlo do krčenja celic, ki je najbolj očitno pri inkubaciji z najvišjo koncentracijo pigmenta. Morfološke spremembe na celicah nakazujejo na pojav celične smrti.

## 5 RAZPRAVA

Rdeči pigment bakterije *Vibrio* sp. sodi v skupino prodigiozinom podobnih spojin. Prodiginini, med katere uvrščamo tudi prodigiozin, so skupina tripirolnih rdečih bakterijskih pigmentov, ki so znani po številnih bioloških učinkih.

V diplomske nalogi smo se osredotočili na preučevanje citotoksičnega učinka rdečega pigmenta bakterije *Vibrio* sp. na mielomsko celično linijo NS0. Zanimalo nas je ali pigment vpliva na viabilnost celic in če, v kakšnih koncentracijah. Zanimalo nas je tudi, ali je delovanje pigmenta odvisno od časa izpostavljenosti celic.

Številne študije poročajo, da je mehanizem citotoksičnega delovanja prodigininov sprožanje programirane celične smrti oz. apoptoze. Ali rdeči pigment bakterije *Vibrio* sp. inducira apoptizo preko aktivacije kaspaze-3, ene izmed glavnih izvrševalnih proteaz apoptotičnega procesa, smo preverili z določanjem njene aktivnosti.

### 5.1 CITOTOKSIČNOST RDEČEGA PIGMENTA BAKTERIJE *Vibrio* sp.

Citotoksično delovanje rdečega pigmenta bakterije *Vibrio* sp. smo preučevali z metodo barvanja celic z barvilm tripan modro in z metodo XTT. Rezultati obeh testov so pokazali, da rdeči pigment bakterije *Vibrio* sp. povzroča upad števila živih celic in da je takšen učinek odvisen od koncentracije pigmenta in časa inkubacije (slike: 8, 11).

Štetje celic z barvilm tripan modro je enostavna in hitra metoda, katere negativne strani so subjektivnost in možnost napak pri samem delu (napake pri pipetiranju, neenakomernost resuspendiranja), kar lahko privede do napačnih rezultatov. Celice, ki so v procesu programirane celične smrti skoraj do samega konca apoptotičnega procesa vzdržujejo integriteto svoje membrane in zaradi tega ne absorbirajo barvila. Pri določanju števila živih celic z metodo štetja smo opazili precejšnje razlike med rezultati posameznih meritev. Med celicami, ki so bile izpostavljene različnim koncentracijam pigmenta, posebej po daljšem času inkubacije, smo težko razlikovali žive od mrtvih. Določene celice, ki niso sprejele barvila, in smo jih zaradi tega šteli med žive, so glede na morfološke spremembe, kot je krčenje celic, že nakazovale, da so v procesu apoptoze. S tem lahko tudi razložimo zakaj smo pri testu štetja dobili nekoliko višje vrednosti koncentracije živih celic kot pri testu

XTT. Metodo štetja smo predvsem uporabili kot referenco, s katero smo določili trend znižanja celične viabilnosti, ki je bil odvisen tako od koncentracije pigmenta kot tudi od časa inkubacije.

Študij citotoksičnosti rdečega pigmenta bakterije *Vibrio* sp. smo nadaljevali z bolj zanesljivo, kvantitativno spektroskopsko metodo XTT. Dokazali smo podoben citotoksičen učinek pigmenta.

Po štiri urni inkubaciji smo opazili upad viabilnosti celic pri vseh vzorcih. Rezultati se skladajo z rezultati študije Montanerja in sod. (21), ki so s pomočjo metode MTT pokazali, da štiri urna izpostavitev prodigiozinu v koncentraciji 1-10 µg/ml, izoliranem iz bakterije *S. marcescens*, povzroča hiter upad viabilnosti več različnih hematopoetskih tumorskih celičnih linij.

Pri najvišji koncentraciji pigmenta (160 µg/ml) po štiri urni inkubaciji ni več presnovne aktivnosti celic. Iz tega lahko sklepamo, da je takšna koncentracija pigmenta toksična za vse celice (slika 11, A). Zanimiv podatek je, da je imela najnižja koncentracija pigmenta (0,16 µg/ml) močnejši citotoksičen učinek kot 10-krat večja koncentracija. Ena od možnih razlag je, da celice ob prisotnosti manj koncentriranih raztopin pigmenta, in s tem manjšega citotoksičnega učinka, povečajo svoj metabolizem in s tem skušajo prevladati toksično delovanje pigmenta. Po drugi strani, podoben učinek najnižje koncentracije pigmenta smo opazili tudi pri metodi štetja s tripan modrim.

V nadaljevanju smo celično viabilnost preverjali po 24-urni inkubaciji. Pri najnižji koncentraciji pigmenta (0,16 µg/ml) je prišlo do zvišanja števila živih celic v primerjavi s 4-urno inkubacijo, kar pomeni, da ta koncentracija ni vplivala na razmnoževanje celic. Stokrat večja koncentracija (16 µg/ml) pigmenta je bila po 24-urni inkubaciji toksična za večino celic (slika 11, B). Dobljeni rezultati kažejo, da učinek raztopin pigmenta ni odvisen le od koncentracije, ampak tudi od časa inkubacije.

Po 48-urni inkubaciji je prišlo do upada celične viabilnosti tako pri kontroli kot tudi pri vzorcih, tretiranih z raztopinami pigmenta (slika 11, C). Takšen rezultat je bil pričakovani, glede na dejstvo, da je odmiranje celic verjetno deloma posledica pomanjkanja hranilnih snovi.

Naši rezultati se ujemajo z rezultati podobnih raziskav. Negativni vplivi prodigininov na viabilnost številnih rakavih celičnih linij, določeni z metodo MTT so podani v preglednici I (podpoglavje 1.2.2.1).

## 5.2 MERJENJE AKTIVNOSTI KASPAZE-3

Aktivnost kaspaze-3 smo določili s pomočjo reagenčnega kompleta APOPCYTO Caspase-3 Colorimetric Assay. Komplet omogoča spektrofotometrično določitev koncentracije obarvanega produkta iz substrata, ki ga specifično cepi kaspaza-3.

Glede na morfološke spremembe celic, ki smo jih opazili pri določanju števila živih celic s tripan modrim, in na rezultate številnih študij, ki poročajo o apoptotičnem učinku prodigininov, smo pričakovali, da bomo tudi pri naših vzorcih dobili pozitivne rezultate apoptotičnega testa. Aktivnost kaspaze-3 smo določali po 24-urni inkubacij celic z tremi koncentracijami pigmenta (0,16-16 µg/ml).

Naši rezultati so pokazali, da je rdeči pigment bakterije *Vibrio* sp. induciral apoptozo v celicah NS0. Pri celicah, tretiranih s pigmentom v koncentraciji 16 µg/ml nismo zasledili aktivnost kaspaze-3. Takšen rezultat je bil pričakovani, saj je pri teh celicah do aktivacije kaspaze-3 in nadalnjih korakov, ki jih ta kaspaza sproži in peljejo v nastanek apoptotskih teles, razgradnjo kromosomske DNA in razkroj celične membrane verjetno prišlo že pred potekom 24-urne inkubacije. Ker je kaspaza-3 aktivna le v pozni fazи apoptoze in po tem ne več, njene aktivnosti nismo zasledili.

Najvišjo aktivnost kaspaze smo določili pri celicah, tretiranih s pigmentom v koncentraciji 1,6 µg/ml. Pomeni, da je število celic v pozni fazи apoptoze najvišje prav pri tej koncentraciji pigmenta in času inkubacije 24 h. To trditev dodatno podkrepi podatek, da kaže 10-krat bolj redčena raztopina pigmenta skoraj 2-krat nižjo aktivnost kaspaze-3, vendar še vedno višjo od kontrole. Kspazno aktivnost, ki smo jo določili pri kontroli, lahko pripisemo dejству, da je apoptoza v določeni meri prisotna tudi pri celicah v optimalnih pogojih rasti, saj omogoča vzdrževanje homeostaze organizmov.

Podatki o aktivnosti kaspaze-3 v celicah NS0, ki smo jih tretirali z različnimi koncentracijami pigmenta nakazujejo, da je število celic, v katerih se je sprožila apoptoza, odvisno od koncentracije pigmenta.

## 6 SKLEPI

Namen diplomskega dela je bil določiti, ali rdeči pigment bakterije *Vibrio* sp. deluje citotoksično na transformirano mišjo mielomsko celično linijo.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko sklepamo da:

- rdeči pigment bakterije *Vibrio* sp. povzroča upad celične viabilnosti, ki smo ga dokazali z uporabo dveh metod: s štetjem celic barvanih s tripanskim modrilom in določanjem presnovne aktivnosti po dodajanju reagenta XTT.
- citotoksični učinek pigmenta je odvisen od njegove koncentracije in časa inkubacije.
- mehanizem citotoksičnega delovanja pigmenta je sprožanje apoptoze po poti aktivacije kaspaze-3, kar smo dokazali z določanjem aktivnosti kaspaze-3, osrednje kaspaze apoptotičnega procesa.

Zaradi določanja selektivne citotoksičnosti, v prihodnosti bi bilo smiselno preučiti vpliv pigmenta na primarne celične linije in ga primerjati z rezultati, pridobljenimi na malignih celičnih linijah. Prav tako je potrebno določiti natančen mehanizem apoptotičnega delovanja pigmenta.

## 7 LITERATURA

1. <http://dx.doi.org/10.2225/vol13-issue5-fulltext-7>
2. Davidson Bradley S: New dimensions in natural products research: cultured marine microorganisms. Current Opinion in Biotechnology 1995; 6: 284-29.
3. Gnezda-Meijer K, Mahne I, Poljšak-Prijatelj M, Stopar D: Host physiological status determines phage-like particle distribution in the lysate. FEMS Microbiol Ecol 2006; 55: 136-145.
4. Borić M: Razvoj nove metode za merjenje viskoznosti v mikrobiologiji. Diplomsko delo, Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2009
5. Danevčić Tjaša: Vpliv slanosti na energetski metabolizem pri bakteriji *Vibrio* sp. Doktorska disertacija, Ljubljana, Biotehniška fakulteta, 2006
6. Starič N, Danevčić T, Stopar D: *Vibrio* sp. DSM 14379 pigment production-a competitive advantage in the environment? Microb Ecol 2010; 60: 592-598.
7. Williamson RN, Fineran CP, Gristwood T, Chawrai RS, Leeper JF, Salmond PC G: Anticancer and immunosuppressive properties of bacterial prodiginines. Future Microbiol. 2007; 2(6): 605-618.
8. Starič N: Vpliv okoljskih faktorjev na produkcijo barvila naravnega izolata *Vibrio* sp. Diplomsko delo, Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2007.
9. Bennett JW, Bentley R: Seeing red: the stroy of prodigiosin. Adv Appl Microbiol 2000; 47: 1-32.
10. Williamson RN, Fineran CP, Leeper JF, Salmond PC G: The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. Nat Rev Microbiol 2006; 4(12): 887-899.
11. Montaner B, Pérez-Tomás R: The prodigiosins: a new family of anticancer drugs. Curr Cancer Drug targets 2003; 3(1): 57-65.

12. Fürstner A: Chemistry and biology of roseophilin and the prodigiosin alkaloids: a survey of the last 2500 years. *Angew Chem Int Ed Engl* 2003; 42(31): 3582-3603.
13. D'Alessio R, Bargiotti A, Carlini O, Colotta F, Ferrari M, Gnocchi P, Isetta A, Mongelli N, Motta P, Rossi A, Rossi M, Tibolla M, Vanotti E: Synthesis and immunosuppressive activity of novel prodigiosin derivates. *J Med Chem* 2000 43(13): 2557-2565.
14. La JQ, Michaelides AA, Manderville RA: Tautomeric equilibria in phenolic A-ring derivatives of prodigiosin natural products. *J Phys Chem B* 2007; 111(40): 11803-11811.
15. Pérez-Tomás R, Montaner B, Llagostera E, Soto-Cerrato V: The prodigiosins, proapoptotic drugs with anticancer properties. *Biochem Pharmacol* 2003; 66(8): 1447-1452.
16. Isaka M, Jaturapat A, Kramyu J, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y: Potent in vitro antimalarial activity of metacycloprodigiosin isolated from *Streptomyces spectabilis* BCC 4785. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(4): 1112-1113.
17. Štraser A: Opis lastnosti rdečega pigmenta iz naravnega izolata bakterije *Vibrio* sp. Diplomsko delo, Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2008.
18. Soto-Cerrato V, Viñals F, Lambert JR, Pérez-Tomás R: The anticancer agent prodigiosin induces p21WAF1/CIP1 expression via transforming growth factor-beta receptor pathway. *Biochem Pharmacol* 2007; 74(9): 1340-1349.
19. Pandley R, Chander R, Sainis KB: Prodigiosins as anti cancer agents: living upto their name. *Curr Pharm Des* 2009; 15(7): 732-741.
20. Nakashima T, Tamura T, Kurachi M, Yamaguchi K, Oda T: Apoptosis-mediated cytotoxicity of prodigiosin-like red pigment produced by gamma-Proteobacterium and its multiple bioactivities. *Biol Pharm Bull* 2005; 28(12): 2289-2295.

21. Montaner B, Navarro S, Piqué M, Vilaseca M, Martinell M, Giralt E, Gil J, Pérez-Tomás R: Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in hematopoietic cancer cell lines. *Br J Pharmacol* 2000; 131(3): 585-593.
22. Montaner B, Pérez-Tomás R: Prodigiosin-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Life Sci* 2001; 68(17): 2025-2036.
23. Campàs C, Dalmau M, Montaner B, Barragán M, Bellosillo B, Colomer D, Pons G, Pérez-Tomás R, Gil J: Prodigiosin induces apoptosis of B and T cells from B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2003; 17(4): 746-750.
24. Francisco R, Pérez-Tomás R, Giménez-Bonafé P, Soto-Cerrato V, Giménez-Xavier P, Ambrosio S: Mechanisms of prodigiosin cytotoxicity in human neuroblastoma cell lines. *Eur J Pharmacol* 2007; 572(2-3): 111-119.
25. Yamamoto D, Kiyozuka Y, Uemura Y, Yamamoto C, Takemoto H, Hirata H, Tanaka K, Hioki K, Tsubura A: Cycloprodigiosin hydrochloride, a H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> symporter, induces apoptosis in human breast cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126(4): 191-197.
26. Deorukhkar AA, Chander R, Pandey R, Sainis KB: A novel N-alkylated prodigiosin analogue induced death in tumour cell trough apoptosis or necrosis depending upon the cell type. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; 61(3): 355-363.
27. Zhou W, Jin ZX, Wan YJ: Apoptosis of human lung adenocarcinoma A549 cells induced by prodigiosin analogue obtained from an entomopathogenic bacterium *Serratia marcescens*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; 88(6): 1269-1275.
28. Soto-Cerrato V, Llagostera E, Montaner B, Scheffer GL, Perez-Tomas R: Mitochondria-mediated apoptosis operating irrespective of multidrug resistance in breast cancer cells by the anticancer agent prodigiosin. *Biochem Pharmacol* 2004 68(7): 1345-1352.
29. Llagostera E, Soto-Cerrato V, Montaner B, Pérez-Tomás R: Prodigiosin induces apoptosis by acting on mitochondria in human lung cancer cells. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1010: 178-181.

30. <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm>
31. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR: The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 2001; 92(1): 57-70.
32. Pižem J, Cör A: Kaspaze. *Med Razgl* 2001; 40: 283-291.
33. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN: Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol* 2005; 84(10): 627-639.
34. Nuñez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N: Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 1998; 17: 3237-3245.
35. Fischer U, Jänicke RU, Schulze-Osthoff K: Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 2003 10(1): 76-100.
36. [www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash](http://www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash)
37. Vidic I, Šuput D, Milisav I: Modulatorji apoptoze kot nova zdravila. *Farm vestn* 2006; 57: 150-154.
38. Frederik HI, Krammer PH: Death and anti-death resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2: 277-288.
39. Montaner B, Perez-Tomas R: Prodigiosin induces caspase-9 and caspase-8 activation and cytochrome C release in Jurkat T cells. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 973: 246-249.
40. Soto-Cerrato V, Viñals F, Lambert JR, Kelly JA, Pérez-Tomás R: Prodigiosin induces the proapoptotic gene NAG-1 via glycogen synthase kinase-3 beta activity in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2007; 6(1): 362-369.
41. Yamamoto C, Takemoto H, Kuno K, Yamamoto D, Nakai K, Baden T, Kamata K, Hirata H, Watanabe T, Inoue K: Cycloprodigiosin hydrochloride, a H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> symporter, induces apoptosis in human colon cancer cell lines in vitro. *Oncol Rep* 2001; 8(4): 821-824.

42. Yamamoto D, Uemura Y, Tanaka K, Nakai K, Yamamoto C, Takemoto H, Kamata K, Hirata H, Hioki K: Cycloprodigiosin hydrochloride, H(+)/CL(-) symporter, induces apoptosis and differentiation in HL-60 cells. *Int J Cancer* 2000; 88(1): 121-128.
43. Manderville RA: Synthesis, proton-affinity and anti-cancer properties of the prodigiosin-group natural products. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2001; 1(2): 195-218.
44. Melvin MS, Wooton KE, Rich CC, Saluta GR, Kucera GL, Lindquist N, Manderville RA: Copper-nuclease efficiency correlates with cytotoxicity for the 4-methoxypyrolic natural products. *J Inorg Biochem* 2001; 87(3): 129-135.

## Priloga

PRILOGA A: Rezultati štetja živih celič z barvilkom tripan modro pri času inkubacije a) 4 h; b) 24 h; c) 48 h

a) 4 h

| t= 4h        | P1 | P2  | P3  | P4 | K1  | K2  | K3  | K4  |
|--------------|----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|
| 1. ponovitev | 0  | 79  | 96  | 94 | 92  | 94  | 69  | 93  |
| 2. ponovitev | 0  | 107 | 105 | 63 | 73  | 80  | 61  | 95  |
| 3. ponovitev | 0  | 62  | 115 | 52 | 104 | 82  | 109 | 100 |
| 4 .ponovitev | 0  | 46  | 60  | 62 | 102 | 63  | 136 | 152 |
| 5. ponovitev | 0  | 45  | 47  | 60 | 70  | 78  | 46  | 188 |
| 6. ponovitev | 0  | 23  | 63  | 50 | 68  | 116 | 76  | 124 |
| 7. ponovitev | 3  | 28  | 44  | 45 | 144 | 168 | 124 | 84  |
| 8. ponovitev | 0  | 29  | 44  | 34 | 80  | 84  | 108 | 160 |

b) 24 h

| t= 24h       | P1 | P2 | P3  | P4  | K1  | K2  | K3  | K4 |
|--------------|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| 1. ponovitev | 0  | 0  | 112 | 157 | 75  | 69  | 49  | 87 |
| 2. ponovitev | 0  | 0  | 125 | 85  | 96  | 59  | 94  | 70 |
| 3. ponovitev | 0  | 0  | 92  | 148 | 114 | 84  | 127 | 87 |
| 4 .ponovitev | 0  | 0  | 13  | 47  | 45  | 38  | 57  | 49 |
| 5. ponovitev | 0  | 0  | 21  | 37  | 41  | 48  | 46  | 76 |
| 6. ponovitev | 0  | 0  | 20  | 47  | 59  | 140 | 56  | 36 |
| 7. ponovitev | 0  | 0  | 72  | 61  | 68  | 54  | 88  | 78 |
| 8. ponovitev | 2  | 2  | 60  | 88  | 74  | 87  | 128 | 50 |
| 9. ponovitev | 0  | 2  | 40  | 104 | 70  | 110 | 70  | 98 |

c) 48 h

| t= 48h       | P1 | P2 | P3 | P4 | K1  | K2  | K3  | K4  |
|--------------|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|
| 1. ponovitev | 0  | 0  | 9  | 31 | 73  | 65  | 113 | 43  |
| 2. ponovitev | 0  | 0  | 5  | 25 | 90  | 101 |     | 132 |
| 3. ponovitev | 0  | 0  | 3  | 26 | 82  | 91  | 104 | 120 |
| 4 .ponovitev | 0  | 0  | 1  | 46 | 40  | 36  | 102 | 38  |
| 5. ponovitev | 0  | 0  | 2  | 41 | 49  | 48  | 28  | 40  |
| 6. ponovitev | 0  | 0  | 1  | 37 | 38  | 34  | 33  | 34  |
| 7. ponovitev | 0  | 0  | 0  | 45 | 68  | 14  | 34  | 44  |
| 8. ponovitev | 0  | 0  | 4  | 43 | 60  | 37  | 36  | 91  |
| 9. ponovitev | 0  | 0  | 6  | 43 | 104 | 83  | 56  | 104 |

Legenda :

P1- raztopina pigmenta s koncentracijo 160 µg/ml

P2- raztopina pigmenta s koncentracijo 16 µg/ml

P3- raztopina pigmenta s koncentracijo 1,6 µg/ml

P4- raztopina pigmenta s koncentracijo 0,16 µg/ml

K1- 9,6 % etanol

K2- 0,96 % etanol

K3- 0,096 % etanol

K4- 0,0096 % etanol

## PRILOGA B: Test XTT

### Priloga 1B: Podatki za umeritveno premico na sliki 10

| c x 10 <sup>5</sup> (št.celic/ml) | 1.ponovitev | 2.ponovitev | 3.ponovitev | 4.ponovitev | povp. absorbanc | povp. A - sl. <sup>1</sup> |
|-----------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------------|----------------------------|
| 5,00                              | 1,48        | 1,28        | 1,54        | 1,32        | 1,40            | 1,25                       |
| 2,50                              | 0,69        | 0,77        | 0,58        | 0,59        | 0,66            | 0,50                       |
| 1,25                              | 0,30        | 0,35        | 0,38        | 0,33        | 0,34            | 0,18                       |
| 0,63                              | 0,15        | 0,16        | 0,30        | 0,29        | 0,23            | 0,07                       |
| 0,31                              | 0,14        | 0,14        | 0,27        | 0,29        | 0,21            | 0,05                       |
| 0,16                              | 0,11        | 0,11        | 0,25        | 0,27        | 0,18            | 0,03                       |
| 0,08                              | 0,09        | 0,10        | 0,27        | 0,24        | 0,18            | 0,02                       |
| 0,00                              | 0,07        | 0,09        | 0,24        | 0,23        | 0,16            |                            |

<sup>1</sup> – minus slepa

### Priloga 2B: Rezultati testa XTT. Merjenje absorbance pri času inkubacije a) 4 h; b) 24 h; c) 48 h.

a) 4 h

| t= 4h         | P1   | P2   | P2   | P4   | K1   | K2   | K3   | K4   |
|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1. ponovitev  | 0,00 | 0,04 | 0,57 | 0,36 | 0,92 | 0,77 | 1,08 | 0,87 |
| 2. ponovitev  | 0,19 | 0,17 | 0,46 | 0,38 | 0,52 | 0,98 | 1,00 | 1,06 |
| 3. ponovitev  | 0,00 | 0,26 | 0,50 | 0,42 | 0,48 | 0,82 | 1,11 | 1,06 |
| 4. ponovitev  | 0,00 | 0,20 | 0,42 | 0,23 | 0,35 | 0,32 | 0,33 | 0,30 |
| 5. ponovitev  | 0,00 | 0,37 | 0,62 | 0,37 | 0,54 | 0,76 | 0,62 | 0,52 |
| 6. ponovitev  | 0,00 | 0,14 | 0,18 | 0,15 | 0,35 | 0,37 | 0,41 | 0,34 |
| 7. ponovitev  | 0,00 | 0,29 | 0,62 | 0,16 | 0,36 | 0,42 | 1,14 | 0,64 |
| 8. ponovitev  | 0,00 | 0,22 | 0,40 | 0,16 | 0,35 | 0,39 | 0,77 | 0,49 |
| 9. ponovitev  | 0,00 | 0,30 | 0,40 | 0,39 | 0,60 | 0,66 | 0,55 | 0,95 |
| 10. ponovitev | 0,00 | 0,44 | 0,66 | 0,91 | 0,94 | 1,70 | 1,27 | 1,35 |
| 11. ponovitev | 0,00 | 0,39 | 0,66 | 0,55 | 0,59 | 0,80 | 0,90 | 0,98 |

b) 24 h

| t= 24h        | P1   | P2   | P2   | P4   | K1   | K2   | K3   | K4   |
|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1. ponovitev  | 0,00 | 0,00 | 0,03 | 0,98 | 1,09 | 1,05 | 0,83 | 0,90 |
| 2. ponovitev  | 0,00 | 0,00 | 0,02 | 0,32 | 0,78 | 0,95 | 0,76 | 0,89 |
| 3. ponovitev  | 0,00 | 0,00 | 0,04 | 0,33 | 0,94 | 1,01 | 0,65 | 0,95 |
| 4. ponovitev  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,71 | 1,08 | 1,09 | 0,80 | 0,90 |
| 5. ponovitev  | 0,00 | 0,00 | 0,09 | 0,52 | 0,86 | 0,79 | 0,79 | 0,87 |
| 6. ponovitev  | 0,00 | 0,00 | 0,12 | 0,38 | 0,82 | 0,78 | 0,92 | 0,83 |
| 7. ponovitev  | 0,00 | 0,04 | 0,12 | 0,40 | 0,58 | 0,84 | 0,95 | 0,89 |
| 8. ponovitev  | 0,00 | 0,07 | 0,16 | 0,33 | 0,43 | 0,85 | 0,95 | 0,75 |
| 9. ponovitev  | 0,00 | 0,05 | 0,13 | 0,38 | 0,53 | 0,90 | 0,81 | 0,98 |
| 10. ponovitev | 0,00 | 0,00 | 0,05 | 0,27 | 0,96 | 0,78 | 0,71 | 1,06 |
| 11. ponovitev | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,41 | 0,31 | 1,14 | 1,02 | 0,93 |
| 12. ponovitev | 0,00 | 0,00 | 0,12 | 0,16 | 0,39 | 0,67 | 0,73 | 0,98 |

c) 48 h

| t= 48h        | P1   | P2   | P3   | P4   | K1   | K2   | K3   | K4   |
|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1. ponovitev  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,29 | 0,24 | 0,29 | 0,44 | 0,42 |
| 2. ponovitev  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,42 | 0,24 | 0,50 | 0,25 | 0,32 |
| 3. ponovitev  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,43 | 0,34 | 0,18 | 0,21 | 0,29 |
| 4. ponovitev  | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,21 | 0,33 | 0,59 | 0,48 | 0,75 |
| 5. ponovitev  | 0,00 | 0,00 | 0,03 | 0,28 | 0,34 | 0,76 | 0,55 | 0,63 |
| 6. ponovitev  | 0,00 | 0,00 | 0,04 | 0,37 | 0,44 | 0,74 | 0,55 | 0,44 |
| 7. ponovitev  | 0,00 | 0,03 | 0,02 | 0,16 | 0,38 | 0,40 | 0,45 | 0,49 |
| 8. ponovitev  | 0,00 | 0,09 | 0,08 | 0,21 | 0,43 | 0,44 | 0,44 | 0,44 |
| 9. ponovitev  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,11 | 0,36 | 0,28 | 0,39 | 0,43 |
| 10. ponovitev | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,02 | 0,28 | 0,37 | 0,35 | 0,39 |
| 11. ponovitev | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,16 | 0,26 | 0,26 | 0,22 | 0,30 |

Legenda:

P1- raztopina pigmenta s koncentracijo 160 µg/ml

P2- raztopina pigmenta s koncentracijo 16 µg/ml

P3- raztopina pigmenta s koncentracijo 1,6 µg/ml

P4- raztopina pigmenta s koncentracijo 0,16 µg/ml

K1- 9,6 % etanol

K2- 0,96 % etanol

K3- 0,096 % etanol

K4- 0,0096 % etanol

PRILOGA C: Merjenje aktivnosti kaspaze-3.

**Priloga 1C:** Podatki za umeritveno premico na sliki 15

| konzentracija pNA (mikroM) | 1.ponovitev | 2.ponovitev | 3.ponovitev | 4.ponovitev | povp. absorbanc |
|----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------------|
| 500,00                     | 1,32        | 1,94        | 1,14        | 0,83        | 1,31            |
| 250,00                     | 0,67        | 0,69        | 0,52        | 0,47        | 0,59            |
| 125,00                     | 0,27        | 0,24        | 0,24        | 0,23        | 0,24            |
| 62,50                      | 0,17        | 0,19        | 0,14        | 0,12        | 0,15            |
| 31,25                      | 0,09        | 0,11        | 0,07        | 0,07        | 0,08            |
| 15,63                      | 0,05        | 0,04        | 0,04        | 0,03        | 0,04            |
| 0,00                       | 0,03        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,01            |

**Priloga 2C:** Rezultati absorbanc pri testu merjenja aktivnosti kaspaze-3

| t= 24h       | P1   | P2   | P3   | K1   | K2   | K3   |
|--------------|------|------|------|------|------|------|
| 1.ponovitev  | 0,00 | 0,17 | 0,08 | 0,06 | 0,07 | 0,04 |
| 2.ponovitev  | 0,00 | 0,17 | 0,08 | 0,06 | 0,06 | 0,05 |
| 3. ponovitev | 0,00 | 0,15 | 0,08 | 0,06 | 0,07 | 0,05 |
| 4. ponovitev | 0,00 | 0,14 | 0,08 | 0,06 | 0,07 | 0,05 |
| 5.ponovitev  | 0,01 | 0,14 | 0,08 | 0,06 | 0,06 | 0,05 |
| 6.ponovitev  |      | 0,14 | 0,07 | 0,04 | 0,05 | 0,05 |
| A - ozadje   | 0,00 | 0,13 | 0,06 | 0,04 | 0,05 | 0,03 |

Legenda:

P1- raztopina pigmenta s koncentracijo  $16 \mu\text{ml}$

P2- raztopina pigmenta s koncentracijo  $1,6 \mu\text{ml}$

P3- raztopina pigmenta s koncentracijo  $0,16 \mu\text{ml}$

K1- 0,96 % etanol

K2- 0,096 % etanol

K3- 0,0096 % etanol