

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



ŽIGA URLEP

VREDNOTENJE CITOTOKSIČNIH UČINKOV
ACILHIDRAZIDNIH IN SULFONOHIDRAZIDNIH
ZAVIRALCEV SERINSKIH PROTEAZ

EVALUATION OF CYTOTOXIC EFFECTS OF ACYL
HYDRAZIDE AND SULPHONO HYDRAZIDE SERINE
PROTEASE INHIBITORS

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo sem opravljal samostojno na Fakulteti za farmacijo na Katedri za klinično biokemijo pod mentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič-Raščan, mag. farm.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici, prof. dr. Ireni Mlinarič-Raščan, mag. farm., za strokovne nasvete pri opravljanju diplomskega dela. Prav tako se zahvaljujem tudi Martini Gobec, mag. farm., za praktične nasvete pri opravljanju raziskovalnega dela, za potrpežljivost pri učenju in nabiranju izkušenj, za odgovore na številna vprašanja, ki mi niso dala miru, ter za moralno podporo, ko stvari niso šle po načrtu. Nenazadnje pa se zahvaljujem tudi domačim, prijateljem in puncim za podporo ob delu in za sprostitev, ko sem jo potreboval.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelal samostojno pod mentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič-Raščan, mag. farm.

Ljubljana, september 2012

Žiga Urlep

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Aleš Obreza, mag. farm.

Mentorica: prof. dr. Irena Mlinarič-Raščan, mag. farm.

Članica diplomske komisije: asist. dr. Mirjam Gosenc, mag. farm.

Vsebina

1	Povzetek.....	5
2	Abstract.....	6
3	Seznam okrajšav	7
4	Uvod	8
4.1	Hematološke maligne bolezni	8
4.1.1	Levkemije	8
4.1.2	Limfomi	9
4.2	Proteaze	11
4.2.1	Vloge proteaz pri raku	11
4.2.2	Zaviralci proteaz	12
4.2.3	Serinske proteaze	13
4.3	Celična smrt.....	16
4.3.1	Nekroza.....	16
4.3.2	Apoptoza.....	16
4.4	Signalizacija NF- κ B	20
4.4.1	Mehanizem aktivacije NF- κ B.....	21
4.4.2	NF- κ B v onkogenezi.....	22
4.5	Evkariontski faktor podaljševanja 1- α (eEF1A).....	23
5	Namen.....	24
6	Materiali in metode.....	25
6.1	Materiali.....	25
6.1.1	Kemikalije in reagenti	25
6.1.2	Pufri in raztopine	26
6.1.3	Laboratorijska oprema	28
6.2	Metode	30
6.2.1	Celične kulture.....	30
6.2.2	Test MTS	31
6.2.3	Analiza celičnega cikla.....	32
6.2.4	Test aneksin V/7-AAD	32
6.2.5	Izolacija in merjenje koncentracije proteinov	33
6.2.6	Merjenje aktivnosti kaspaz-3/-7	34
6.2.7	Prenos po Westernu	34

6.2.8	Test Quanti-Blue™	35
6.2.9	2D-elektroforeza	36
6.2.10	Statistična analiza	37
7	Rezultati in razprava	38
7.1	Vrednotenje citotoksičnega učinka zaviralcev serinskih proteaz	38
7.2	Selektivna toksičnost proti celicam iz Burkittovega limfoma	43
7.3	Zmanjšana presnovna aktivnost celic kot posledica povečane smrtnosti	45
7.4	Zaviralci serinskih proteaz sprožijo od kaspaz odvisno apoptozo	46
7.5	Vpliv na aktivacijo signalne poti NF- κ B	49
7.6	Povečano izražanje eEF1A1 po tretiranju z izbrano spojino	51
8	Sklep	53
9	Literatura	55

1 Povzetek

Modulacija celične smrti je obetaven terapevtski pristop pri mnogih bolezenskih stanjih, na primer pri rakavih obolenjih. Predhodno je bilo ugotovljeno, da azafenilalaninski zaviralci serinskih proteaz sprožijo od kaspaz odvisno apoptozo na linijah B-celičnega limfoma. Pri našem raziskovalnem delu smo ovrednotili 23 spojin z acilhidrazidno in sulfonohidrazidno strukturo, ki so bile sintetizirane z modifikacijo prve generacije azafenilalaninskih zaviralcev serinskih proteaz. V prvem delu smo s testom presnovne aktivnosti MTS ovrednotili citotoksični učinek spojin na celični liniji Ramos. Izbrane spojine smo nadalje ovrednotili s testom MTS na drugih levkemičnih/limfomskih celičnih linijah. Ugotovili smo, da sta dve spojini selektivno citotoksični za B-celice iz Burkittovega limfoma. Z analizo celičnega cikla na celicah Ramos smo potrdili, da je zmanjšana presnovna aktivnost celic ugotovljena s testom MTS posledica njihove smrti, opazili pa smo tudi zastoj celic v S-fazi cikla. V naslednjem koraku smo želeli s testom aneksin V/7-AAD ugotoviti mehanizem celične smrti. Rezultati so pokazali, da celice zapadejo v proces apoptoze. Gre za od kaspaz odvisno apoptozo, kar smo pokazali z merjenjem aktivnosti kaspaz-3/-7 in dokazom cepitve kaspaze-3 z metodo prenosa po Westernu. Ker signaliziranje preko NF- κ B sodeluje pri preprečevanju smrti v tumorskih celičnih linijah, smo preverili, če naše spojine vplivajo na omenjeno signalno pot. Z metodo prenosa po Westernu smo pokazali, da pride po tretiranju z našimi spojinami do kopičenja fosforiliranih oblik proteinov p105 in I κ B v celici, ki se ne razgradita v proteasomu. Prav tako smo na celicah Ramos-Blue™ s pomočjo testa Quanti-Blue™ pokazali, da predinkubacija celic z našima spojinama za skoraj trikrat zmanjša aktivnost NF- κ B ob stimulaciji z znanim aktivatorjem te poti, TNF α . V zadnjem delu smo z 2D-elektroforezo želeli ovrednotiti razliko v proteinskem profilu celic Ramos, tretiranih z izbrano spojino glede na kontrolne celice. Profila sta bila skoraj identična, prisotna je bila le razlika v proteinu z visoko vrednostjo izoelektrične točke. Protein smo izrezali in ga ovrednotili z analizo MALDI-TOF. Izkazalo se je, da gre za človeški faktor podaljševanja 1- α 1, ki je udeležen v številnih procesih v celici, vendar je v veliki meri še vedno neraziskan.

2 Abstract

Modulation of cell death is a promising new therapeutic approach in many diseases. It has previously been shown that azaphenylalanine-based serine protease inhibitors induce caspase-mediated apoptosis in cell lines derived from B-cell lymphoma. In our research, we tested 23 compounds built on acyl hydrazide and sulphonyl hydrazide scaffold, which are based on the first generation of azaphenylalanine-based serine protease inhibitors. In the first step, we used MTS assay to measure the cytotoxic effect of compounds on Ramos cells. Selected compounds were further tested using MTS assay in different leukemia or lymphoma derived cells. Two of the compounds were found to be selectively cytotoxic for B-cells derived from Burkitt's lymphoma. Using cell cycle analysis, we confirmed that the decrease in metabolic activity on Ramos cells observed in MTS assay was the result of increased cell mortality. We also noted an increase in the amount of cells in S-phase of the cell cycle. Our next step was to determine the mode of cell death using the Annexin V/7-AAD assay. By measuring the activity of caspase-3/-7 and by using Western blot analysis to show the cleavage of caspase-3 we confirmed that apoptosis was caspase-mediated. Because NF- κ B signalling is involved in the survival of tumor cells we investigated whether our compounds interfere with its pathway. Using Western blot analysis we showed that following treatment with selected compounds there is an increase in the amount of phosphorylated forms of proteins p105 and I κ B in cells, both of which are not subsequently degraded by proteasome. Likewise, using Quanti-Blue™ assay, we showed that the preincubation of Ramos-Blue™ cells with our compounds lowers NF- κ B activity by almost threefold after stimulation with TNF α . Lastly, we used 2D-electrophoresis to evaluate the difference in protein expression in Ramos cells treated with selected compound compared to the untreated ones. The results were almost identical, with the exception of a protein with a high value of isoelectric point. The protein was evaluated using MALDI-TOF analysis. It was identified as eukaryotic elongation factor 1- α 1, which is involved in many cell functions, though as of yet remains largely unstudied.

3 Seznam okrajšav

AIF – apoptozo inducirajoči faktor

Apaf-1 – apoptozni proteazni aktivacijski faktor 1

Ap-1 – aktivatorski protein 1, transkripcijski faktor

ALL – akutna limfatična levkemija

AML – akutna mieloična levkemija

BCR – B-celični receptor

BFM – bromfenolno modro, indikator

CAD – od kaspaz odvisne DNaze (angl. caspase-activated DNase)

DEVD – zaporedje aminokislin Asp-Glu-Val-Asp

HtrA2 ali Omi – mitohondrijska serinska proteaza

I κ B – skupina proteinov, ki delujejo kot zaviralci NF- κ B

IKK – kinaza I κ B

KLL – kronična limfatična levkemija

KML – kronična mieloična levkemija

LPS – lipopolisaharid

NF- κ B – jedrni faktor κ -lahkoverižni ojačevalec aktiviranih B-celic (angl. nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells)

P50/p105 – protein NF- κ B1, p105 je prekurzor p50

P52/p100 – protein NF- κ B2, p100 je prekurzor p52

PARP – poli-ADP-riboza polimeraza

PBMC – periferne krvne enojedrne celice

Ph – kromosom Philadelphia

RANK – receptorski aktivator NF- κ B, iz TNF-družine receptorjev

SEAP – izločena embrionska alkalna fosfataza (angl. secreted embryonic alkaline phosphatase)

TIMP – tkivni zaviralec metaloproteaz

TNF – dejavnik tumorske nekroze (angl. tumor necrosis factor)

TNFR – receptor za dejavnik tumorske nekroze

TLCK – *N*- α -tozil-*L*-lizin klorometilketon

TPCK – *N*- α -tozil-*L*-fenilalanin klorometilketon

uPA – urokinazni aktivator plazminogena

4 Uvod

Maligne bolezni so v razvitem svetu drugi najpogostejši vzrok smrti, takoj za srčno-žilnimi boleznimi. Po ocenah naj bi v času življenja skoraj tretjina populacije zbolela za rakom. Potrebe po novih protitumorskih zdravilih in učinkovitejših terapijah so zato vedno večje. V diplomski nalogi smo ovrednotili skupino zaviralcev serinskih proteaz, ki so selektivno citotoksični za limfocite B iz Burkittovega limfoma (1).

4.1 Hematološke maligne bolezni

Levkemije, limfomi in multipli mielom so maligne bolezni mieloidnega in limfoidnega sistema. Etiologija teh bolezni je po večini še vedno nepojasnjena, pri nekaterih primerih pa so dokazali, da so posledica sevanja, virusnih obolenj (HTLV-1), toksičnih snovi (protitumorska zdravila, benzen) in/ali imunosupresivov. Bolezen se kaže z eno ali več molekularnimi abnormalnostmi, prav tako pa so pri nekaterih levkemijah in limfomih našli tudi nenaključne spremembe v kromosomih (1).

4.1.1 Levkemije

Levkemije so redke rakaste novotvorbe krvotvornega tkiva, katerih značilnost je kopičenje enega klona nenormalnih in nefunkcionalnih belih krvnih celic v kostnem mozgu in krvi. Lahko se delijo, vendar pa nimajo sposobnosti dozorevanja in niso funkcionalne. Po razvojni stopnji levkemičnih celic in hitrosti poteka bolezni jih delimo na akutne in kronične, po vrsti celic pa na limfatične in mieloične (2, 3).

Akutne levkemije predstavljajo 10 % vseh malignih bolezni pri ljudeh in so najpogostejša maligna bolezen pri otrocih. Večina akutnih limfatičnih levkemij (ALL) je B-celičnih. Zanje so značilne spremembe na genetskem nivoju, ki povzročijo motnje v homeostazi rasti in dozorevanju krvotvornih celic. Primer take spremembe je kromosom Philadelphia (Ph), kjer pride do recipročne translokacije delov kromosomov 9 in 22, $t(9;22)(q34;q11)$, in tvorbe fuzijskega proteina Bcr-Abl, ki ima tirozin kinazno aktivnost. Posledice tega so povečana proliferacija, zmanjšana pritrditev na stromo ter zaviranje apoptoze. Prisotne so lahko tudi druge translokacije: $t(4;11)$, ki kodira fuzijski protein MLL-AF4, $t(1;19)$, ki kodira fuzijski protein E2A/PBX1, in $t(12;21)$, ki kodira fuzijski protein TEL/AML1. Tudi za akutne mieloične levkemije (AML) so značilne genetske spremembe, kot na primer translokacija $t(8;21)$ in tvorba fuzijskega proteina AML1/ETO ali pa Downov sindrom (trisomija kromosoma 21), ki pri otrocih za 14-krat poveča

verjetnost razvoja AML. Za akutne levkemije so značilni različni celični označevalci, ki jih izkoriščamo pri postavljanju diagnoze. Za ALL sta značilna CALLA oz. CD10 antigen in CD19, za AML pa CD33 in CD13 (1, 3, 4).

Kronične levkemije so kronično potekajoče klonske bolezni in so značilnejše za poznejše življenjsko obdobje. Kronična limfatična levkemija (KLL) je večinoma posledica nekontroliranega razraščanja limfocitov B, ki se kopičijo v kostnem mozgu ter prehajajo v kri in limfatične organe. Prisotne so lahko kromosomske spremembe, predvsem trisomija kromosoma 12, delecija 13q ali delecija 11q. Pri kronični mieloični levkemiji (KML) je v več kot 90 % primerov prisoten kromosom Ph, kar nakazuje na pridobljeno bolezen. Z imunofenotipizacijo lahko pri kroničnih levkemijah določimo celične označevalce, in sicer so za B-celično KLL značilni CD19, CD23, CD5, CD20 in CD79b, izraženost površinskega monoklonskega IgM pa je slaba (1–4).

4.1.2 Limfomi

Limfomi so maligne limfoproliferativne bolezni, za katere je značilen trajen, samostojen in ireverzibilen razrast celic limfocitne vrste. Po pogostosti so peta najpogostejša maligna bolezen, prevladujejo pa v odrasli dobi. V splošnem jih delimo v dve skupini, Hodgkinov limfom (Hodgkinova bolezen), ki je manj pogost in predstavlja 15 % vseh limfomov, in Nehodgkinovi limfomi (4, 5).

Hodgkinov limfom je maligna novotvorba limfatičnega tkiva s progresivnim potekom, ki je v večini primerov B-limfocitnega izvora. Na nastanek bolezni lahko vpliva predhodna okužba z EBV. Od Nehodgkinovih limfomov ga razlikujemo po prisotnosti večjedrnih Reed-Sternbergovih celic. Večina teh celic izraža celična označevalca CD30 in CD15.

Nehodgkinovi limfomi so heterogena skupina malignih tumorjev, ki nastanejo zaradi trajnega, samostojnega razraščanja celic limfatičnega tkiva. Okoli 70 % Nehodgkinovih limfomov je B-limfocitnega izvora, preostali pa T-limfocitnega ali pa jih z imunofenotipizacijo ne moremo razvrstiti. Pojav bolezni je povezan z virusnimi okužbami, kot na primer EBV pri endemičnem Burkittovem limfomu v subsaharski Afriki, človeški T-celični limfotropni virus 1 (HTLV-1) pri T-celičnem limfomu, človeški virus herpes tipa 8 (HHV-8) pri primarnem efuzijskem limfomu limfomov ali virus HIV pri različnih drugih oblikah Nehodgkinovih limfomov. Za Nehodgkinove limfome so značilne številne translokacije. Najpogostejša je translokacija t(14;18), ki ima za posledico povečano

izražanje antiapoptotičnega proteina Bcl-2. Značilnejše translokacije so še t(8;14) in t(2;8) pri Burkittovem limfomu, t(11;14) pri limfomu plaščnih celic in t(3;4) pri difuznem B-celičnem limfomu. Za vse Nehodgkinove limfome B-celic je značilno izražanje celičnega označevalca CD20 in površinskih imunoglobulinov. Posamezni limfomi pa imajo tudi specifične označevalce, kot na primer CD10 pri folikularnem limfomu (1, 3, 4).

4.1.2.1 *Burkittov limfom*

Burkittov limfom je bil prvič opisan leta 1958 in ga uvrščamo med Nehodgkinove limfome. Je agresiven limfom B-celic, ki ga zaznamuje visoka stopnja proliferacije in deregulacija onkogenega *c-myc*. Ločimo tri klinično različne vrste Burkittovega limfoma. Daleč najpogostejša različica je endemični Burkittov limfom, ki se pojavlja na območjih ekvatorialne Afrike predvsem pri otrocih med četrtem in sedmim letom starosti. Sporadična različica se ponavadi izraža kot trebušni tumor brez značilne geografske razporeditve. Tretja različica je imunopomanjkljivi Burkittov limfom, ki ga ponavadi opazimo v kombinaciji z okužbo z virusom HIV. Bolezen je povezana z okužbo z virusom EBV, na razvoj pa vplivajo tudi drugi dejavniki. Med njimi je izpostavljena predvsem okužba z malarijo vrste *falciparum*. V 80 % primerov Burkittovega limfoma najdemo translokacijo t(8;14)(q24;q32). Omenjena mutacija povzroči translokacijo protoonkogenega *c-myc* s kromosoma 8 na mesto kromosoma 14, kjer se nahaja gen za težko verigo imunoglobulinov. V preostalih 20 % primerov je prisotna bodisi translokacija t(2;8)(p12;q24) bodisi t(8;22)(q24;q11), ki povzroči translokacijo gena *c-myc* zraven κ - ali λ -lahkih verig imunoglobulinov. Ker je v zrelih limfocitih B povečana transkripcija genov za lahke in težke verige imunoglobulinov, se v primeru translokacije poveča tudi prepis protoonkogenega *c-myc*. Povečano izražanje proteina c-Myc ima za posledico povečano celično proliferacijo in s tem večjo genomsko nestabilnost. Vzrok je v povečanem izražanju ciklinov A in E, prav tako pa se poveča funkcija od ciklina odvisnih kinaz. Večje je tudi izražanje nekaterih glikolitičnih encimov, kot je laktat dehidrogenaza A, kar zagotavlja tumorski celici dovolj energije za konstantno delitev. Aktivira pa se tudi telomeraza TERT, kar ima za posledico nesmrtnost celice. Nasprotno pa je bilo pokazano, da c-Myc sodeluje tudi pri indukciji apoptoze, verjetno preko poti Fas/APO-1 (4, 6, 7).

Klinično se Burkittov limfom izraža s povečanimi bezgavkami in nabreklih trebuhom ali čeljustjo, pogosto pride tudi do infiltracije kostnega mozga, kar se kaže z anemijo in trombocitopenijo. Celice Burkittovega limfoma izražajo površinske imunoglobuline in Bcl-6, celične označevalce CD19, CD20, CD22, CD10 in CD79a, ne pa

tudi CD5, CD23 in TdT. Zdravljenje Burkittovega limfoma se je v zadnjih letih spremenilo iz klasične kombinacije ionizirajočega sevanja in kemoterapije v kratke, intenzivne cikle kemoterapije z različnimi kombinacijami citostatikov (npr. ciklofosfamid, vinkristin, doksorubicin, metotreksat). Obstajajo številne različne kombinirane terapije, ena učinkovitejših je CODOX-M/IVAC, ki prej omenjeni kombinaciji citostatikov doda še ifosfamid, etopozid in citarabin. Med novejšimi zdravili se v kombinaciji s kemoterapijo uporablja rituksimab, monoklonsko protitelo proti celičnemu označevalcu CD20, kar izboljša stopnjo remisije in preživetje (1, 4, 6).

4.2 Proteaze

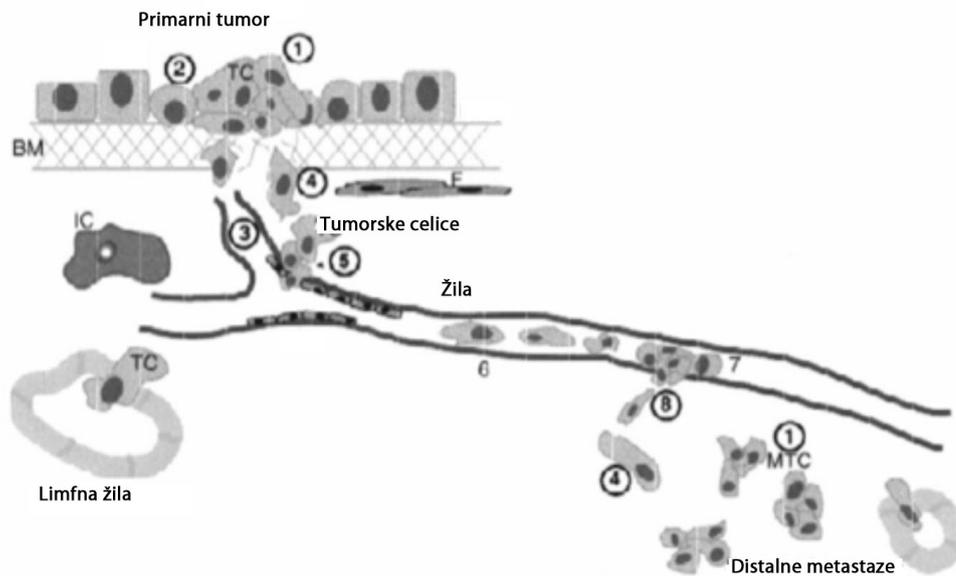
Proteaze oz. proteolitični encimi so encimi, ki katalizirajo cepitev peptidne vezi v proteinih in peptidih. V osnovi jih delimo v pet večjih skupin: serinske (urokinazni aktivator plazminogena, plazmin, kimotripsin), cisteinske (katepsini B, L, S, K in Q, kaspaze), treoninske (proteasom), aspartatne (katepsina D in E) proteaze ter membranske metaloproteaze (želatinazi A in B) (8).

Proteaze v organizmu sodelujejo pri regulaciji številnih pomembnih fizioloških procesov, kot na primer pri uravnavanju celičnega cikla, celične proliferacije in celične smrti, replikaciji DNA, remodelaciji tkiva, hemostazi ter imunskem sistemu. Njihova aktivnost mora biti zato skrbno uravnavana. Regulacija se izvaja že na nivoju prepisa genov z uravnavanim izražanjem, poleg tega je potrebna aktivacija neaktivnih zimogenov in vezava kofaktorjev ter zaviralcev (9).

4.2.1 Vloge proteaz pri raku

Razvoj tumorja poteka v stopnjah, ko zaradi sprememb v celici pride do nastanka lokalizirane novotvorbe, ki postopoma preide v okoliško tkivo in metastazira (10). Proteaze igrajo pomembno vlogo pri razvoju tumorja, saj sodelujejo v procesu invazije in metastaziranja tumorskih celic. Njihovo spremenjeno izražanje v celicah vpliva tudi na povečano proliferacijo in zmanjšano apoptozo, povečano angiogenezo in odpornost celic na zdravila. Pri procesu invazije sodelujejo proteaze, ki so vezane na površino membrane ali pa jih tumorska celica izloča v okolico. Te proteaze razgrajujejo zunajcelični matriks in s tem omogočajo invazijo celice v okolico. Da lahko tumorska celica metastazira, mora vstopiti v krvni obtok, preživeti, se ustaviti na določenem delu, preiti v okoliško tkivo ter tam tudi rasti in se deliti (Slika 1). Pri večini teh korakov imajo pomembno vlogo prav proteaze, ki jih te celice izražajo. Katepsin B so že zgodaj povezali z rakom dojk, kjer

sodeluje pri razvoju, invaziji in metastaziranju. Tudi urokinazni aktivator plazminogena (uPA) spodbuja zadnja dva procesa, poleg tega pa so v *in vitro* študijah dokazali, da poveča celično proliferacijo in spodbuja angiogenezo. Po drugi strani pa lahko proteaze progresijo tumorja tudi zavirajo. Primer slednjega je katepsin L, ki delno cepi kolagen tipa XVIII, pri čemer se tvori endostatin, ki angiogenezo zavira (8, 12).



Slika 1: Proces metastaziranja. Tumorske celice (1) se transformirajo v mezenhimsko-endotelijske (2) ter preidejo v vezivno tkivo in v novonastale žile (3, 4, 5). Celice morajo preživeti v krvnem obtoku (6), se zasedrati na določenem mestu (7), izstopiti iz žile (8) ter prehajati v okoliško tkivo (4), kjer nato rastejo in tvorijo metastaze (1). (Povzeto po 8.)

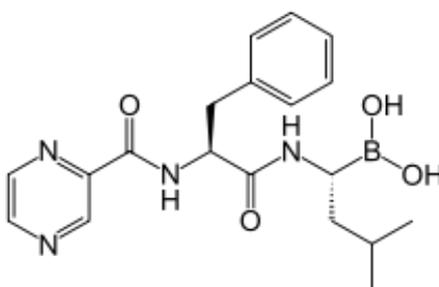
4.2.2 Zaviralci proteaz

Zaviralci proteaz so molekule, katerih glavna naloga je, da tvorijo močne komplekse s proteazami in s tem preprečijo njihovo proteolitično aktivnost (11). Poleg tega lahko zaviralci preprečijo tudi aktivacijo proteaz v nižjih stopnjah kaskade ali pa preprečijo aktivnost proteaze v kompleksu s kofaktorjem (9). V primerjavi s proteazami je endogenih človeških zaviralcev proteaz relativno malo. To lahko razložimo z njihovo nizko specifičnostjo za tarčne proteaze, kar pomeni, da lahko en zaviralec prepreči delovanje več proteaz (13).

Zaviralce proteaz delimo v tri večje skupine: zaviralci serinskih proteaz (serpini), zaviralci cisteinskih proteaz (cistatini) in zaviralci matriksnih metaloproteaz (TIMP). Poleg teh imamo tudi manjše, bolj selektivne skupine zaviralcev, kot so na primer kalpastatini (zaviralci kalpainov) in zaviralci apoptoze (zaviralci kaspaz) (14). Po drugi strani poznamo

tudi nespecifične zaviralce proteaz, kot je na primer α 2-makroglobulin. Ta vsebuje v svoji strukturi poseben peptidni del, ki deluje kot vaba za različne vrste proteaz (15).

Mnoge pomembne zdravilne učinkovine delujejo kot zaviralci proteaz. Kaptopril zavira delovanje angiotenzin konvertaze (metaloproteaza), njegovi analogi pa se uporabljajo v terapiji hipertenzije. Indinavir in sorodna zdravila se uporabljajo za zdravljenje bolnikov z AIDS-om, saj zavirajo delovanje HIV-proteaze (aspartatna proteaza) (16). Zaradi vpletenosti pri raku so zaviralci proteaz zanimivi tudi s stališča protitumorske terapije. Zaenkrat so se študije osredotočale na iskanje zaviralcev aktivatorja plazminogena 1 (PAI-1), TIMP-ov in cistatinov (17). Raziskave potekajo v smeri iskanja majhnih molekul, ki bi bile čim bolj specifične in bi imele ustrezne lastnosti ADME. Problem se pojavi že pri vprašanju specifičnosti. V organizmu je do zdaj poznanih 561 genov za proteaze (18). Mnoge med njimi so si med seboj podobne, zato je težko najti molekulo, ki bo specifična za določeno tarčo. Nadalje, proteazne reakcije pogosto potekajo v kaskadah, kar pomeni, da z vplivom na eno proteazo v sklopu vplivamo tudi na vse nadaljnje. Tretji problem predstavlja dejstvo, da so proteaze široko substratno specifične in da lahko posamezen encim vpliva na več različnih procesov (19–21). Trenutno se za protitumorsko terapijo uporablja le bortezomib (Slika 2). Bortezomib je zaviralec kimotripsinske aktivnosti proteasoma in se uporablja v terapiji multiplega mieloma (22).

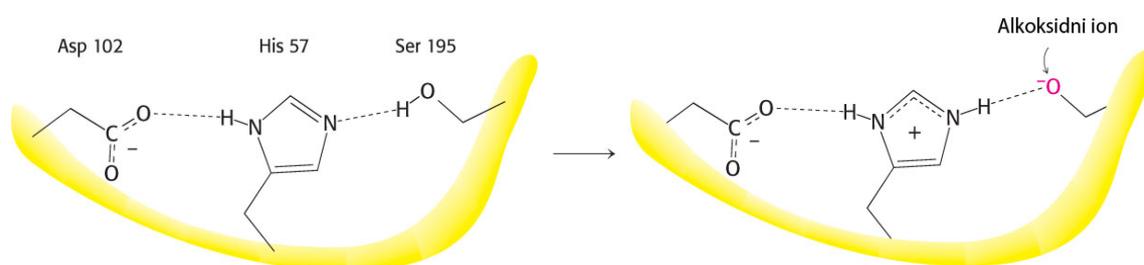


Slika 2: Struktura bortezomiba.

4.2.3 Serinske proteaze

Serinske proteaze so skupina encimov, ki s pomočjo serina v aktivnem mestu katalizirajo cepitev peptidne vezi. Skoraj tretjina vseh proteaz spada med serinske proteaze. V telesu opravljajo številne funkcije, saj sodelujejo pri procesih prebave (kimotripsin, tripsin, pankreasna elastaza), koagulacije krvi (faktorji VIIa, IXa, Xa, XIIa, trombin, protein C), fibrinolize (plazmin, kalikrein, urokinaza, tkivni aktivator plazminogena), oploditve (prostatični specifični antigen) in imunskega sistema (dejavniki komplementa B, C in D, katepsin G, nevtrofilna elastaza). Povezane so tudi s številnimi

bolezni, kot so rak, artritis in emfizem (23, 24, 25). Serinske proteaze delimo v tri večje skupine glede na substratno specifičnost: kimotripsinski tip (preferenčno cepijo na karboksilnem koncu ob aromatskih stranskih skupinah, npr. fenilalanin), tripsinski tip (preferenčno cepijo pri bazičnih ostankih aminokislin, npr. lizin) in elastazni tip (preferenčno cepijo ob majhnih nenabitih ostankih aminokislin, npr. glicin). Zanje je značilna ohranjena katalitska triada v aktivnem mestu, ki jo sestavljajo aminokislina serin, histidin in aspartat (Slika 3). V novejših raziskavah so odkrili tudi serinske proteaze z drugačno triado ali diado v aktivnem mestu, vedno s serinom (23, 26).



Slika 3: Katalitska triada v kimotripsinu. Histidinski ostanek pomaga orientirati stransko verigo serina in polarizira njegovo hidroksilno skupino. V prisotnosti substrata histidin sprejme proton s hidroksilne skupine, pri čemer se tvori alkoksidni anion, ki je močan nukleofil. Aspartatni ostanek pomaga orientirati histidinski ostanek, da lažje sprejme proton (16).

4.2.3.1 Vloga serinskih proteaz v apoptozi

Že leta 1987 so pokazali možen vpliv serinskih proteaz na apoptozo. Številne raziskave v poznejših letih so potrdile, da lahko delujejo bodisi pro- bodisi antiapoptotično. Kljub številnim raziskavam pa je o samem mehanizmu delovanja znano bolj malo. Med najbolj raziskanimi serinskimi proteazami so Omi/HtrA2, grancima A in B, trombin in protein AP24.

Omi/HtrA2 je serinska proteaza iz družine proteinov toplotnega šoka in deluje kot aktivator kaspaz. V procesu apoptoze pride do izgube integritete mitohondrijske membrane, kar omogoča premestitev proteina v citoplazmo, kjer prekine interakcijo med kaspazami in njihovimi zaviralci. Grancim B se nahaja le v citotoksičnih T-limfocitih in naravnih celicah ubijalkah. Deluje preko povečanja prepustnosti mitohondrijske membrane in povečanega sproščanja citokroma c. Prav tako direktno aktivira kaspaze s cepitvijo prooblik proteinov. Tudi grancim A deluje proapoptotično, in sicer direktno aktivira nekatere kaspaze ter povzroča razgradnjo DNA. Protein AP24 sproži cepitev DNA znotraj jedra, kar posledično vodi v apoptozo (26, 27).

Trombin, ki spada med tripsinske serinske proteaze, sodeluje v procesu strjevanja krvi. V različnih raziskavah na tumorskih celičnih linijah so potrdili, da v visokih koncentracijah zavre tumorsko rast in sproži od kaspaz odvisno apoptozo. Nasprotno pa je njegov vpliv na normalne celice mnogo manjši, v nižjih koncentracijah jih celo ščiti pred oksidativnim stresom. Antiapoptotične učinke ima tudi uPA, katerega glavna naloga je pretvarjanje plazminogena v plazmin. Ugotovili so namreč, da hkratio zmanjšanje količine uPA in njegovega receptorja (uPAR) zmanjša aktivacijo preživetvenih proteinov (ERK 1/2, FAK, p38MAPK), sproži aktivacijo kaspaze-8 in povzroči sproščanje citokroma c iz mitohondrijev (27, 28).

4.2.3.2 *Zaviralci serinskih proteaz*

Za uravnavanje funkcije serinskih proteaz med drugim skrbijo njihovi zaviralci. Poznamo endogene zaviralce (serpini) in sintetične molekule, ki preprečijo delovanje serinskih proteaz. Serpini so skupina strukturno podobnih proteinov, ki večinoma zavirajo delovanje kimpotripsinskih serinskih proteaz. Delujejo preko ireverzibilne vezave v aktivno mesto encima (29). V številnih raziskavah so odkrili antiapoptotično funkcijo nekaterih serpinov: CrmA (zavira delovanje kaspaze-8 in grancima B), PI-9 (specifično zavre delovanje grancima B), SPI-1, PAI-2, PN-1. Nasprotno pa lahko SPI-2 sproži apoptozo v živčnih celicah (27, 30). Tudi maspin, za katerega so sicer ugotovili, da zavira rast tumorja, angiogenezo, invazijo, motiliteto in metastaziranje, lahko sproži proces apoptoze (31).

Poleg endogenih poznamo tudi manjše, sintezno pridobljene zaviralce serinskih proteaz, ki so v uporabi za raziskovalne namene. Največja skupina so klorometilketoni, ki se ireverzibilno vežejo na histidinski ostanek v aktivnem mestu encima (32). TPCK (*N*- α -tozil-*L*-fenilalanin klorometilketon) je ireverzibilni zaviralec kimotripsinskih serinskih proteaz. TLCK (*N*- α -tozil-*L*-lizin klorometilketon) prav tako zavira serinske proteaze z večjo afiniteto do tripsinskega tipa (27). Oba zaviralca sprožita apoptozo preko mitohondrijske oz. intrinzične poti (33). TPCK pa lahko sam aktivira tudi kaspazo-3 in povzroči kondenzacijo kromatina (34). Difenilfosfonati so skupina ireverzibilnih zaviralcev serinskih proteaz, ki kovalentno reagirajo s serinsko hidroksilno skupino v aktivnem mestu encima. S pripenjanjem aminokislin na molekulo lahko vplivamo na specifičnost proti določenemu tipu serinskih proteaz (npr. vezava fenilalanina poveča afiniteto za kimotripsinske serinske proteaze, vezava valina pa za elastazni tip). Poznamo

tudi manj specifične sintezne zaviralce serinskih proteaz, kot na primer PMSF in AEBSF, ki ne omogočata razlikovanja med posameznimi podvrstami serinskih proteaz (27).

4.3 Celična smrt

Poznamo več tipov celične smrti, in sicer nekrozo, apoptozo in avtofagijo. Apoptoza predstavlja kontrolirano obliko celične smrti, nekroza pa je nekontrolirana oz. naključna. Do avtofagije pride v procesu celičnega stradanja, kjer celica prebavi lastne organele, da bi dobila energijo in preživela. Vendar to na daljši rok ni dovolj in celica umre (35).

4.3.1 Nekroza

Nekroza oz. onkoza je oblika nekontrolirane celične smrti, kjer pride do kariolize (popolna razgradnja kromatina v jedru z DNazami) in nabrekanja celice ter organelov. Kot posledica nabrekanja se zmanjša integriteta membran, kar omogoča uhajanje proteaz iz lizosomov. Ti preidejo v citosol, kjer povzročijo uničenje celice. V končni fazi pride do razlitja citoplazme v okoliško tkivo (36).

Vzroki za nekrozo so zelo različni, v osnovi pa jih delimo v dve večji skupini: motnje v dobavi energije in direktna poškodba celičnih membran. Nekroza se tako lahko pojavi kot odgovor na hipoksično ali ishemično poškodbo, kot na primer pri srčnem infarktu. Pri neoplazmah pa pride do nekroze, ko proliferacija presega angiogenezo in celice ne dobijo dovolj hranilnih snovi. Tudi izpostavljanje celic suprafiziološkimi pogojem (vročina, mraz, mehanska sila) in različnim toksinom ima za posledico nekrotično smrt. Mediatorji nekrotičnega procesa so reaktivne kisikove spojine (ROS), kalcijevi ioni, poli-ADP-riboza polimeraza (PARP), kalpaini in katepsini. PARP je encim, ki popravlja poškodbe DNA. V primeru preloma DNA PARP izprazni zaloge ATP, da dobi energijo za popravilo dvojne vijačnice, kar lahko vodi v nekrotično smrt. Pri apoptozi nasprotno pride do cepitve in inaktivacije tega encima, s čimer se ohranijo zaloge ATP, ki je potreben za številne procese v apoptozi. Značilnost nekroze je tudi povečana znotrajcelična količina kalcijevih ionov. V primeru, da pride do vstopa kalcijevih ionov v celico preko celotne membrane, se sproži proces nekroze. Če pa se kalcijevi ioni sprostijo iz endoplazmatskega retikuluma, je to signal za apoptozo (35).

4.3.2 Apoptoza

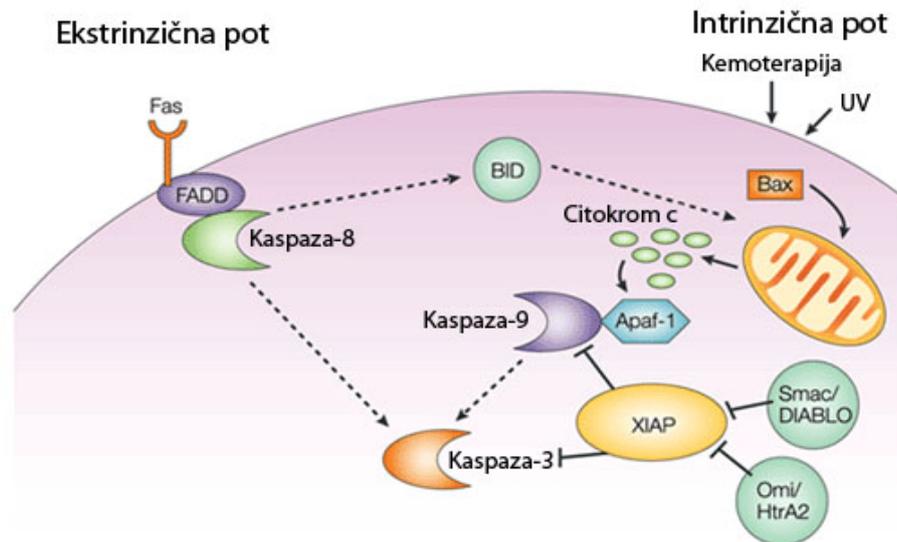
Apoptoza je oblika kontrolirane celične smrti, kjer pride do skrčenja celice in jedra. V času razvoja in staranja organizma je to naraven proces, ki skrbi za homeostazo celičnih

populacij v tkivih, saj nasprotuje mitozni in celični proliferaciji. Poleg tega ima apoptoza tudi obrambno funkcijo pri imunskih reakcijah, ali ko je celica poškodovana zaradi različnih zunanjih vzrokov (toksini, sevanje ipd.) (37).

V procesu apoptoze opazimo vrsto morfoloških sprememb. Na začetku pride do skrčenja celice in ireverzibilne kondenzacije kromatina (piknoza). Skrčena celica ima gostejšo citoplazmo, organeli pa so si bližje. Celica nato postane nepravilne oblike, pri čemer se tvorijo izbokline v membrani. Sledi fragmentacija jedra (karioreksa) in ločba celice v apoptotična telesca, ki jih nato fagocitirajo makrofagi. Za razliko od nekroze pri apoptozi praktično ne opazimo vnetnega odziva, saj apoptotične celice svoje vsebine ne sproščajo v okolico, ampak so v celoti hitro fagocitirane (1, 36).

Mehanizem apoptoze je zelo kompleksen in vključuje energijsko odvisno kaskado molekulskih dogodkov. V procesu sodelujejo encimi kaspaze (cistein vsebujoče aspartatno specifične proteaze), ki se v neaktivni, proencimski obliki nahajajo v večini celic v organizmu. Zaradi svoje proteazne aktivnosti lahko po aktivaciji cepijo prooblike ostalih kaspaz in sprožijo kaskadno reakcijo, kar okrepi apoptotično signalizacijo in vodi v hitro smrt. Zaenkrat je bilo raziskanih deset kaspaz, ki jih delimo v tri skupine, in sicer iniciatorji apoptoze (kaspaza-2, -8, -9, -10), efektorji oz. izvajalci apoptoze (kaspaza-3, -6, -7) in vnetne kaspaze (kaspaza-1, -4, -5). Poleg aktivacije kaspaz je značilnost apoptoze tudi izražanje celičnih površinskih ozančevalcev, kar omogoča hitrejšo fagocitozo in s tem manjšo škodo za okoliško tkivo. Normalno navznoter obrnjeni fosfatidilserin celičnega fosfolipidnega dvosloja se obrne navzven in služi kot ligand za prepoznavo s strani fagocitov.

Apoptoza je sprožena po dveh različnih, a konvergentnih poteh: aktivacija smrtnih receptorjev (ekstrinzična pot) in mitohondrijska (intrinzična) pot (Slika 4). Novejši podatki kažejo na obstoj še tretje poti, ki vključuje s T-celicami uravnavano citotoksičnost in od perforina ter grancima odvisno smrt celice (38).



Slika 4: Apoptozo se lahko sproži po dveh različnih poteh. Ekstrinzična pot se sproži po vezavi proteina TNF-družine na njegov receptor. Pri tem pride do aktivacije kaspaze-8. Intrinzična pot se sproži npr. po obsevanju z ionizirajočimi žarki. Pri tem se poveča prepustnost mitohondrijske membrane. Po sprostitvi citokroma c iz mitohondrijev pride do aktivacije kaspaze-9. Obe poti se združita v skupno pot z aktivacijo kaspaze-3. (Povzeto po 39.)

4.3.2.1 Ekstrinzična pot

Ekstrinzično pot, ki je udeležena v procesu remodelacije tkiv in tolerance imunskih celic na telesu lastne celice, aktivirajo proteini TNF-družine, ki se vežejo na membranske smrtne receptorje. Najbolj raziskane povezave so na primer FasL/FasR, Apo3L/DR3 ali TNF- α /TNFR1. Vezava liganda na receptor sproži vezavo ustreznega adapterskega proteina na smrtno domeno receptorja na notranji strani membrane. V primeru FasL/FasR je to FADD, ki nato tvori interakcije s prokaspazo-8 (40). Pride do nastanka multiproteinskega kompleksa DISC, kar ima za posledico avtokatalitsko aktivacijo prokaspaze-8. Nastala kaspaza-8 je osrednji mediator apoptoze in sproži naslednjo, efektorsko stopnjo. Ekstrinzično pot lahko zavre protein c-FLIP z vezavo na FADD in kaspazo-8, regulacija pa lahko poteka tudi preko proteina Toso, ki naj bi zavrl s Fas sproženo apoptozo v T-limfocitih preko preprečenega procesiranja kaspaze-8 (36, 41).

4.3.2.2 Intrinzična pot

Intrinzično pot apoptoze kontrolirajo člani družine proteinov Bcl-2. Dražljaji, ki sprožijo to pot, lahko bodisi preprečijo supresijo apoptoze (npr. zaradi odsotnosti rastnih faktorjev, hormonov, citokinov) bodisi sprožijo apoptozo (npr. kot posledica sevanja, toksinov, hipoksije, radikalov ipd). Skupna točka teh dražljajev je sprememba v prepustnosti mitohondrijske membrane in izguba mitohondrijskega transmembranskega

potenciala. Posledično pride do izločanja nekaterih proapoptotičnih proteinov iz medmembranskega mitohondrijskega prostora v citosol. Delimo jih v dve skupini. Prva skupina proteinov, kamor uvrščamo citokrom c, Smac/DIABLO in Omi/HtrA2, aktivira od kaspaz odvisno mitohondrijsko pot apoptoze. Citokrom c skupaj s proteinom Apaf-1 in prokaspazo-9 tvori apoptosom s posledično aktivacijo kaspaze-9 (42). Smac/DIABLO in Omi/HtrA2 preprečita funkcijo zaviralcev apoptoznih proteinov (IAP). Druga skupina proteinov, kamor sodijo apoptozo inducirajoči faktor AIF, endonukleaza G in od kaspaz odvisna DNaza CAD, se iz mitohondrijev izloči relativno pozno med apoptozo. Ti proteini se premestijo v jedro, kjer povzročijo fragmentacijo in kondenzacijo kromatina (36, 43).

Kot omenjeno, družina proteinov Bcl-2 kontrolira intrinzično pot apoptoze. Člani te družine imajo vsaj eno homologno domeno Bcl-2, ki omogoča povezovanje z drugimi proteini. Delujejo bodisi pro- bodisi antiapoptotično prek uravnavanja permeabilnosti mitohondrijske membrane in posledičnega sproščanja citokroma c, za celično preživetje pa je potrebno ustrezno ravnotežje med njimi. Med proapoptotične proteine uvrščamo npr. Bax, Bcl-10, Bak, Bad, med antiapoptotične pa Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w idr. Poleg omenjenih sta proapoptotična člana družine proteinov Bcl-2 še proteina Puma in Noxa. Njuno izražanje uravnava protein p53, kar nakazuje na njuno vlogo v apoptozi, ki je posledica poškodbe DNA (36).

4.3.2.3 Skupna pot

Ekstrinzična in intrinzična pot apoptoze se združita v skupno oz. izvršno pot apoptoze. V tej fazi so ključne kaspaze-3, -6 in -7, ki delujejo kot efektorji in cepijo različne substrate, na primer citokeratine, PARP, citoskeletni protein α -fodrin in druge (44). Prav tako aktivirajo citoplazemske endonukleaze in proteaze, ki razgrajujejo jedrske in citoskeletne proteine. Za najpomembnejši člen velja kaspaza-3, ki jo aktivirajo iniciatorske kaspaze (kaspaza-8, -9 ali -10). Aktivirana kaspaza-3 cepi kompleks med CAD in njegovim zaviralcem. CAD nato razgradi kromosomsko DNA in povzroči kondenzacijo kromatina. Kaspaza-3 prav tako povzroči preureditev citoskeleta in razdelitev celice na apoptotična telesa (45).

Zadnja stopnja apoptoze je fagocitoza nastalih apoptotičnih teles. Eksternaliziran fosfatidilserin omogoči zgodnjo prepoznavo celice s strani fagocitov in njihov hiter privzem ter razgradnjo. S tem je minimalizirano sproščanje celične vsebine v okolico in z njim tudi odsotnost vnetnega odziva (36).

4.3.2.4 Apoptoza in rak

Rak je primer bolezni, kjer pride do disfunkcije regulacije celičnega cikla s prekomerno proliferacijo in/ali z zmanjšanim odstranjevanjem celic. Prek 50 % neoplazem ima okvare v mehanizmih apoptoze, kar pomeni, da bi lahko bila sprožitev apoptoze pomembna terapevtska pot v prihodnosti.

Tumor lahko razvije odpornost na apoptozo s povečanim izražanjem antiapoptotičnih proteinov (npr. Bcl-2). Po drugi strani pa lahko pride do manjšega izražanja ali mutacije proapoptotičnih proteinov (npr. Bax). Pri nekaterih tumorskih celicah so pokazali zmanjšano izražanje ali tvorbo nefunkcionalnega receptorja Fas. Med najbolj raziskanimi okvarami so povečana ekspresija proteinov družine Bcl-2 ter mutacije v genu, ki kodira protein p53. Slednji sproži apoptozo kot odgovor na poškodbo DNA, in sicer s tem, da inducira ekspresijo mnogih proapoptotičnih proteinov (Puma, Bax, Noxa) (36).

4.4 Signalizacija NF- κ B

NF- κ B je skupina inducibilnih transkripcijskih faktorjev, ki jih najdemo v praktično vseh sesalskih celicah. Igrajo ključno vlogo pri regulaciji imunskega odziva, povezani pa so tudi z vnetnimi in avtoimunimi boleznimi, septičnim šokom, virusnimi infekcijami, neustreznim imunskim razvojem ipd. Ti transkripcijski faktorji so stalno aktivni pri številnih bolezenskih stanjih, kot na primer artritis, astma, kronično vnetje, neurodegenerativne in srčne bolezni (46).

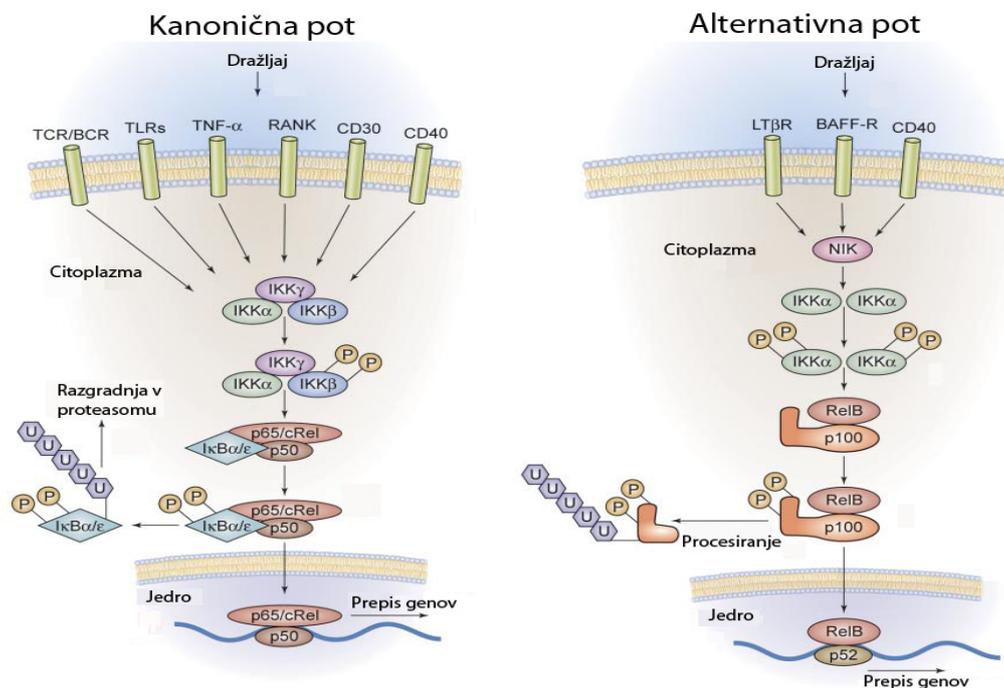
Poznamo pet članov družine proteinov NF- κ B, in sicer p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- κ B1) in p52/p100 (NF- κ B2). Za te proteine je značilna prisotnost 300 aminokislin dolge homologne domene Rel (RHD), preko katere lahko proteini dimerizirajo, tvorijo interakcije s proteini I κ B (zaviralci proteinov NF- κ B) in se vežejo na DNA. Vsi proteini Rel lahko med seboj tvorijo homodimere in heterodimere z izjemo RelB, ki lahko tvori le heterodimere. Veliko število možnih struktur tako omogoča regulacijo širokega spektra genov. Proteini NF- κ B se nahajajo v citoplazmi v neaktivni obliki kot asociati z zaviralnimi proteini I κ B. Poznamo sedem članov proteinov I κ B, za katere je značilna prisotnost od pet do sedem ankirinskih ponovitev – 33 aminokislin dolga domena. Najbolj poznani proteini I κ B so I κ B α , I κ B β in I κ B ϵ . Kinaze I κ B (IKK) so proteini, ki fosforilirajo proteine I κ B. Nahajajo se v 700–900 kDa velikem kompleksu, ki je sestavljen iz IKK1 (IKK α), IKK2 (IKK β) ter regulatorne podenote NEMO (IKK γ). Po fosforilaciji proteina I κ B sledi poliubikvitinacija, kar vodi do njegove razgradnje v

proteasomu. Posledično pride do sprostitve in premika proteina NF- κ B v jedro, kjer sproži prepis posameznih genov (47, 48).

4.4.1 Mehanizem aktivacije NF- κ B

Aktivacija NF- κ B poteka po dveh poteh, in sicer po klasični oz. kanonični ali po alternativni oz. nekanonični poti (Slika 5) (49). Klasično pot aktivirajo številni dražljaji, kot na primer provnetni citokini (TNF- α , IL-1 ipd.) ali s patogeni povezani molekularni vzorci, ki se vežejo na TLR-receptorje, TCR/BCR-receptorje, limfocitne koreceptorje CD40 in CD30 ali na RANK (50). Vezava na receptor v večini primerov sproži aktivacijo IKK β , ki fosforilira proteine I κ B na dveh serinskih ostankih. Temu sledi poliubikvitinacija I κ B in razgradnja v proteasomu, kar posledično aktivira NF- κ B (51).

Alternativno pot sprožijo dražljaji preko CD40 in limfotoksin- β -receptorja, B-celice aktivirajoči dejavnik (BAFF), lipopolisaharid (LPS), EBV in latentni membranski protein 1 (LMP-1). Dražljaju sledi aktivacija NIK (NF- κ B inducirajoče kinaze) in posledično aktivacija IKK α , ki fosforilira protein p100. Slednji se v proteasomu delno razgradi do proteina p52. Ta po dimerizaciji z RelB preide v celično jedro, kjer sproži prepis genov (50, 51).



Slika 5: Mehanizem aktivacije NF- κ B. Pri kanonični poti pride po aktivaciji TLR-, TCR- ali drugih receptorjev do aktivacije IKK β . Te fosforilirajo I κ B, ki se nato razgradi v proteasomu. Alternativna pot se sproži prek TNFR-družine receptorjev, ki prek proteina NIK aktivirajo IKK α . Slednje nato fosforilirajo protein NF- κ B, ki se nato delno razgradi v proteasomu. Na koncu obeh poti pride do premestitve NF- κ B v jedro, čemur sledi prepis genov. (Povzeto po 50.)

4.4.2 NF- κ B v onkogenezi

Proteini NF- κ B uravnavajo transkripcijo številnih genov in s tem vplivajo na različne procese. Deregulacija NF- κ B je prisotna pri mnogih malignih boleznih, saj lahko NF- κ B modulira celično proliferacijo, angiogenezo, metastaziranje, tumorsko rast, vnetje in zavira apoptozo (46).

Pomembni naj bi bili predvsem geni, ki kodirajo proteine c-Rel, p52/p100 in Bcl-3. Tako so pri nekaterih vrstah raka odkrili pomnožen ali prerazporejen gen za c-Rel. Pri nekaterih podvrstah B-limfocitnih KLL so odkrili translokacijo gena Bcl-3 ali njegovo povečano ekspresijo. Mutacije v I κ B α pa so odkrili pri Hodgkinovem limfomu, kar ima za posledico konstitutivno izražanje NF- κ B v malignih celicah (51, 52). Poleg sprememb na genetskem nivoju lahko na celično transformacijo prek aktivacije NF- κ B vplivajo tudi virusni transformirajoči proteini. Tako na primer protein Tax iz virusa HTLV-1 prek direktne interakcije z IKK-kompleksom aktivira NF- κ B. Podobno tudi EBV-kodirani proteini, EBV-jedrski antigen 2 in LMP-1 spodbujajo transkripcijsko aktivnost NF- κ B.

Aktivacija NF- κ B vpliva tudi na proces apoptoze. Zaviranje apoptoze je v tem primeru posledica z NF- κ B sprožene transkripcije proteinov TRAF1 in 2 ter c-IAP1 in 2, ki preprečijo aktivacijo kaspaze-8. Poleg omenjenih se poveča tudi transkripcija proteinov družine Bcl-2 (npr. A1/Bfl-1, Bcl-XL, XIAP). Dodatno so odkrili, da lahko NF- κ B nasprotuje funkciji proteina p53, ki lahko sproži apoptozo v primeru nepopravljivih poškodb DNA. NF- κ B poveča transkripcijo ciklina D1, s čimer spodbuja celično rast, vpliva pa tudi na regulacijo COX-2 in iNOS (46, 52). Po drugi strani pa lahko NF- κ B tumorsko rast tudi zavira, kar dokazuje uporaba aktivatorja NF- κ B LPS v terapiji raka v preteklosti (53).

Zaviranje aktivacije NF- κ B zaradi njegove vpletenosti v rakava obolenja in druga patološka stanja predstavlja potencialno strategijo za uporabo v terapiji. Proteasom razgrajuje proteine I κ B in s tem sodeluje pri aktivaciji NF- κ B. Bortezomib je zaviralec proteasoma, ki se uspešno uporablja pri terapiji multiplegla mieloma. Antagonisti IKK β so v predkliničnih študijah učinkovito zmanjšali razgradnjo I κ B in s tem pripomogli k apoptozi in protitumorski aktivnosti pri multiplem mielomu, KML, difuznem B-celičnem limfomu in raku prostate (51).

Celice Ramos imajo konstitutivno izražen NF- κ B (54), celice Ramos-BlueTM pa stabilno izražajo NF- κ B/AP-1 inducibilen gen SEAP (izločena embrionska alkalna

fosfataza), kar pomeni, da po stimulaciji s TNF α izločajo encim SEAP, kar lahko spremljamo z ustreznim testom (55).

4.5 Evkariontski faktor podaljševanja 1- α (eEF1A)

Evkariontski faktor podaljševanja 1- α je protein, ki sodeluje v procesu sinteze proteinov. Sinteza proteinov poteka v treh stopnjah, in sicer iniciacija, elongacija in terminacija. Med podaljševanjem aminokislinske verige eEF1A veže in dostavlja aminoacil-tRNA (aa-tRNA) na prazno A-mesto ribosoma. eEF1A spada v skupino G-proteinov, kar pomeni, da ima GTPazno aktivnost in lahko po vezavi aa-tRNA hidrolizira GTP do GDP. Sledi sprostitvev eEF1A z ribosoma in tvorba peptidne vezi. Pri tem procesu sodeluje eEF2, ki katalizira premik kompleksa peptidil-tRNA in mRNA z mesta A na mesto P ribosoma. Za reaktivacijo proteina eEF1A sta potrebna še GEF (angl. guanine nucleotide exchange factor) in eEF1B $\alpha\gamma$, ki sprostita GDP z vezavnega mesta (56).

Poleg s kanonično vlogo pa novejša študije povezujejo eEF1A še s številnimi drugimi funkcijami. Protein eEF1A naj bi vplival na prehod aa-tRNA iz jedra v citoplazmo, prav tako pa naj bi na transkripcijskem nivoju sodeloval pri transportu proteinov iz jedra (57, 58). Visoke koncentracije eEF1A v bližini ribosoma naj bi pripomogle k potencialnemu vplivu na kotranslacijsko razgradnjo proteinov. Ugotovili so tudi, da eEF1A tvori interakcije s proteasomom 26S, te pa se povečajo v primeru, da je translacija zavrta (59). Že dolgo časa je poznana povezava med eEF1A in citoskeletom. V *in vitro* študijah so pokazali, da lahko eEF1A veže in zviija aktinske filamente. Z različnimi mutacijami so prav tako pokazali, da lahko eEF1A ob normalni sintezi proteinov v celicah reorganizira aktinski citoskelet. Odnos med obema je kompleksen, saj nanj vplivajo številni drugi faktorji, med njimi tudi eEF1B α , ki *in vitro* zmanjša zvijanje aktina pod vplivom eEF1A (60, 61, 62). eEF1A naj bi vplival tudi na proces apoptoze, vendar so v dveh ločenih študijah odkrili nasprotujoče si rezultate. V prvi so ugotovili, da povečano izražanje eEF1A korelira s povečano apoptozo na fibroblastih po odvzemu medija. V drugi pa so ugotovili, da eEF1A poveča preživetje na celičnih linijah pro-B. Vzrok za razliko se morda nahaja v dveh izoformah proteina (eEF1A-1 in eEF1A-2), ki se različno izražata glede na tkivo in stopnjo razvoja. Tako so na kulturi mioblastov ugotovili, da izražanje eEF1A-2 ščiti pred apoptozo, medtem ko ima ekspresija eEF1A-1 nasproten učinek (63, 64, 65). Poleg omenjenih področij so opazili tudi povezavo med eEF1A in virusi. Predvsem virusi RNA s pozitivno vijačnico naj bi uporabljali eEF1A pri svojem pomnoževanju (56).

5 Namen

Predhodne raziskave so pokazale, da skupina zaviralcev serinskih proteaz z azafenilalaninsko strukturo sproži od kaspaz odvisno apoptozo na celičnih linijah Ramos in Wehi 231. Namen našega dela je ovrednotiti 23 spojin acilhidrazidnega in sulfonohidrazidnega tipa, ki so bile sintetizirane na osnovi rezultatov SAR-študije teh spojin.

V prvem delu bomo s testom presnovne aktivnosti MTS ovrednotili citotoksični učinek spojin na celični liniji Ramos. Sledil bo izbor učinkovitih spojin ter ugotavljanje selektivne toksičnosti s testom MTS na drugih levkemičnih/limfomskih celičnih linijah. Naredili bomo tudi analizo celičnega cikla, s čimer bomo preverili, če spojine povzročijo smrt celic. Podobno kot pri azafenilalaninskih derivatih tudi tu pričakujemo od kaspaz odvisno apoptotično smrt. To bomo poskušali dokazati s testom aneksin V/7-AAD, merjenjem aktivnosti kaspaz-3/-7 in z metodo prenosa po Westernu, kjer bomo preverili, če pride do cepitve kaspaze-3. Z metodo prenosa po Westernu bomo ovrednotili tudi vpliv spojin na signalizacijo NF- κ B, ki je pri celicah Ramos stalno aktivna. To domnevo bomo preverili tudi na celicah Ramos-Blue™. V zadnjem delu bomo naredili 2D-elektroforezo in primerjali profila izražanja proteinov tretiranih in kontrolnih celic.

Cilj diplomske naloge je torej iz začetnega nabora spojin poiskati selektivno toksične zaviralce serinskih proteaz in ovrednotiti njihov mehanizem delovanja.

6 Materiali in metode

6.1 Materiali

Acilhidrazidni in sulfonohidrazidni zaviralci serinskih proteaz so bili sintetizirani na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Aleša Obreze, mag. farm.

6.1.1 Kemikalije in reagenti

Kemikalija	Proizvajalec
Ac-DEVD-AFC peptidni substrat	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
akrilamid	Fluka Chemie AG, Buchs, Švica
antibiotik in antimikotik, raztopina	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
aprotinin	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
APS	Fluka Chemie AG, Buchs, Švica
BFM	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
Bio-Rad Protein Assay Kit I	Bio-Rad, Richmond, CA, ZDA
BSA	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
DMSO	Merck Chemicals, Darmstadt, Nemčija
Halt fosfataza	Thermo Fisher Scientific, IL, ZDA
IMDM	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
izopropanol	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
2-merkaptetanol	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
MTS-reagent Cell Titer 96 [®] AQueous One Solution Reagent	Promega, Madison, WI, ZDA
N,N'-metilen-bis-akrilamid	Fluka Chemie AG, Buchs, Švica
Nonident P40	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
Quanti-Blue [™]	Invivogen, CA, ZDA
PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences
PMSF	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
Propidijev jodid	Invitrogen, CA, ZDA
Protitelo – primarno, zajčje, monoklonsko, proti kaspazi-3	Cell Signaling Technology, MA, ZDA
Protitelo – primarno, zajčje, monoklonsko, proti IκBα	Cell Signaling Technology, MA, ZDA
Protitelo – primarno, zajčje, monoklonsko, proti p-IκBα	Cell Signaling Technology, MA, ZDA
Protitelo – primarno, zajčje, monoklonsko, proti p-p105	Cell Signaling Technology, MA, ZDA
Protitelo – primarno, zajčje, monoklonsko, proti p105/p50	Abcam, Cambridge, VB

Protitelo – primarno, mišje, monoklonsko, proti β -aktinu	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
Protitelo – sekundarno, kozje, monoklonsko, protimišje, konjugirano s HRP-encimom	Upstate (Temecula, CA, ZDA)
HRP-encimom	Millipore Corporation, Billerica, MA, ZDA
Protitelo – sekundarno, kozje, monoklonsko, protizajčje, konjugirano s HRP-encimom	Upstate (Temecula, CA, ZDA)
RPMI 1640	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
SDS	Promega, Madison, WI, ZDA
SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen, CA, ZDA
SuperSignal® West Femto substrate	Thermo Fisher Scientific, IL, ZDA
TEMED	Bio-Rad, Richmond, CA, ZDA
TNF α	Invivogen, CA, ZDA
TPCK	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
Trypan Blue solution	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
Tween 20	Bio-Rad, Richmond, CA, ZDA
Z-VAD-FMK	BD Pharmingen, NJ, ZDA

6.1.2 Pufri in raztopine

- 10 % amonijev persulfat (APS) v dH₂O
- 1 M fosfatni pufer (pH 6,0): 2,14 g Na₂HPO₄ x 2H₂O, 12,0 g KH₂PO₄, 0,37 g EDTA in 5,84 g NaCl, dH₂O do 100 mL
- kaspazni lizatni pufer: 0,1 % Triton X-100, 100 mM fosfatni pufer, pH 6,0, 1,3 mM EDTA, 100 mM NaCl
- kaspazni reakcijski pufer: 20 mM PIPES s pH 7,2, 10 % saharoza, 0,1 % CHAPS, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, dH₂O
- 10x PBS (pH 7,4): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, 2,0 mM KH₂PO₄, dH₂O
- pufer za barvanje (celični cikel): 100 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, 0,1 % Nonident P-40
- pufer RIPA: 1 % Nonidet P40, 0,5 % natrijev deoksiholat, 0,1 % SDS, 0,004 % NaN₃, dH₂O
- lizatni pufer RIPA: 1600 μ L RIPA, 1,6 μ L aprotinin, 8 μ L PMSF, 16 μ L halt-fosfataze, dH₂O
- 8 % gel SDS-PAGE:

- ločilni gel: 9,3 mL H₂O, 5,3 mL 30 % akrilamida, 5,0 mL separacijskega pufra, 0,2 mL 10 % SDS, 0,2 mL 10 % APS, 12 μL TEMED
- koncentracijski gel: 6,8 mL H₂O, 1,7 mL 30 % akrilamida, 1,25 mL koncentracijskega pufra, 0,1 mL 10 % SDS, 0,1 mL 10 % APS, 10 μL TEMED
- 3x SLB (angl. sample loading buffer): 30 % glicerol, 0,3 % BFM, 9 % SDS, 195 mM Tris (pH 6,8), dH₂O
- nanašalni pufer SLB: 13,33 μL 3x SLB, 1,6 μL BFM, 2,4 μL 2-merkaptioetanol, dH₂O (kolikor potrebno, da skupaj s proteini da končni volumen 40 μL)
- pufer za odstranjevanje vezanih protiteles (angl. stripping buffer): 2 % SDS, 62,5 mM Tris, pH 6,8, 100 mM 2-merkaptioetanol, dH₂O
- TTBS: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20, pH 7,6
- 5 % raztopina mleka: 5 g mleka v prahu (Pomurske mlekarne), 50 mL TTBS
- ločilni pufer (angl. separating buffer): 1,5 M Tris, pH 8,8, 0,4 g SDS, dH₂O
- koncentracijski pufer (angl. stacking buffer): 0,5 M Tris, pH 6,8, 0,4 g SDS, dH₂O
- 5x elektroforezni pufer Tris-glicin: 25 mM Tris, 250 mM glicin, 0,1 % SDS, dH₂O
- 10 % SDS: 10 g SDS, 90 mL dH₂O
- lizatni pufer (L-pufer): 7 M urea, 2 M tiourea, 4 % (m/V) CHAPS, 2 % (m/V) IPG-pufer, ddH₂O, 1 % (m/V) DTT
- rehidracijski pufer (RH-pufer): 7 M urea, 2 M tiourea, 4 % (m/V) CHAPS, 2 % (m/V) IPG-pufer, 0,002 % (m/V) BFM, ddH₂O, 65mM DTT
- pufer za uravnoteženje I: 75 mM Tris, 6 M urea, 30 % (V/V) glicerol, 2 % (m/V) SDS, 0,002 % (m/V) BFM, ddH₂O, 1 % (m/V) DTT
- pufer za uravnoteženje II: 75 mM Tris, 6 M urea, 30 % (V/V) glicerol, 2 % (m/V) SDS, 0,002 % (m/V) BFM, ddH₂O, 4,8 % (m/V) jodacetamid
- raztopina akrilamida/bis-akrilamida (AA/AB 40 % / 0,8 %): 100 mL 40 % akrilamida, 0,8 g bis-akrilamida
- 5x elektroforezni pufer SDS: 260 mM Tris, 960 mM glicin, 0,5 % (m/V) SDS, dH₂O
- 12 % SDS-PAGE za 2D-elektroforezo:

- ločilni gel: 23,46 mL raztopine AA/AB 40 % / 0,8 %, 19,6 mL 1,5 M Tris (pH 8,8), 0,8 mL 10 % SDS, 33,94 mL dH₂O, 0,39 mL 10 % APS, 26 µL TEMED
- agarozni gel: 0,5 g agaroze, 100 mL 1x elektroforeznega puфра SDS, kristalček BFM
- raztopine za barvanje pri 2D-elektroforezi:
 - fiksacija: 100 mL 95 % (V/V) etanola, 25 mL ledocetne kisline, dH₂O do 250 mL
 - predtretiranje: 75 mL 95 % etanola, 5 mL 10 % (m/V) raztopine Na₂S₂O₃
 - barvanje: 3,125 mL 20 % (m/V) raztopine AgNO₃, dH₂O do 250 mL
 - razvijanje: 25 % (m/V) Na₂CO₃, 100 µL 37 % formaldehida, dH₂O do 250 mL
 - prekinitev reakcije: 14,6 % (m/V) Na₂EDTA x 2H₂O, dH₂O do 250 mL
- medij IMDM: 500 mL IMDM, 50 mL FBS, 5 mL 200 mM L-glutamina, 5 mL antibiotika/antimikotika, 0,5 mL 50 mM 2-merkaptetanola
- medij RPMI 1640: 500 mL RPMI 1640, 50 mL FBS, 5 mL 200 mM L-glutamina, 5 mL antibiotika/antimikotika, 0,5 mL 50 mM 2-merkaptetanola

6.1.3 Laboratorijska oprema

Aparatura/material	Proizvajalec
avtoklav	A-21, Kambič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija
centrifuge	Tehtnica CENTRIC 322A, Železniki, SLO Tehtnica CENTRIC 150, Železniki, SLO Eppendorf centrifuge 5415 R, Hamburg, Nemčija
centrifugirke (15 in 50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija
Dymension software	SynGene, Cambridge, VB
Ettan IPGphor 3 Isoelectric Focusing Unit (naprava za izoelektrično fokusiranje) (od Syngene), Immobiline DryStrip pH 3-11 NL, 13 cm Ettan IPGphor Cup Loading Manifold Light with Plastic Tray	GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, VB

G-box in programska oprema SynGene	SynGene, Cambridge, VB; SynGene, Frederick, MD, ZDA
hemocitometer	Brand Neubauer (BNlau Brand)
hladilnik/zamrzovalnik	Gorenje, Velenje, Slovenija
inkubator	Heraus Holding GmbH, Hanau, Nemčija
invertni svetlobni mikroskop (Olympus CK40)	Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Nemčija
kadička za vertikalno elektroforezo	Bio-Rad, Richmond, CA, ZDA
komora z laminarnim pretokom zraka (LAF)	Waldner Electronics FAZ 3, Wangen, Nemčija
krioviale	TPP, Trasadingen Švica
mikrocentrifugirke (0,5 mL; 1,5 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija
mikrokapilarni nastavki za pipete s sploščeno konico (5–100 µL)	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
mikrotitrne ploščice za gojenje celičnih kultur (s 6, 12, 24 ali 96 vdolbinami)	TPP, Trasadingen, Švica
nastavki za pipete (do 10, 200, 300 ali 1000 µL)	Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija
pipete	Biorad ali Eppendorf
precizna tehtnica	Europe60 Gibertini
pretočni citometer FACScalibur	BD Biosciences, SJ, CA
programska oprema za Tecan	Magellan V3.X IVD
posode T-flask za gojenje celičnih kultur (s 25, 75 in 150 cm ² rastne površine)	TPP, Trasadingen, Švica
serološke pipete	TPP, Trasadingen, Švica
spektrofotometer Tecan Safire2 TM Genios	Tecan, Genios, Zürich, Švica
stresalnik	Vibromix 314 EVT Tehnica
termični stresalnik Apollo HP50	CLP Tools, San Diego, ZDA
TOASTER (naprava iBlot [®] za prenos Western) in kit za prenos po Westernu	Invitrogen, CA, ZDA
ultrasonični homogenizator 4710	Call-Rarner Instrument Co., IL, ZDA
vir napetosti za elektroforezne kadičke	Bio-Rad, Richmond, CA, ZDA

vodna kopel	Mikro+Polo, Maribor, Slovenija Mimmert, Schwabach, Nemčija
vorteks (Vortex GENIE 2)	Scientific Industries, FL, ZDA
zamrzovalnik –80 °C	Forma Scientific, ON, Kanada

6.2 Metode

6.2.1 Celične kulture

Delo s celičnimi kulturami je potekalo v za to posebej prilagojenem laboratoriju z LAF-komoro (laminarni pretok zraka). Pri delu smo uporabljali zaščitno haljo in rokavice iz lateksa. Pred začetkom dela smo površine in roke z rokavicami prebrsali s 70 % etanolom ter komoro vsaj 20 minut obsevali z UV-svetlobo. Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali celične linije Ramos, U937, Jurkat, Nalm-6, Kopn-8, Thp-1, Raji in PBMC (periferne krvne mononuklearne celice), ki smo jih gojili v mediju 1640 RPMI. Celice Ramos-Blue™ smo gojili v mediju IMDM. Vse celice so bile hranjene v posebnih posodah T-flask različnih volumnov v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO₂.

- Celice Ramos so EBV negativne celice, ki izvirajo iz Burkittovega limfoma. Imajo limfocitom B podobne lastnosti in se uporabljajo v študijah apoptoze.
- Celice Ramos-Blue™ so EBV negativne celice, ki izvirajo iz Burkittovega limfoma. Imajo limfocitom B podobne lastnosti in stabilno izražajo NF-κB/AP-1 inducibilen gen SEAP, kar omogoča proučevanje signalizacije NF-κB in Ap-1.
- U937 so monocitne celice, izolirane iz difuznega histiocitnega limfoma 37-letnega belca.
- Celice Jurkat so CD4+ limfociti T, ki izvirajo iz akutne T-celične levkemije 14-letnega fanta. Pod vplivom stimulacije s forbolnimi estri, lektini ali protitelesi proti T3-receptorju proizvajajo velike količine IL-2.
- Celice Nalm-6 so EBV negativne celice, ki izvirajo iz akutne B-celične levkemije 19-letnika in imajo B-limfocitom podobne lastnosti.
- Celice Kopn-8 so EBV negativne celice, ki izvirajo iz akutne B-celične levkemije 3-mesečne deklice in imajo limfocitom B podobne lastnosti.
- Celice Thp-1 so monociti, ki izvirajo iz akutne monocitne levkemije enoletnega fantka in proizvajajo lizosom ter imajo sposobnost fagocitoze.
- PBMC so periferne krvne mononuklearne celice (limfociti, monociti, makrofagi).

Zamrznjene celice smo hranili v mediju z 10 % DMSO, zaprte v kriovialah v tekočem dušiku. Odmrzovanje je potekalo po sledečem postopku: celice smo na hitro odtalili ter jih prenesli v tube ustreznega volumna, v katerih je bil na 37 °C segret ustrezen medij. Celice smo nato centrifugirali 5 min pri 1200 rpm, odstranili supernatant ter dodali svežega. Na koncu smo jih resuspendirali, prenesli v T-flask in postavili v inkubator. Celice smo na določen čas redčili s svežim, na 37 °C segretim medijem do ustreznne koncentracije (ponavadi okoli 1×10^5 celic/mL), da smo zagotovili optimalno koncentracijo za rast.

Za izračun potrebne redčitve smo najprej izračunali trenutno koncentracijo celic. Celice smo prešteli s hemocitometrom pod mikroskopom. Določen volumen suspenzije celic smo zmešali z barvilom tripansko modro in jih s pipeto nanесли v komoro za štetje. Nato smo pod mikroskopom prešteli žive celice v štirih velikih kvadratih. Število celic smo nato delili s štiri, množili s faktorjem redčitve z barvilom in pomnožili z 10^4 . Tako smo dobili število celic v mL medija.

6.2.2 Test MTS

Test MTS je test presnovne aktivnosti celic, ki se uporablja za merjenje proliferacije, citotoksičnosti in kemosenzitivnosti. Reagent je sestavljen iz MTS-reagenta [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol, notranja sol] in reagenta za prenos elektronov PES (fenazinijev etosulfat). MTS-reagent se v celicah reducira v formazanski produkt, ki absorbira svetlobo pri valovni dolžini 490 nm (66).

Postopek izvedbe testa je bil sledeč: najprej smo si pripravili suspenzijo izbrane celične kulture v koncentraciji 1×10^5 celic/mL v mediju RPMI 1640. Suspenzijo celic smo alikvotirali po 700 μ L na ustrezno mikrotitrsko ploščico. Celice smo nato tretirali z raztopinami spojin, pripravljenih v DMSO, v ustreznih koncentracijah. Ena vdolbinica je vsebovala le celično kulturo in je služila kot kontrola, ena vdolbinica pa je vsebovala le medij RPMI 1640 in je služila kot slepa proba. Po tretiranju smo celice v triplikatu po 100 μ L prenesli na eno ali dve mikrotitrski ploščici s 96 vdolbinicami (prva za 24-urno stimulacijo in po potrebi druga za 48-urno). Inkubacija je potekala v inkubatorju pri temperaturi 37 °C in 5 % CO₂. Po preteklelem času smo v vsako vdolbinico dodali po 15 μ L MTS-reagenta ter ploščico postavili nazaj v inkubator za 2–3 ure. Po koncu inkubacije smo ploščice pomerili na spektrofotometru pri valovni dolžini 492 nm. Naredili smo tri biološke ponovitve in rezultate podali relativno glede na kontrolno skupino.

6.2.3 Analiza celičnega cikla

Z analizo celičnega cikla določimo delež celic v posameznih fazah celičnega cikla. Večina celic v našem organizmu se razmnožuje s procesom mitoze. Delitev poteka v več fazah. V prvi fazi G1 celica raste in se pripravlja za sintezo DNA. V sledeči fazi S pride do podvajanja dednega materiala. Na začetku diploidna celica po koncu faze S postane tetraploidna. Sledi faza G2, ko celica raste in se pripravlja na mitozo. Zadnja faza (faza M) je delitev celice. V primeru, da celica izstopi iz celičnega cikla in se ne deli, pravimo, da je v fazi G0. Analiza celičnega cikla temelji na možnosti barvanja DNA z ustreznimi spojinami (npr. propidijev jodid, PI) v stehiometričnem razmerju. To pomeni, da je trenutna količina DNA, ki se med razmnoževanjem podvoji, v celici direktno sorazmerna količini vezanega barvila (67).

Celice smo gojili v mediju RPMI 1640 do ustrezne gostote. Pripravili smo potreben volumen celične suspenzije s koncentracijo 5×10^5 celic/mL. Na ustrezno mikrotitrsko ploščico smo razdelili suspenzijo po 1 mL na vdolbinico. Ena vdolbinica je služila za kontrolo, preostali dve pa smo tretirali z izbranimi spojinama za 24 ur. Celice smo nato 5 min centrifugirali pri 1500 rpm, jih sprali z 1 mL PBS ter fiksirali v 4 mL absolutnega etanola, 15 min pri -20 °C. Sledilo je ponovno centrifugiranje in rehidracija celic v 5 mL PBS, 15 min pri sobni temperaturi. Vmes smo pripravili 3 μ M raztopino propidijevega jodida v pufru za barvanje. Celice smo po rehidraciji ponovno centrifugirali, odstranili PBS in jih resuspendirali v 500 μ L raztopine propidijevega jodida ter močno premešali s pipeto. Po 15-minutni inkubaciji pri sobni temperaturi, med katero so bile zaščitene pred svetlobo, smo celice analizirali s pretočnim citometrom.

6.2.4 Test aneksin V/7-AAD

Test aneksin V/7-AAD se uporablja za ugotavljanje mehanizma celične smrti. Temelji na vezavi s fluorokromom (npr. fitoeritrin) označenega aneksina V na fosfatidilserin (PS), ki se v procesu apoptoze eksternalizira na površje celične membrane. Ponavadi se za spremljanje celične smrti v kombinaciji z aneksinom V uporablja še 7-AAD (7-aminoaktinomicin D), ki se veže na DNA. Žive celice se ne obarvajo z nobenim od omenjenih barvil. Zgodnje apoptotične celice se obarvajo le z aneksinom V, ne pa tudi s 7-AAD, saj je integriteta membrane še ohranjena in omogoča njegovo izločanje. Celice v pozni apoptozi ali nekrotične celice se obarvajo z obema reagentoma. Med njimi ni moč razlikovati, razen v primeru, da spremljamo potek barvanja s časom (68).

Za izvedbo testa smo uporabljali predhodno pripravljen kit (PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I). Celice Ramos ($3,5 \times 10^5$ celic/mL) smo tretirali z izbrano spojino za določen čas. Nato smo jih dvakrat sprali s hladnim pufrom PBS ter resuspendirali v pufru za barvanje do koncentracije 1×10^6 celic/mL skladno z navodili proizvajalca. 100 μ L te suspenzije smo prenesli v 5-mL tubo ter ji dodali po 5 μ L reagentov aneksina V in 7-AAD. Celice smo nežno vorteksirali in jih 15 min inkubirali zaščitene pred svetlobo. Na koncu smo dodali še 400 μ L puфра za barvanje in vzorce analizirali na pretočnem citometru.

6.2.5 Izolacija in merjenje koncentracije proteinov

Celice smo tretirali z izbrano spojino v želeni koncentraciji določen čas. Nato smo jih 5 min centrifugirali na 1200 rpm in sprali z 1 mL PBS. Potem smo jih 5 min centrifugirali na 3000 rpm, peletu resuspendirali v ledenem lizirnem pufru RIPA, in sicer 100 μ L puфра na 5×10^6 celic. Celične lizate smo sonicirali in nato 30 min stresali na ledu na stresalniku. Sledilo je centrifugiranje pri 15000 rpm 15 min pri 4 °C. Supernatant smo odpipetirali in po potrebi shranili pri temperaturi -80 °C ali pa takoj nadaljevali z delom.

Za merjenje koncentracije proteinov smo odpipetirali po 4 μ L proteinov na vzorec in jim dodali 8 μ L puфра RIPA. Koncentracijo proteinov smo merili z DC-metodo (Bio-Rad DC Protein Assay Kit I). Gre za posodobljeno Lowryjevo metodo merjenja koncentracije proteinov, ki temelji na solubilizaciji proteinov z detergentom. Proteini v bazičnem okolju reagirajo z raztopino bakrovega tartrata, v naslednji stopnji sledi redukcija Folinovega reagenta (1,2-naftokinon-4-sulfonat) in značilno modro obarvanje z maksimumom absorbanca pri 750 nm.

Pripravili smo si standarde proteinov iz BSA v koncentracijah 0,2, 0,5, 0,8, 1,0 in 1,5 mg/mL v pufru RIPA in jih v triplikatu po 5 μ L na vdolbinico nanegli na mikrotitrsko ploščico. Vzorčke smo nanegli v duplikatu po 5 μ L na vdolbinico. Za slepo probo smo uporabili le pufer RIPA. V vsako vdolbinico smo nato dodali po 25 μ L reagenta A' (sestavljen iz 1 mL reagenta A – bazična raztopina bakrovega tartrata – in 20 μ L reagenta S – surfaktant) in nato po 200 μ L reagenta B (Folinov reagent). Vzorčke smo nato 15 min inkubirali pri sobni temperaturi in pomerili absorbanco na spektrofotometru pri 750 nm. Na osnovi rezultatov meritev standardov proteinov smo z linearno regresijo dobili enačbo in izračunali koncentracije proteinov v vzorcu (69).

6.2.6 Merjenje aktivnosti kaspaz-3/-7

Aktivnost kaspaz-3/-7 smo merili v celičnem lizatu z uporabo luminogenega substrata, ki vsebuje tetrapeptidno zaporedje DEVD. Kaspazi-3/-7 selektivno prepoznata to zaporedje in ga cepita, pri čemer se sprosti AFC (7-amino-4-trifluorometil kumarin), ki po vzbujanju pri valovni dolžini 405 nm fluorescira pri valovni dolžini 535 nm.

Celice Ramos smo tretirali z izbranimi spojinami in inkubirali 4, 8, 16 in 24 h. Kot pozitivna kontrola nam je služil TPCK (70). Po pretekli inkubaciji smo vzeli $2,0 \times 10^6$ celic, jih dvakrat sprali s PBS in resuspendirali v 200 μ L ledenega kaspaznega lizatnega pufra, sonicirali in pustili na ledu 30 min. Sledilo je centrifugiranje pri 14000 g 15 min pri 4 °C. Koncentracijo proteinov v lizatih smo izmerili z DC-metodo v skladu s predhodno opisanim postopkom. Po 20 μ g proteinov smo nato prenesli na ustrezno mikrotitrsko ploščico skupaj s kaspaznim reakcijskim pufrom in inkubirali pri 37 °C 30 min. Potem smo dodali 100 μ M reagenta Ac-DEVD-AFC ter takoj začeli kontinuirano meriti fluorescenco s spektrofotometrom pri vzbujevalni valovni dolžini 405 nm in emisijski valovni dolžini 535 nm. Rezultate smo podali kot porast fluorescence na enoto časa (dF/dt).

6.2.7 Prenos po Westernu

Prenos po Westernu je kvalitativna in semikvantitativna metoda za določanje proteinov. V prvem koraku proteine ločimo z gelsko elektroforezo. Sledi prenos na nitrocelulozno membrano ali drug sekundarni matriks. Membrano nato blokiramo (na prosta mesta membrane vežemo proteine iz mleka), da preprečimo nespecifično vezavo protiteles. V naslednjem koraku na membrano naneseimo protitelesa proti želenemu proteinu, ki so lahko označena z encimom ali fluorescentnim barvilom. Druga možnost je, da po vezavi primarnih protiteles dodamo označena sekundarna, ki so usmerjena proti primarnim. Detekcija navadno poteka s pomočjo CCD-kamere. V primeru encimske označbe protitelesa membrano inkubiramo z ustreznim substratom, pri čemer se tvori kromogen produkt, ki ga nato lahko detektiramo (71).

Celice Ramos (1×10^6 celic/mL) smo tretirali z izbrano spojino določen čas. Celice smo nato sprali s PBS, lizirali v lizatnem pufu RIPA in izolirali proteine po protokolu. Supernatantu smo pomerili koncentracijo proteinov z DC-metodo ter pripravili ustrezne redčitve vzorcev za elektroforezo v prečiščeni vodi. Slednja je potekala na 8 % SDS-poliakrilamidnem gelu. Gel je sestavljen iz dveh delov. V zgornjem oz. koncentracijskem

gelu pride do zgostitve proteinov v eno linijo. Posledica tega je, da vsi proteini nato hkrati preidejo na spodnji oz. ločilni gel, kjer nato poteče ločba proteinov na osnovi njihove velikosti. Vzorčke smo pred nanosom redčili z nanašalnim pufrom SLB do končne koncentracije 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Vzorčke smo nato za 5 min postavili v vrelo vodo, nato pa takoj na led. Na gel smo nanесли po 30 μL posameznega vzorčka na luknjico, na začetku pa še 4 μL označevalca velikosti proteinov (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard). Elektroforeza je potekala v pufru Tris-glicin pri napetosti 100 V in toku 400 mA približno 2 uri.

Po poteku ločbe proteinov je sledil prenos po Westernu na nitrocelulozno membrano. Prenos je potekal na posebni aparaturi TOASTER skladno s proizvajalčevimi navodili. Membrano smo po prenosu sprali v pufru TTBS. Sledila je enourna inkubacija membrane v 5 m/V % mleku v TTBS. Nato smo membrano ponovno sprali trikrat po 5 min v TTBS ter jo dali inkubirati čez noč na 4 °C v raztopino izbranih protiteles, pripravljenih po proizvajalčevih navodilih v 3 % BSA v TTBS ali 5 % mleku v prahu v TTBS. Naslednji dan smo membrano sprali v TTBS trikrat po 5 min ter jo dali inkubirati z ustreznimi sekundarnimi protitelesi, pripravljenimi v 5 % mleku v prahu v TTBS, za 1 uro pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo membrano sprali v TTBS šestkrat po 5 min. Sekundarna protitelesa so konjugirana z encimom peroksidaza, ki po dodatku ustreznih reagentov (SuperSignal® West Femto substrate) tvori kemiluminiscenčen produkt. Po slikanju z napravo G-box smo membrano ponovno sprali s TTBS in jo inkubirali v pufru za odstranjevanje vezanih protiteles 1 uro pri 60 °C. Na ta način smo lahko membrano ponovno uporabili za označevanje z drugimi protitelesi.

6.2.8 Test Quanti-Blue™

Quanti-Blue™ je kolorimetrični encimski test za določanje aktivnosti alkalnih fosfataz v biološkem vzorcu. V primeru prisotnosti alkalne fosfataze v vzorcu pride do spremembe barve iz roza v vijolično/modro (72).

Celice Ramos-Blue™ smo 1 uro predinkubirali z izbrano spojino. Nato smo jih tretirali z rekombinantnim TNF α (aktivator signalne poti NF- κ B) v koncentraciji 100 ng/mL ter inkubirali 8 ur. Po preteklem času smo odpipetirali po 40 μL supernatanta na vzorec na mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbnicami in dodali po 160 μL reagenta Quanti-Blue™. Mikrotitrsko ploščico smo pri 37 °C inkubirali do spremembe barve in nato pomerili na spektrofotometru Tecan Safire2 pri valovni dolžini med 620 in 655 nm.

6.2.9 2D-elektroforeza

2D-elektroforeza je metoda za analizo kompleksnih proteinskih vzorcev iz celic, tkiv ali drugih bioloških vzorcev. Proteine ločimo v dveh korakih na osnovi njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti. Prvi korak je izoelektrično fokusiranje, kjer proteine ločimo na osnovi njihove izoelektrične točke. V drugem koraku sledi SDS-poliakrilamidna gelska elektroforeza (SDS-PAGE), kjer proteine v drugi dimenziji ločimo na osnovi njihove molekulske mase. Proteine na gelu vizualiziramo bodisi z avtoradiografijo ali fluorografijo, ki sta visoko občutljivi metodi, bodisi z neradioaktivnimi metodami, kot na primer s srebrovim nitratom ali barvilom Coomassie, ki so manj občutljive. 2D-elektroforezo lahko uporabimo za analizo proteoma, celično diferenciacijo, raziskave malignih obolenj, detekcijo bolezenskih označevalcev in drugo (73).

2D-elektroforezo smo delali po sledečem postopku. Najprej smo pripravili celične lizate. V vsakem vzorcu je bilo približno 1×10^7 celic. Po tretiranju z želeno spojino za 6 ur smo celice centrifugirali in dvakrat sprali s PBS. Nato smo jih lizirali v 100 μ L lizatnega pufra. Celične lizate smo nato sonicirali, 30 min stresali na ledu, 15 min centrifugirali pri 4 °C in 15000 rpm. Supernatant smo prenesli v svežo tubico ter pomerili koncentracijo proteinov. Ustrezno količino vzorca, ki ustreza 100 μ g proteinov, smo zmešali z 250 μ L rehidracijskega pufra. Trakove z gelom smo nato čez noč pustili namočene v raztopini vzorca in pokrite s 3 mL mineralnega olja. Po končani rehidraciji smo trakove sprali v bidestilirani vodi ter jih nato položili v nastavek za izoelektrično fokusiranje, kamor smo nalili 108 mL mineralnega olja. Sledilo je izoelektrično fokusiranje v štirih stopnjah po navodilih proizvajalca. Trakove smo po koncu shranili na -80 °C. Pred elektroforezo smo trakove uravnotežili s stresanjem v pufro za uravnoteženje I in II, obakrat po 15 min. Elektroforeza je potekala na 12 % poliakrilamidnem gelu (ločilni gel), nad njim pa je bil agarozni gel, kamor smo potopili trakove z vzorci. Elektroforeza je potekala 30 min pri 150 V, nato pa približno 3 ure pri 250 V. Sledilo je barvanje gelov, in sicer smo uporabili metodo s srebrovim nitratom. Potekalo je v osmih stopnjah: prvi korak je bila fiksacija, sledilo je predtretiranje, izpiranje (ddH₂O), barvanje, izpiranje, razvijanje, prekinitev reakcije in izpiranje. Gele smo na koncu slikali in obdelali s programom Dymension.

6.2.10 Statistična analiza

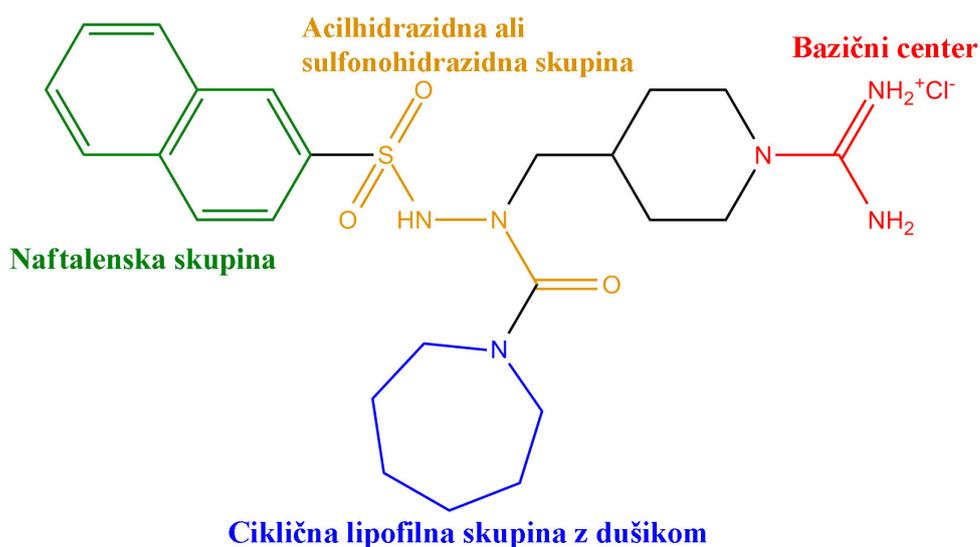
Rezultate smo podali kot povprečje 3 bioloških ponovitev skupaj s standardnim odklonom in jih statistično ovrednotili z uporabo eno- ali dvostranskega Studentovega t-testa ob upoštevanju 5 % tveganja.

7 Rezultati in razprava

7.1 Vrednotenje citotoksičnega učinka zaviralcev serinskih proteaz

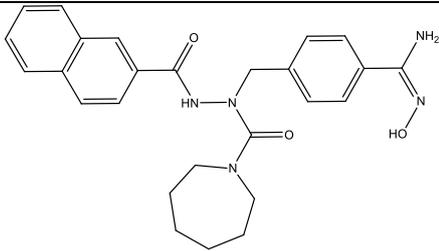
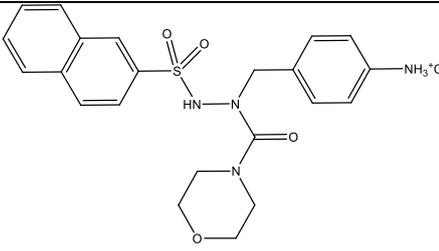
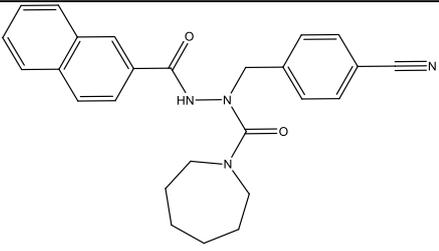
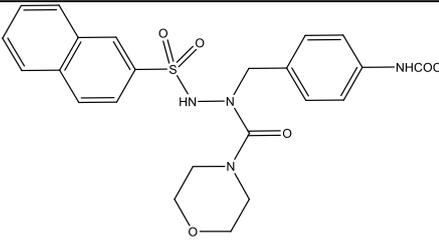
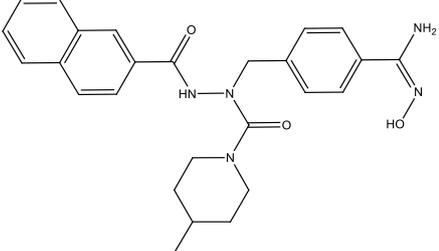
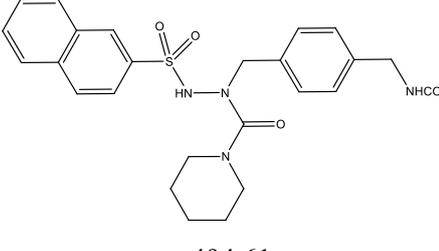
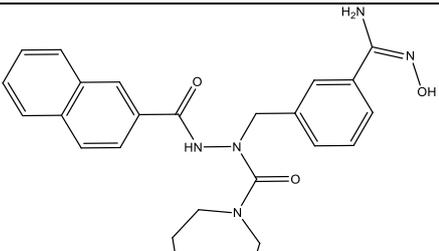
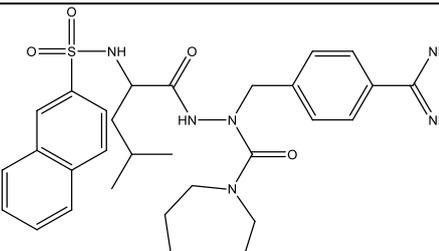
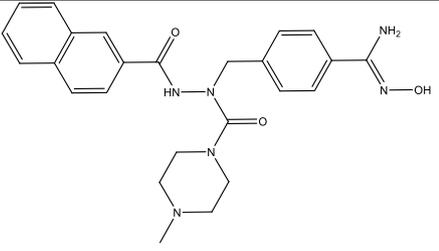
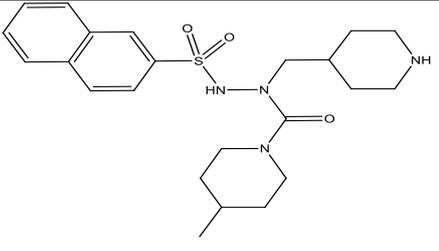
Prvi korak raziskovalnega dela je bil ovrednotenje učinkov 23-ih spojin (Tabela I) acilhidrazidnega in sulfonohidrazidnega tipa na celični liniji Ramos. V prejšnjih raziskavah so dokazali, da spojine tega tipa zavirajo serinske proteaze (trombin, tripsin, faktor Xa) (74). Na celičnih linijah Ramos in WEHI 231 je bilo ugotovljeno, da spojine sprožijo od kaspaz odvisno apoptozo. Študija odvisnosti med strukturo in aktivnostjo (SAR) je pokazala, da sta za citotoksično aktivnost teh spojin pomembni močno bazična skupina, ki lahko tvori pozitivni naboj, in velika hidrofobna naftalenska skupina (75).

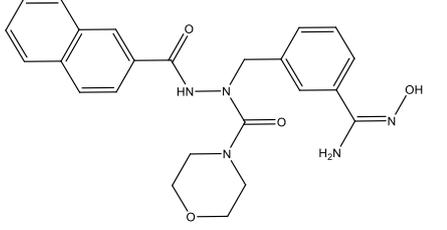
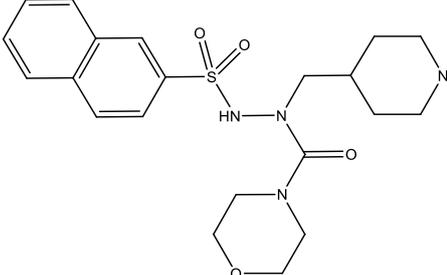
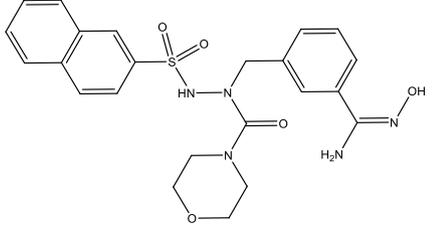
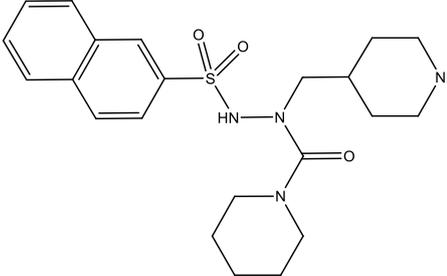
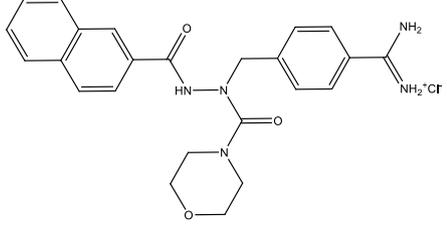
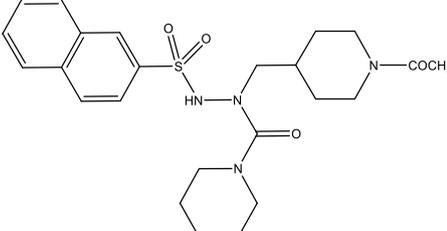
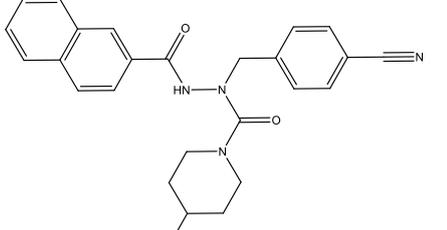
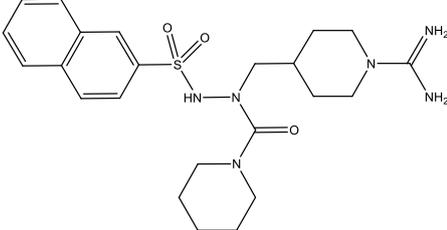
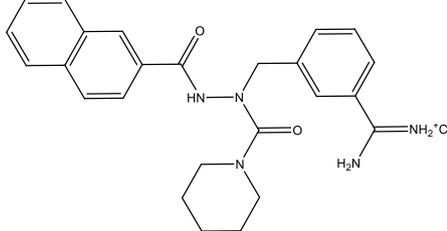
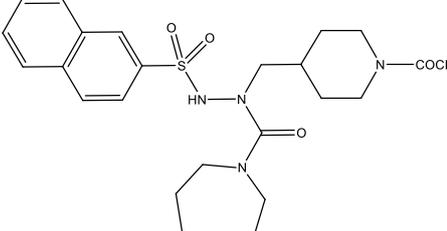
S spreminjanjem posameznih skupin ob upoštevanju ugotovitev SAR-študije so na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo sintetizirali različne analoge teh spojin. Strukturne značilnosti teh skupin so povzete na spodnji sliki (Slika 6). Spojine se razlikujejo predvsem v bazični skupini in ciklični lipofilni skupini z dušikom.

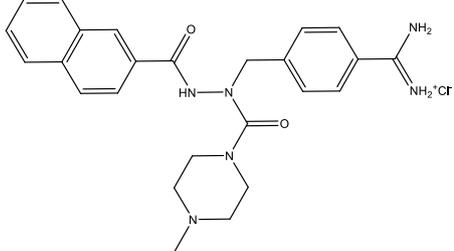
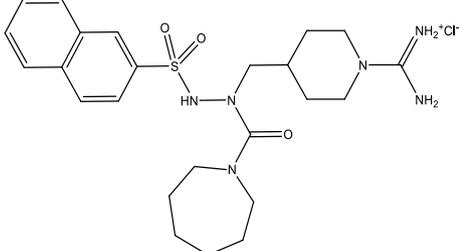
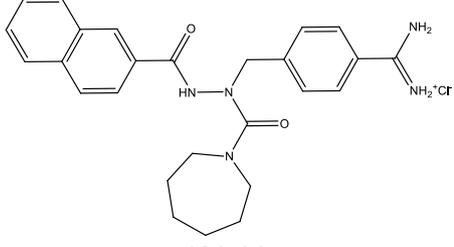


Slika 6: Splošna struktura acilhidrazidnih in sulfonohidrazidnih zaviralcev serinskih proteaz. Osrednji del molekule (rumena) predstavlja acilhidrazidna ali sulfonohidrazidna struktura. Naftalenska skupina (zelena) je nesubstituirana. Ciklična lipofilna skupina z dušikom (modra) je lahko piperidin, morfolin ali sedemčlenski obroč z dušikom. Bazična skupina (rdeča) je lahko gvanidinska, hidroksiamidinska, piperidinska,aminska ipd. Na osrednji del molekule (rumena) je vezana prek distančnika, ki je lahko bodisi fenilni obroč bodisi nasičen šestčlenski obroč.

Tabela I: Strukture spojin z zaporedno številko in molekulska masa.

Oznaka spojine	Struktura Molska masa [g/mol]	Oznaka spojine	Struktura Molska masa [g/mol]
<u>1</u>	 459,54	<u>13</u>	 476,98
<u>2</u>	 426,51	<u>14</u>	 482,55
<u>3</u>	 459,54	<u>15</u>	 494,61
<u>4</u>	 459,54	<u>16</u>	 629,21
<u>5</u>	 460,53	<u>17</u>	 444,59

<p>6</p>	 <p>447,49</p>	<p>18</p>  <p>432,54</p>
<p>7</p>	 <p>483,54</p>	<p>19</p>  <p>430,56</p>
<p>8</p>	 <p>467,95</p>	<p>20</p>  <p>472,60</p>
<p>9</p>	 <p>426,51</p>	<p>21</p>  <p>480,00</p>
<p>10</p>	 <p>486,63</p>	<p>22</p>  <p>486,63</p>

<p>11</p>	 <p>480,99</p>	<p>23</p>	 <p>523,09</p>
<p>12</p>	 <p>480,00</p>		

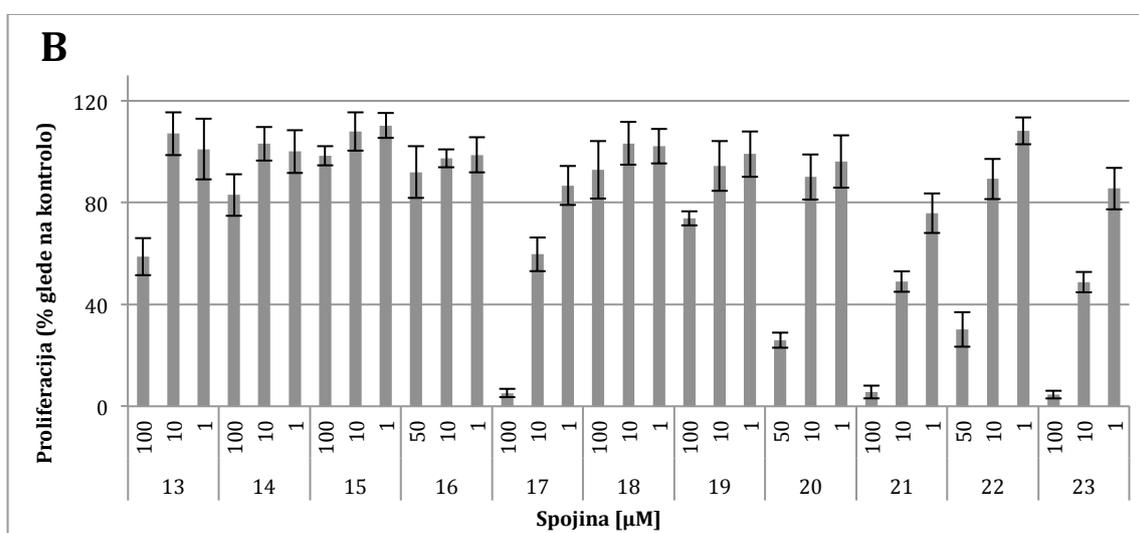
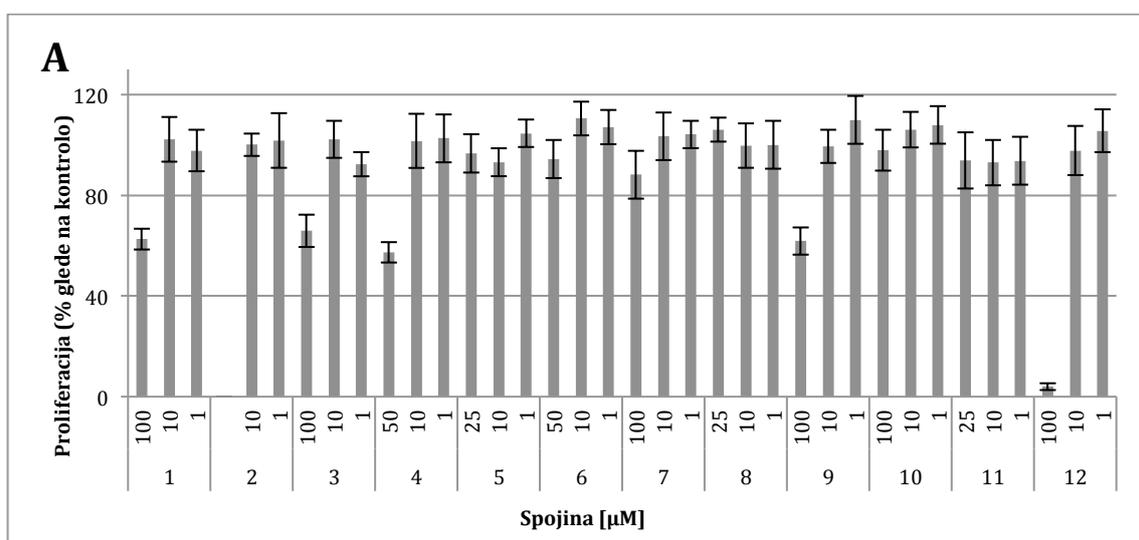
Citotoksičnost spojin smo ovrednotili s testom MTS na celični liniji Ramos. Uporabili smo do tri različne koncentracije posamezne spojine, in sicer 1 μM , 10 μM ter 25, 50 ali 100 μM , odvisno od topnosti spojine. Po dodatku MTS-reagenta smo ploščico inkubirali 2–3 ure in pomerili absorbanco pri valovni dolžini 492 nm. Rezultate smo podali kot delež presnovne aktivnosti tretiranih celic glede na kontrolo.

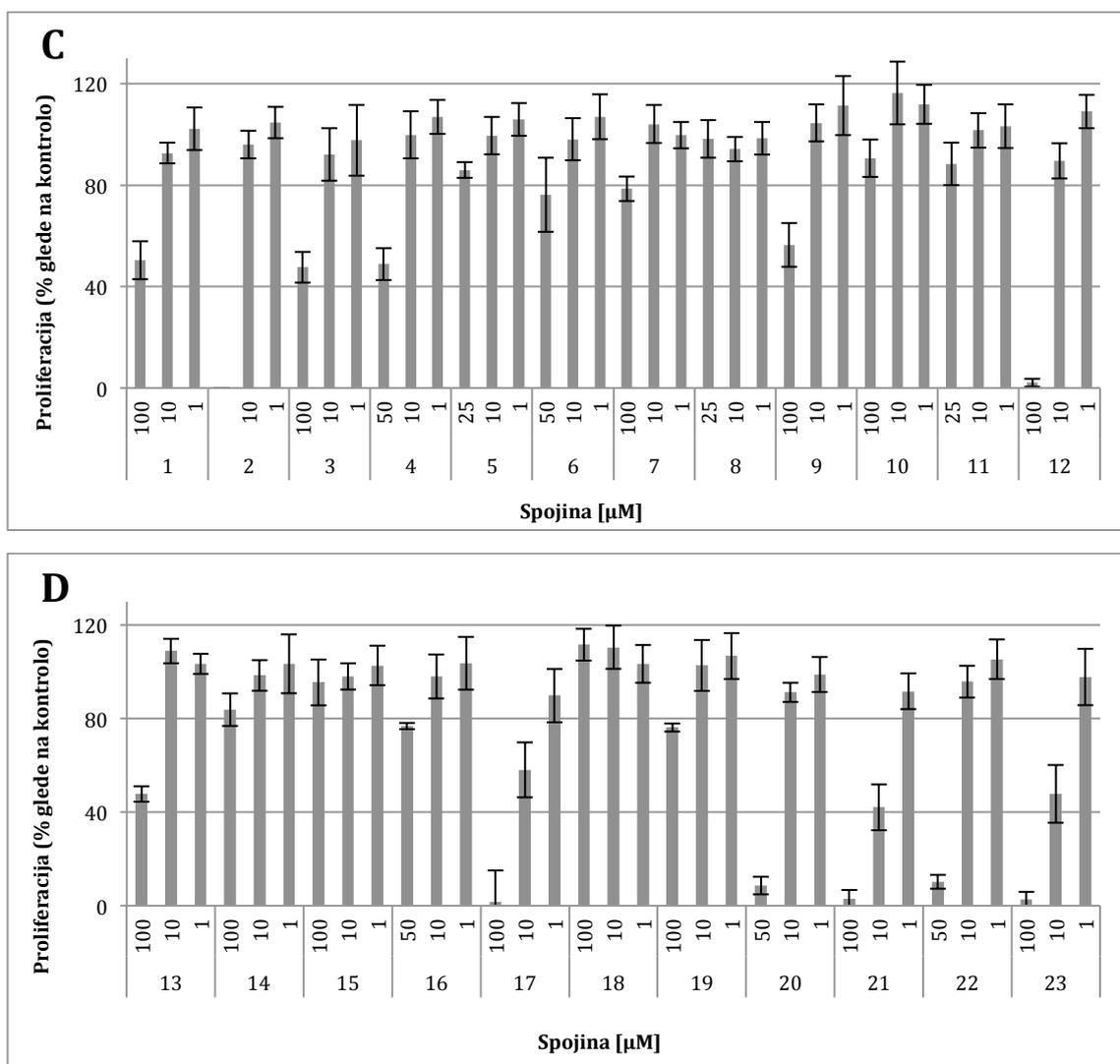
Na osnovi dobljenih rezultatov (Slika 7) lahko spojine po citotoksičnosti razdelimo v tri skupine. Spojine **5**, **6**, **7**, **8**, **10**, **11**, **14**, **15**, **16**, in **18** imajo šibek učinek na presnovno aktivnost celic, saj njena vrednost ne pade pod 80 % kontrolne vrednosti. Spojino **2** smo zaradi slabe topnosti ovrednotili le do 10 μM koncentracije, iz rezultatov pa vidimo, da učinka na presnovno aktivnost celic ni. Spojine **1**, **3**, **4**, **9**, **13** in **19** so zmerno citotoksične v najvišji koncentraciji. Presnovna aktivnost je znotraj intervala od 40 do 80 %. Tretja skupina spojin je močno citotoksična za celice Ramos in zmanjša presnovno aktivnost v najvišji koncentraciji pod 40 % kontrolne vrednosti. V to skupino sodijo spojine **12**, **17**, **20**, **21**, **22** in **23**. Spojina **12** v 100 μM koncentraciji skoraj popolnoma ustavi presnovo celic, medtem ko pri nižjih koncentracijah učinka praktično ni. Spojina **17** ima prav tako močan učinek v najvišji koncentraciji, pri 10 μM pa aktivnost presnove pade na približno 60 % kontrolne vrednosti. Spojini **20** in **22** imata podoben učinek kot spojina **12**. Tudi spojini **21** in **23** sta močno citotoksični pri 100 μM koncentraciji, pri 10 μM je presnovna aktivnost približno polovica kontrolne, pri najnižji koncentraciji pa 80 %.

Po 48 urah so bili rezultati zelo podobni rezultatom po 24 urah. Ponekod pri zmerno in močno citotoksičnih spojinah je močnejše izražen učinek pri najvišjih koncentracijah. Po 48

urah je tako pri spojinah **1**, **3**, **4**, **9** in **13** presnovna aktivnost celic približno 50 % kontrolne vrednosti (prej 60 %). Opazimo tudi povečan učinek pri spojinah **20** in **22** pri najvišji koncentraciji. Citotoksični učinek pa je manjši pri najnižji koncentraciji pri spojinah **21** in **23**.

Če povzamemo, spojine **12**, **17**, **20**, **21**, **22** in **23** so bile močno citotoksične na celicah Ramos. Z ozirom na njihovo strukturo, opazimo določene podobnosti v strukturi. Bazična skupina je pri spojinah **21** in **23** amidinopiperidinska, pri spojini **12** pa amidinska. Pri spojini **17** je ta skupina piperidin, pri spojinah **20** in **22** pa *N*-acetiliran piperidin, vendar v celicah verjetno pride do hidrolize amida in nastanka piperidinske skupine. Ciklična lipofilna skupina z dušikom je v večini primerov nasičen šest- ali sedemčlenski obroč, pri spojini **17** pa je prisoten šestčlenski obroč z metilno skupino na para mestu. Naftalenska skupina je na preostali del molekule večinoma vezana prek sulfonske skupine, pri spojini **12** pa prek karbonilne skupine.





Slika 7: Citotoksičnost zaviralcev serinskih proteaz na celični liniji Ramos. Grafa (A) in (B) predstavljata rezultate testa MTS po 24-urni inkubaciji s spojinami. Grafa (C) in (D) predstavljata rezultate po 48-urni inkubaciji.

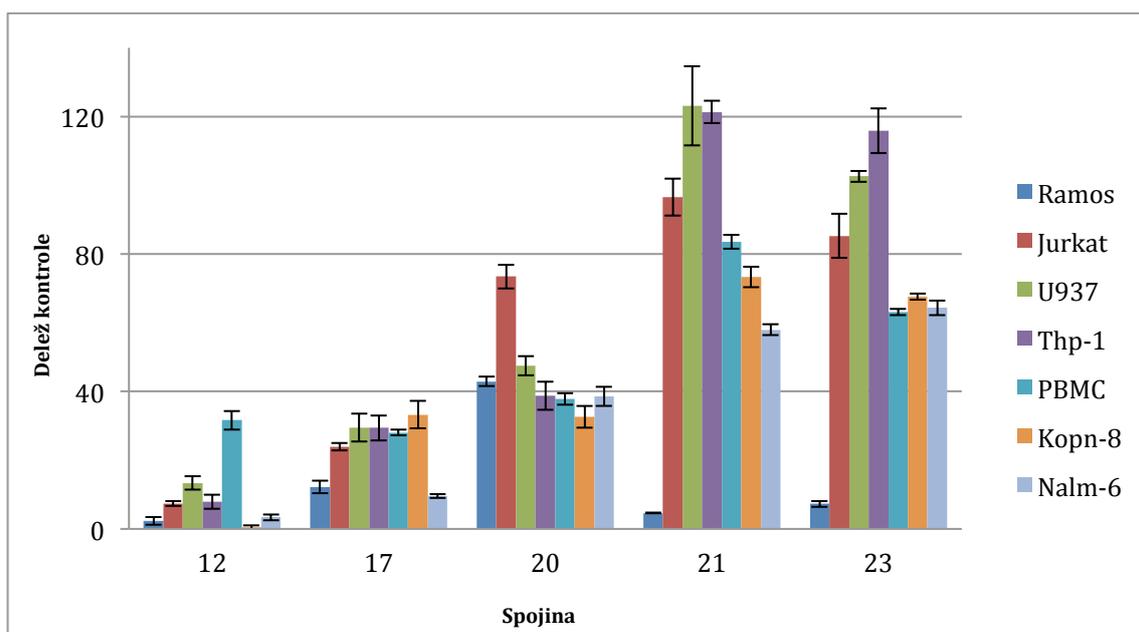
7.2 Selektivna toksičnost proti celicam iz Burkittovega limfoma

Na osnovi rezultatov prvega dela smo se odločili, da bomo za nadaljnje delo uporabili spojine **12**, **17**, **20**, **21** in **23**. Te spojine so se izkazale za citotoksične na celični liniji Ramos, zato smo kot naslednji korak želeli ovrednotiti njihovo aktivnost še na drugih levkemičnih/limfomskih celičnih linijah. Uporabili smo sledeče celične linije: Nalm-6 (nezreli limfociti B iz ALL), Kopn-8 (nezreli limfociti B iz ALL), Jurkat (limfociti T iz ALL), U937 (monociti iz difuznega histocitnega limfoma), Thp-1 (promonociti iz AML), PBMC (periferne krvne mononuklearne celice – monociti, limfociti in makrofagi).

Potek testa je bil podoben testu MTS na celični liniji Ramos. Celice smo tretirali z izbranimi spojinami, pripravljenimi v DMSO v 50 μM koncentraciji. Po dodatku MTS-

reagenta in inkubaciji, ki je trajala 2–3 ure, smo pomerili absorbanco in rezultate podali kot delež kontrole.

Na osnovi rezultatov lahko spojine razdelimo v dve skupini. V prvi skupini se nahajajo spojine **12**, **17** in **20**, ki izkazujejo močan citotoksični učinek na vseh celičnih linijah. Spojina **12** zniža presnovno aktivnost pod 15 % kontrolne vrednosti pri vseh celičnih linijah, le pri PBMC je vrednost okoli 30 %. Pri spojini **17** je presnovna aktivnost celic povesod pod 40 % vrednosti kontrole. Pri spojini **20** je učinek pri posameznih celičnih linijah okoli 40 % kontrolnih vrednosti, le pri celicah Jurkat je vrednost okoli 70 %. V drugo skupino spadata spojini **21** in **23**, ki sta močno citotoksični le na celice Ramos, kjer aktivnost presnove pade pod 10 % kontrolne vrednosti. Na vseh ostalih celičnih linijah izražata spojini zmeren do blag učinek. Tako je na primer citotoksičnost spojin pri drugih B-limfocitnih linijah (Nalm-6, Kopn-8) zmerna (vrednost okoli 60 %). Še manjši pa je učinek na celicah Jurkat, Thp-1 in U937, kjer je vrednost presnovne aktivnosti nad 80 % kontrolne vrednosti.



Slika 8: Selektivna citotoksičnost spojin za celice iz Burkittovega limfoma. Spojine **12**, **17** in **20** so močno ali zmerno citotoksične na vseh celičnih linijah. Spojini **21** in **23** sta močno citotoksični le na celični liniji Ramos, na ostalih linijah pa je toksičnost zmerna ali blaga.

Spojini **21** in **23** sta torej selektivno toksični za limfocite B, ki izvirajo iz Burkittovega limfoma. Aktivnost presnove se pri celicah Ramos zniža pod 10 % kontrolne vrednosti. Citotoksičnost na ostalih B-limfocitnih celičnih linijah (Nalm-6, Kopn-8) pa je zmerna. Na monocitnih in T-limfocitnih celičnih linijah imata spojini le šibek učinek. Po

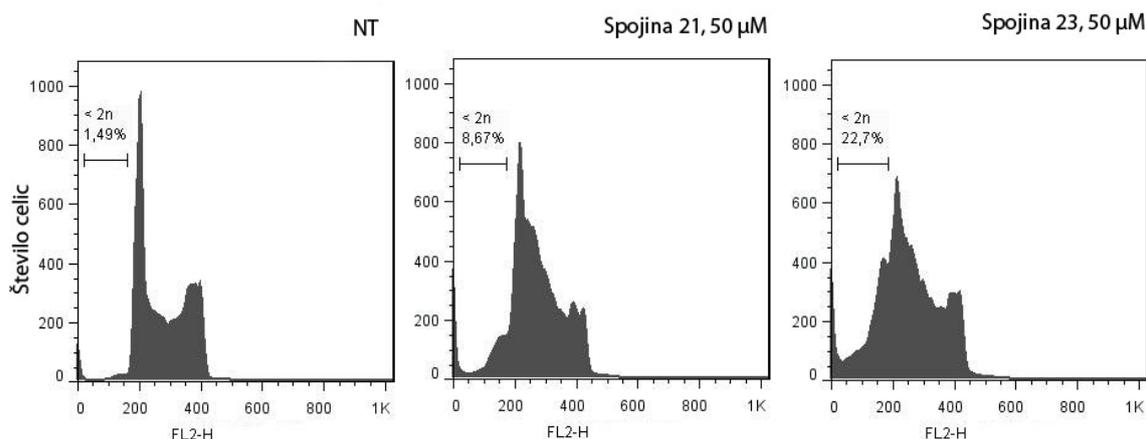
drugi strani so spojine **12**, **17** in **20** neselektivno toksične pri vseh testiranih celičnih linijah.

Če pogledamo strukturne razlike med obema skupinama spojin, vidimo, da je za selektivno toksičnost potrebna amidinopiperidinska skupina. Piperidin, *N*-acetiliran piperidin ali amidin v tem primeru ne dajejo selektivno toksičnih spojin. Ciklična lipofilna skupina z dušikom je lahko šest- ali sedemčlenski nasičen obroč, osrednji del molekule pa predstavlja sulfonohidrazidna struktura.

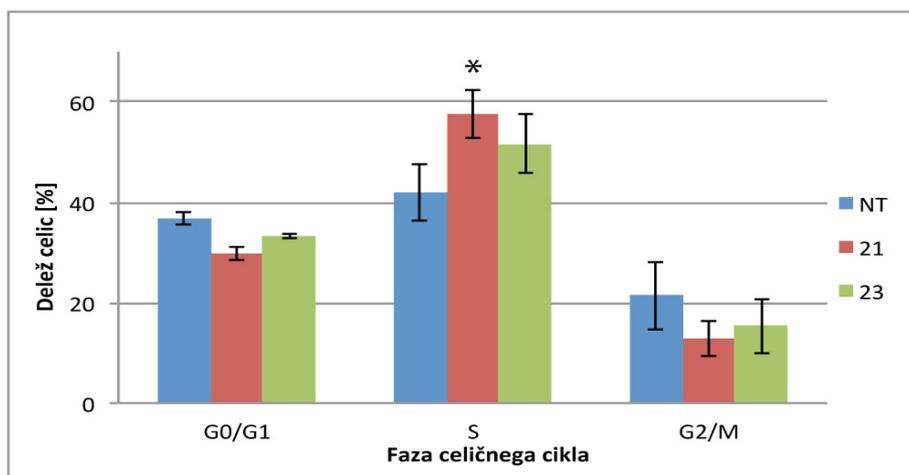
7.3 Zmanjšana presnovna aktivnost celic kot posledica povečane smrtnosti

V naslednjem koraku smo z analizo celičnega cikla ovrednotili, ali je zmanjšana presnovna aktivnost posledica smrti celic. Analizo smo izvedli na celični liniji Ramos po 24-urni inkubaciji s spojino **21** ali **23** v 50 μ M koncentraciji. Rezultati so podani v obliki histograma, ki prikazuje število celic z določeno količino DNA, ki je sorazmerna količini vezanega propidijevega jodida.

Na sliki Slika 9 vidimo, da se pri celicah, ki smo jih tretirali s spojino **21** ali **23**, poveča delež mrtvih celic ($< 2n$, hipodiploidne) v primerjavi z netretiranimi celicami, in sicer z 1,49 % na 8,67 % pri spojini **21** in na 22,7 % pri spojini **23**. Prav tako lahko opazimo, da pride do kopičenja celic v S-fazi celičnega cikla, kar je prikazano tudi na spodnjem grafu (Slika 10). Vidimo, da se delež celic v S-fazi cikla poveča pri celicah, tretiranih s spojinama, posledično pa se zmanjša delež celic v ostalih fazah. Na osnovi omenjenih ugotovitev lahko zmanjšano presnovno aktivnost, ki smo jo ugotovili s testom MTS, pripišemo povečanemu številu mrtvih celic.



Slika 9: Povečana smrtnost celic po tretiranju z izbranimi spojinama. Iz rezultatov analize celičnega cikla je razvidno, da po tretiranju s spojinama **21** in **23** pride do povečanega deleža mrtvih celic ($< 2n$). NT – netretirane celice.

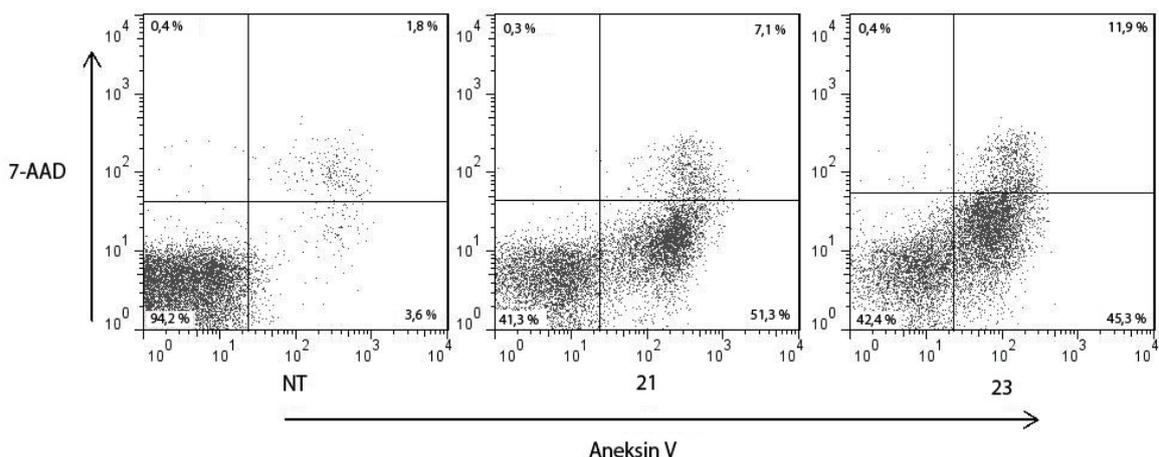


Slika 10: Zastoj celic v S-fazi celičnega cikla. Pri celicah Ramos pride po tretiranju s spojino **21** ali **23** do kopičenja celic v S-fazi celičnega cikla. NT – netretirane celice. Signifikantno različna vrednost je označena: *P<0,05.

7.4 Zaviralci serinskih proteaz sprožijo od kaspaz odvisno apoptozo

Preko analize celičnega cikla smo ugotovili, da spojini **21** in **23** povzročata smrt celic Ramos. Da bi ugotovili obliko celične smrti, smo naredili test aneksin V/7-AAD. V procesu apoptoze pride do eksternalizacije fosfatidilserina na površino membrane, nanj pa se veže aneksin V. Drugi reagent, 7-AAD, se lahko veže na DNA, vendar ga celice z ohranjeno integriteto membrane izločajo. Kombinacija obeh barvil nam tako omogoča razlikovanje med živimi celicami (aneksin V in 7-AAD negativne), apoptotičnimi celicami (aneksin V pozitivne in 7-AAD negativne) ter poznimi apoptotičnimi in nekrotičnimi celicami (aneksin V in 7-AAD pozitivne).

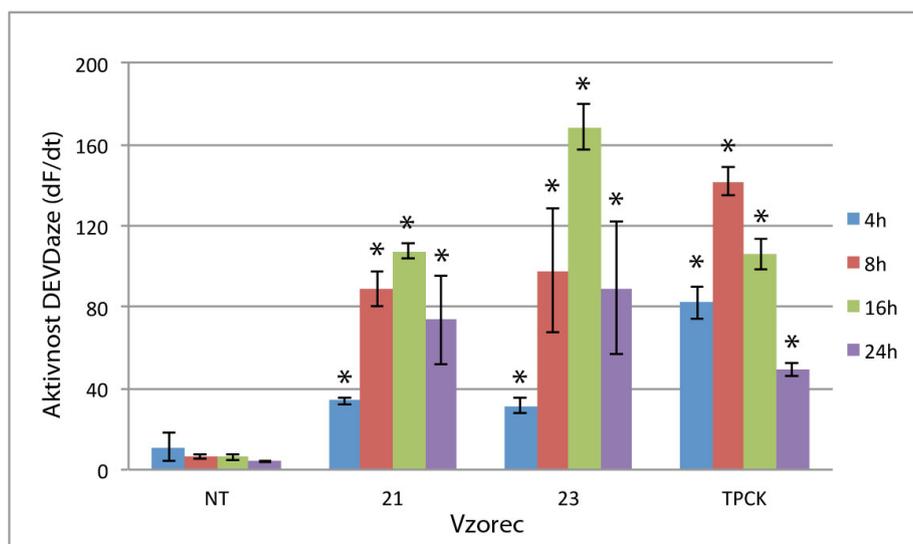
Celice Ramos smo 16 ur inkubirali s spojinama **21** in **23** v 50 μ M koncentraciji. Po barvanju z aneksinom V in 7-AAD smo dobili rezultate, ki jih prikazuje spodnji diagram (Slika 11). Delež živih celic (spodnji levi kvadrant) se je pri obeh spojinah zmanjšal za več kot polovico v primerjavi z netretiranimi celicami. Delež celic, ki so se obarvale le z aneksinom V (spodnji desni kvadrant; celice v zgodnji apoptozi), je pri spojini **23** narasel na 45 %, pri spojini **21** pa na 51 %. Pri obeh spojinah je narasel tudi delež celic, ki so se obarvale z obema reagentoma (zgornji desni kvadrant). Tako je bil pri spojini **21** delež mrtvih celic 7 %, pri spojini **23** pa skoraj 12 %.



Slika 11: Spojini **21** in **23** povzročita apoptotično celično smrt na celicah Ramos. Spodnji levi kvadrant predstavlja žive celice, spodnji desni zgodnje apoptotične, zgornji desni pa mrtve celice. Po tretiranju z izbrano spojino se sproži proces apoptoze, kar vidimo na sliki z močno povečanim deležem celic v spodnjem desnem delu ustreznega diagrama. Poveča se tudi delež mrtvih celic. NT – netretirane celice.

Da bi preverili, če spojini **21** in **23** sprožita od kaspaz odvisno apoptozo na celični liniji Ramos, smo naredili test aktivnosti kaspaz-3/-7. Celice Ramos smo tretirali s spojinama **21** in **23** v 50 μM koncentracijah. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili TPCK v 25 μM koncentraciji. TPCK namreč v nižjih koncentracijah sproži od kaspaz odvisno apoptozo. Celice smo s spojinami inkubirali 4, 8, 16 in 24 ur.

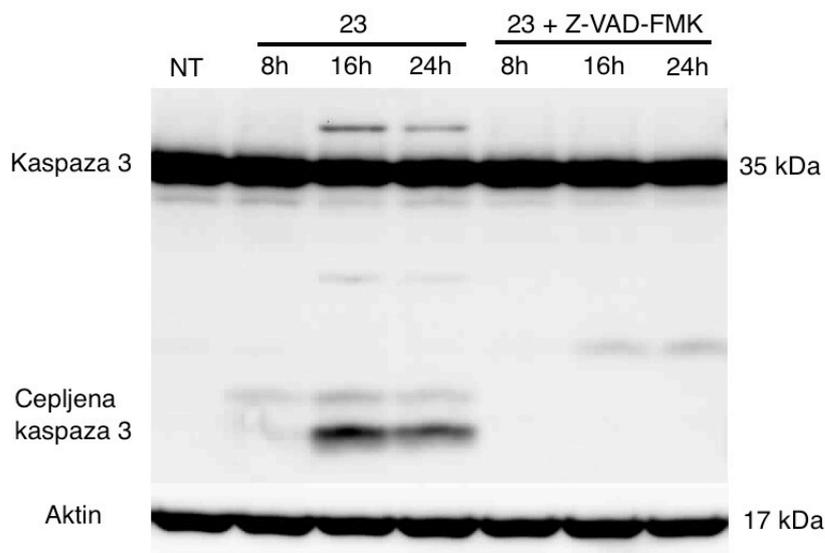
Iz rezultatov vidimo, da pri spojini **21** aktivnost kaspaz-3/-7 naraste že po 4 urah inkubacije s spojino, po 16 urah je aktivnost največja, potem pa začne po pričakovanju padati. Tudi pri spojini **23** aktivnost kaspaz-3/-7 močno naraste že po 4 urah inkubacije in vrh doseže po 16 urah, nato pa začne aktivnost upadati. TPCK, ki nam je služil kot pozitivna kontrola, kaže podoben profil aktivnosti kaspaz-3/-7. Aktivnost močno naraste že po 4 urah ter doseže maksimum po 8 urah, nato pa sledi padec. S tem smo potrdili, da pride po tretiranju celic Ramos s spojinama **21** in **23** do aktivacije kaspaz oz. sprožitve od kaspaz odvisne apoptoze.



Slika 12: Spojini **21** in **23** sprožita od kaspaz odvisno apoptozo. Pri obeh spojinah vidimo, da pride do aktivacije kaspaz-3/-7 z maksimumom po 16 urah. Podobno je tudi pri pozitivni kontroli, TPCK, le da je tu maksimum pri 8 urah. NT – netretirane celice. Signifikantno različna vrednost je označena: * $P < 0,05$.

Za potrditev ugotovitve, da spojini **21** in **23** sprožita od kaspaz odvisno apoptozo, smo naredili še prenos po Westernu. Celice Ramos smo tretirali s spojino **23** v $50 \mu\text{M}$ koncentraciji, in sicer brez in ob prisotnosti spojine Z-VAD-FMK (karbobenzoksi-valil-alanil-aspartil-[O-metil]-fluorometilketon) v koncentraciji $50 \mu\text{M}$. Z-VAD-FMK je pankaspazni zaviralec, ki se ireverzibilno veže v aktivno mesto kaspaz ter s tem prepreči njihovo delovanje in od njih odvisno apoptozo. Celice smo najprej predinkubirali 1 uro z Z-VAD-FMK, nato pa dodali spojino in inkubirali nadaljnjih 8, 16 in 24 ur. Po inkubaciji smo iz celic izolirali proteine po protokolu in naredili prenos po Westernu. Membrano smo inkubirali s protitelesi proti kaspazi-3.

Iz rezultatov je razvidno, da je že po 8 urah inkubacije s spojino **23** prišlo do aktivacije (cepitve) kaspaze-3, z maksimumom po 16 urah, nato pa je sledil upad. V primeru predinkubacije s pankaspaznim zaviralcem Z-VAD-FMK opazimo, da je slednji povsem preprečil aktivacijo kaspaze-3. Na ta način smo potrdili, da naše spojine res sprožijo od kaspaz odvisno apoptozo.



Slika 13: Spojina **23** sproži cepitev kaspaze-3. Po 8 urah opazimo, da pride do cepitve kaspaze-3 z maksimumom po 16 urah. V primeru predinkubacije z Z-VAD-FMK do cepitve kaspaze-3 ne pride. NT – netretirane celice.

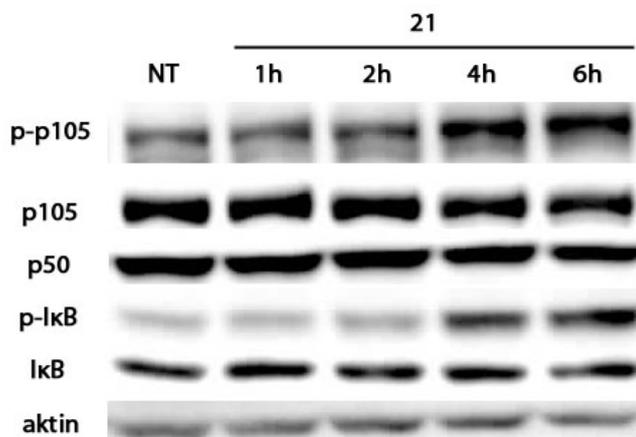
7.5 Vpliv na aktivacijo signalne poti NF- κ B

Kot omenjeno, celice Ramos konstitutivno izražajo NF- κ B, ki sodeluje pri procesu zaviranja apoptoze. V naslednji stopnji smo zato ovrednotili vpliv izbranih spojin na signalizacijo NF- κ B. Z metodo prenosa po Westernu smo določili stopnjo izraženosti proteina p105 in zaviralca I κ B v celicah Ramos. Določili smo tudi stopnjo izraženosti fosforiliranih oblik obeh proteinov. Fosforilaciji proteina I κ B namreč sledi njegova razgradnja v proteasomu, s tem pa se sprosti protein NF- κ B, ki v jedru sproži prepis genov. Prav tako tudi fosforilacija proteina p105 vodi do njegove razgradnje v proteasomu, pri tem pa nastane njegova aktivna oblika p50.

Celice smo tretirali s spojino **21** v 50 μ M koncentraciji ter jih inkubirali 1, 2, 4 in 6 ur. Po preteklem času smo izolirali proteine in naredili prenos po Westernu. Membrano smo inkubirali s protitelesi proti p-p105 in p-I κ B α . Po spiranju vezanih protiteles z membrane smo za drugo označevanje uporabili protitelesa proti p105 in p50. Tretjič smo membrano inkubirali s protitelesi proti I κ B α . Za zadnje merjenje smo na membrano nanесли protitelesa proti β -aktinu, s čimer smo preverili nanos vzorcev na gel pred elektroforezno ločbo, saj je β -aktin konstitutivno izražen protein v vseh celicah.

Na sliki Slika 14 vidimo, da kot posledica tretiranja s spojino **21** po 4 in 6 urah pride do kopičenja fosforiliranih oblik proteinov p105 in I κ B v celicah, medtem ko se količini nefosforiliranih oblik proteinov ne spremenita. Iz tega lahko sklepamo, da do razgradnje

proteinov ne pride, fosforilirani obliki pa se kopičita v citoplazmi. Posledično ne pride do aktivacije signalne poti NF- κ B.

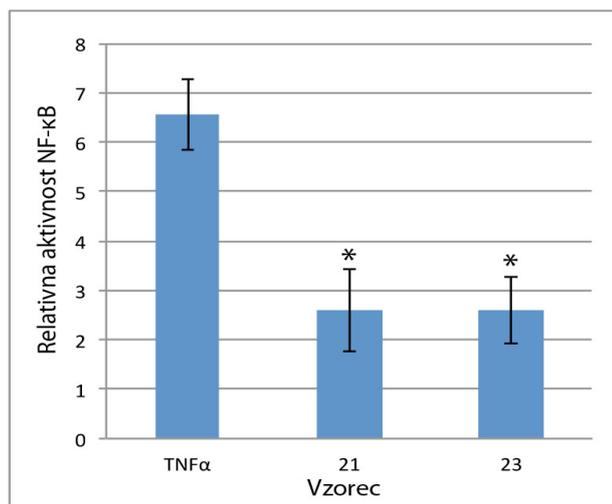


Slika 14: Spojina **21** povzroči kopičenje fosforiliranih oblik proteinov p105 in I κ B. Po 4 in 6 urah vidimo, da se poveča količina p-p105 in p-I κ B, medtem ko se celokupna količina nefosforiliranih oblik proteinov ne spreminja.

Da bi potrdili, da kljub povečani fosforilaciji do aktivacije signalne poti NF- κ B ne pride, smo naredili test na celicah Ramos-BlueTM. Slednje stabilno izražajo NF- κ B/AP-1 inducibilen gen SEAP, kar posledično pomeni, da po stimulaciji s TNF α , ki po klasični poti aktivira signalizacijo NF- κ B, te celice izločajo encim SEAP, katerega aktivnost lahko določamo.

Celice Ramos-BlueTM smo 1 uro predinkubirali s spojinama **21** in **23** v 50 μ M koncentraciji, nato pa še 8 ur po dodatku TNF α v koncentraciji 100 ng/mL. Po inkubaciji smo z analizo Quanti-BlueTM izmerili aktivnost nastale alkalne fosfataze. Rezultate smo podali kot mnogokratnik aktivnosti kontrole, ki ni bila tretirana ne s spojinami ne s TNF α .

Iz rezultatov (Slika 15) lahko razberemo, da po stimulaciji celic s TNF α v skladu s pričakovanji pride do močno povečane aktivnosti sproščene alkalne fosfataze. V primeru predinkubacije s spojinama **21** in **23** pa opazimo skoraj trikrat manjšo aktivnost encima v primerjavi s kontrolnim vzorčkom. Iz omenjenega sklepamo, da naše spojine zmanjšajo aktivacijo signalne poti NF- κ B na B-limfocitih iz Burkittovega limfoma. Posledica tega je lahko med drugim tudi zmanjšano zaviranje apoptoze, kar vodi v celično smrt.



Slika 15: Spojini **21** in **23** zmanjšata s TNF α sproženo aktivacijo signalne poti NF- κ B. Po enourni predinkubaciji s testiranima spojinama opazimo, da pride do skoraj trikratnega zmanjšanja v relativni aktivnosti NF- κ B v primerjavi s celicami, ki jih nismo predinkubirali z nobeno od spojin. Signifikantno različna vrednost je označena: *P<0,05.

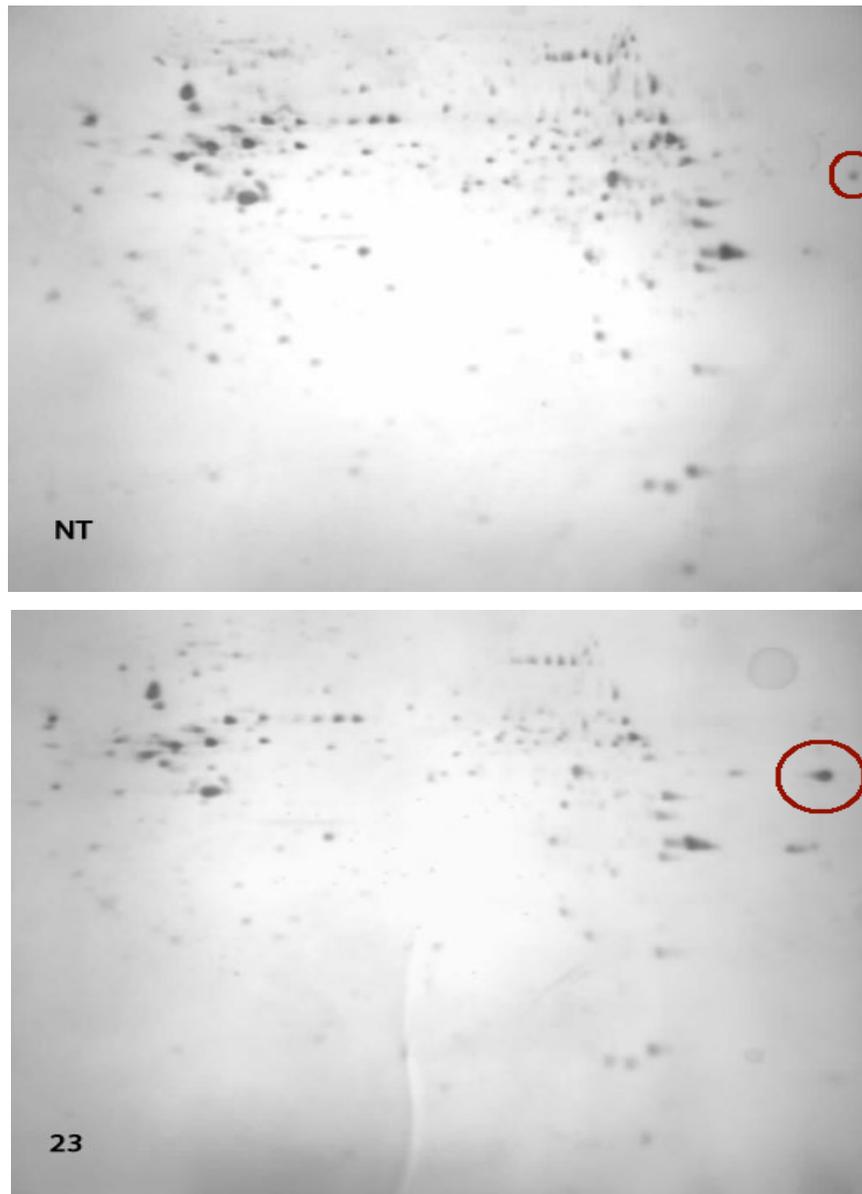
7.6 Povečano izražanje eEF1A1 po tretiranju z izbrano spojino

V zadnjem delu naše raziskave smo ovrednotili spremembe v izražanju proteinov kontrolnih in tretiranih celic. Naredili smo 2D-elektroforezo, kjer smo proteine ločili v eni smeri na osnovi njihove izoelektrične točke, v drugi smeri pa na osnovi velikosti.

Celice Ramos smo tretirali s spojino **23** ter inkubirali 6 ur. Potem smo izolirali proteine in po protokolu naredili ločbo proteinov, najprej izoelektrično fokusiranje, nato še SDS-PAGE. Gele smo barvali s srebrovim nitratom, rezultate pa obdelali s programom Dymension.

Proteinska profila obeh populacij celic sta si zelo podobna. Slike gelov (Slika 16) smo med seboj prekrili in iskali razlike v prisotnih proteinih. Odkrili smo razliko v izražanju proteina pri visokih vrednostih izoelektrične točke. Ta je v večji meri prisoten pri tretiranih celicah v primerjavi z netretiranimi (ostali proteini na gelu so izraženi dokaj enakomerno med geli).

Ponovno smo naredili 2D-elektroforezo, izrezali omenjeni protein ter ga ovrednotili z analizo MALDI-TOF. Ta je pokazala, da gre za evkarionski faktor podaljševanja 1- α 1 (eEF1A1). Protein eEF1A1 je udeležen v številnih procesih v organizmu, vendar pa je v veliki meri še vedno neraziskan. Poleg njegove vloge v sintezi proteinov v zadnjem času odkrivajo, da je vpleten še v številne druge procese v celici, med drugim tudi v apoptozo, organizacijo citoskeleta in transport proteinov v jedro. Za natančnejšo opredelitev vloge eEF1A1 so potrebne nadaljnje študije.



Slika 16: Primerjava slik gelov po 2D-elektroforezi. Z rdečo obkroženi protein je pri netretiranih celicah in tretiranih celicah izražen različno. Izraženost ostalih proteinov je podobna. NT – netretirane celice.

8 Sklep

V okviru raziskovalnega dela smo ovrednotili 23 zaviralcev serinskih proteaz acilhidrazidnega in sulfonohidrazidnega tipa, ki so bili sintetizirani na osnovi SAR-podatkov strukturno podobnih spojin v prejšnjih raziskavah (74). Zanje je bilo ugotovljeno, da sprožijo od kaspaz odvisno apoptozo na celičnih linijah Ramos in Wehi 231, zato smo pričakovali podobne rezultate (75).

V prvem koraku smo s testom presnovne aktivnosti MTS ovrednotili citotoksični učinek spojin na celični liniji Ramos. Glede na učinek smo spojine razdelili v tri skupine: šibko, zmerno in močno toksične. V zadnjo skupino sodijo spojine **12**, **17**, **20**, **21**, **22** in **23**, ki smo jih uporabili za primerjavo učinka na drugih levkemičnih/limfomskih celičnih linijah. Na osnovi dobljenih rezultatov smo določili dve spojini, **21** in **23**, ki sta selektivno toksični za B-limfocite iz Burkittovega limfoma. Na celicah Ramos smo z omenjenima spojinama naredili analizo celičnega cikla, kjer smo opazili, da pride do povečane smrti celic in zastoja celic v S-fazi cikla. Povečan delež mrtvih celic je verjetno tudi vzrok za zmanjšano presnovno aktivnost. Da bi ovrednotili mehanizem celične smrti, smo naredili test aneksin V/7-AAD. Ugotovili smo, da se v celicah sproži proces apoptoze. Z merjenjem aktivnosti kaspaz-3/-7 in analizo cepljenja kaspaze-3 s prenosom po Westernu smo dokazali, da je apoptoza odvisna od aktivacije kaspaz. V naslednji stopnji smo ovrednotili vpliv spojin na signalizacijo NF- κ B, ki je v celicah Ramos stalno aktivna. Z metodo prenosa po Westernu smo ugotovili, da v celicah pride do kopičenja fosforiliranih oblik proteinov p105 in I κ B, medtem ko celokupni količini obeh proteinov ostaneta nespremenjeni. Prav tako smo izbrani spojini potestirali na celicah Ramos-Blue™, ki po aktivaciji signalizacije NF- κ B s TNF α v okolico izločajo encim SEAP. Ugotovili smo, da se je v primeru enourne predinkubacije s spojino **21** ali **23** aktivacija signalne poti NF- κ B po stimulaciji s TNF α zmanjšala za skoraj trikratno vrednost. Skupaj to pomeni, da spojini preprečujeta aktivacijo NF- κ B. Nazadnje smo z 2D-elektroforezo naredili še primerjavo izražanja proteinov med tretiranimi (s spojino **23**) in netretiranimi celicami. Odkrili smo, da tretirane celice v večji meri izražajo protein z visoko vrednostjo izoelektrične točke. Omenjeni protein smo izrezali in ovrednotili z analizo MALDI-TOF. Iz rezultatov je razvidno, da gre za protein eEF1A1, ki sodeluje pri številnih celičnih procesih, med drugim tudi v apoptozi, vendar natančni mehanizmi njegovega delovanja še niso v celoti raziskani.

Iz začetnega nabora spojin smo torej določili 2 zaviralca serinskih proteaz, ki sta v mikromolarnem območju selektivno toksična za limfocite B iz Burkittovega limfoma in sprožita od kaspaz odvisno apoptozo. Prav tako pride do zmanjšane aktivacije signalne poti NF- κ B in povečanega izražanja proteina eEF1A1.

9 Literatura

1. Kumar P, Clark M: Clinical Medicine, 6th Ed. Elsevier Limited, 2009: 466–484.
2. Glaser M: Kronične levkemije. Med razgl 2005; 44: 33–41.
3. Tobias J, Hochhauser D: Cancer and its Management, 6th Ed. John Wiley & Sons, Ltd., Publications, 2010: 455–534.
4. Andolšek D: Bolezni krvi in krvotvornih organov. Interna medicina, glavni uredniki: Kocjančič A, Mravlje F, Štajer D. Littera picta, 3. izdaja, Ljubljana, 2005: 1083–1109.
5. Stephens FO, Aigner KR: Basics of oncology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009: 259–279.
6. Blum KA, Lozanski G, Byrd JC: Adult Burkitt leukemia and lymphoma. Blood 2004; 104: 3009–3020.
7. Dang CV: c-Myc Target Genes Involved in Cell Growth, Apoptosis, and Metabolism. Molecular and Cellular Biology 1999; 19: 1–11.
8. Koblinski JE, Ahram M, Sloane BF: Unraveling the role of proteases in cancer. Clinica Chimica Acta 2000; 291: 113–135.
9. Turk B: Targeting proteases: successes, failures and future prospects. Nature reviews Drug Discovery 2006; 5: 785–799.
10. Liotta LA, Rao CN, Barsky SH: Tumor invasion and the extracellular matrix. Lab Invest 1983; 49: 636–649.
11. Laskowsky Jr. M, Kato I: Protein inhibitors of proteinases. Ann Rev Biochem 1980; 49: 593–626.
12. Duffy MJ: The Urokinase Plasminogen Activator System: Role in Malignancy. Current Pharmaceutical Design 2004; 10: 39–49.
13. Bode W, Huber R: Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. Biochim. Biophys. Acta 2000; 1477: 241–252.
14. Turk B, Turk D, Salvesen GS: Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators. Curr. Pharm. Des. 2002; 8: 1623–1637.
15. Smorenburg SM, et al: Alpha2-macroglobulin is mainly produced by cancer cells and not by hepatocytes in rats with colon carcinoma metastases in liver. Hepatology 1996; 14: 367–380.
16. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: Biochemistry, 7th Ed. W.H. Freeman and Company, 2012.

17. Lah TT, Alonso MBD, Van Noorden CJF: Antiprotease therapy in cancer: hot or not? *Expert Opin. Biol. Ther.* 2006; 6: 257–279.
18. Puente XS, et al: Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat. Rev. Genet.* 2003; 4: 544–588.
19. Lynch CC, et al: Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation* 2002; 70: 561–573.
20. De Bock CE, et al: Clinical significance of uPAR expression in cancer. *Med. Res. Rev.* 2004; 24: 13–39.
21. Hedstrom L: An Overview of Serine Proteases. *Current Protocols in Protein Science.* 2002; 21.10.1-21.10.8.
22. Abbenante G, Fairlie DP: Protease inhibitors in the clinic. *Med Chem* 2005; 1: 71–104.
23. Hedstrom L: Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev* 2002; 102: 4501–24.
24. Horl WH: Proteinases: potential role in health and disease, in: M. Sandler, H.J. Smith (Eds.), *Design of Enzyme Inhibitors as Drugs*, Oxford University Press, Oxford 1989; pp. 573–581.
25. O'Connell AR, Stenson-Cox C: A more serine way to die: defining the characteristics of serine protease-mediated cell death cascades. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773: 1491–9.
26. Stenson-Cox C, Fitzgerald U, Samali A: In the cut and thrust of apoptosis, serine proteases come of age. *Biochemical Pharmacology* 2003; 66: 1469–1474.
27. Moffitt KL, Martin SL, Walker B: Proteases implicated in apoptosis: old and new. *JPP* 2010; 62: 563–576.
28. Gondi SC, et al: Downregulation of uPAR and uPA activates caspase mediated apoptosis, inhibits the PI3k/AKT pathway. *J Oncol.* 2007; 31: 19–27.
29. Silverman GA, et al: The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem* 2001; 276: 33293–6.
30. O'Connell AR, Stenson-Cox C: A more serine way to die: defining the characteristics of serine protease-mediated cell death cascades. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773: 1491–9.
31. Sheng S, et al: Maspin acts at the cell membrane to inhibit invasion and motility of mammary and prostatic cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 11669–11674.

32. Powers, JC, et al: Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chem Rev* 2002; 102: 4639–750.
33. Murn J, Urleb U, Mlinaric-Rascan I: Internucleosomal DNA cleavage in apoptotic WEHI 231 cells is mediated by a chymotrypsin-like protease. *Genes to Cells* 2004; 9: 1103–1111.
34. King MA, Halicka HD, Darzynkiewicz Z: Pro- and anti-apoptotic effects of an inhibitor of chymotrypsin-like serine proteases. *Cell Cycle* 2004; 3: 1566–71.
35. Hotchkiss RS, et al: Cell Death. *N Engl J Med* 2009; 361: 1570–1583.
36. Elmore S: Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 2007; 35(4): 495–516.
37. Norbury CJ, Hickson ID: Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 367–401.
38. Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J: Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 2005; 22: 355–370.
39. Legewie S, et al: Mathematical modeling identifies inhibitors of apoptosis as mediators of positive feedback and bistability. *PLoS Comput Biol* 2006; 2: e120.
40. Wajant H: The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 2002; 296: 1635–1636.
41. Kischkel FC, et al: Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 1995; 14: 5579–5588.
42. Chinnaiyan AM: The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* 1999; 1: 5–15.
43. Joza N, et al: Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 2001; 410: 549–54.
44. Slee EA, Adrain C, Martin SJ: Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276: 7320–7326.
45. Sakahira H, Enari M, Nagata S: Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998; 391: 96–99.
46. Luqman S, Pezzuto JM: NFκB: A Promising Target for Natural Products in Cancer Chemoprevention. *Phytother Res* 2010; 24: 949–963.

47. Hayden MS, Ghosh S: Signaling to NF- κ B. *Genes Dev* 2004; 18: 2195–2224.
48. Li Q, Verma IM: NF- κ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 725–734.
49. Bonizzi G, Karin M: The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004; 25: 280–288.
50. Jost PJ, Ruland J: Aberrant NF- κ B signaling in lymphoma: mechanisms, consequences and therapeutic implications. *Blood* 2007; 109: 2700–2707.
51. Sempere MC, et al: The role of the NF κ B signalling pathway in cancer. *Clin Transl Oncol* 2008; 10: 143–147.
52. Baldwin AS: Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- κ B. *J Clin Invest.* 2001; 107: 241–246.
53. Nishikori M: Classical and Alternative NF- κ B Activation Pathways and Their Roles in Lymphoid Malignancies. *J Clin Exp Hematopathol* 2005; 45: 15–24.
54. Nazari M, et al: Inactivation of nuclear factor- κ B by citrus flavanone hesperidin contributes to apoptosis and chemo-sensitizing effect in Ramos cells. *Eur J Pharmacol* 2011; 650: 526–533.
55. Ramos-Blue™ Cells. Invivogen. Catalog # rms-sp; version # 11D13-MM.
56. Mateyak MK, Kinzy TK: eEf1A: Thinking Outside the Ribosome. *J of Biol Chem* 2010; 285: 21209–21213.
57. Grosshans H, Simos G, Hurt E. An aminoacylation-dependent nuclear tRNA export pathway in yeast. *J Struct Biol* 2000; 129: 288–294.
58. Khacho M, et al: eEF1A is a novel component of the mammalian nuclear protein export machinery. *Mol Biol Cell* 2008; 19: 5296–5308.
59. Chuang SM, et al: Proteasome-mediated degradation of cotranslationally damaged proteins involves translation elongation factor 1A. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 403–413.
60. Liu G., et al: F-actin sequesters elongation factor 1 α from interaction with aminoacyl-tRNA in a pH-dependent reaction. *J Cell Biol* 1996; 135: 953–963.
61. Gross SR, Kinzy TG: Translation elongation factor 1A is essential for regulation of the actin cytoskeleton and cell morphology. *Nat Struct Mol Biol* 2005; 12: 772–778.
62. Pittman R, et al: Coordination of Eukaryotic Translation Elongation Factor 1A (eEF1A) Function in Actin Organization and Translation Elongation by the Guanine Nucleotide Exchange Factor eEF1B α . *J Biol Chem* 2009; 284: 4739–4747.

63. Duttaroy A, Bourbeau D, Wang XL, Wang E: Apoptosis rate can be accelerated or decelerated by overexpression or reduction of the level of elongation factor-1 alpha. *Exp Cell Res* 1998; 238: 168–176.
64. Talapatra S, Wagner JD, Thompson CB: Elongation factor-1 alpha is a selective regulator of growth factor withdrawal and ER stress-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2002; 9: 856–861.
65. Ruest LB, Marcotte R, Wang E: Peptide elongation factor eEF1A-2/S1 expression in cultured differentiated myotubes and its protective effect against caspase-3-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2002; 277: 5418–5425.
66. http://www.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-assays/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-_mts_/
67. Rabinovitch P: Introduction to cell cycle analysis. Phoenix Flow Systems, Inc.
68. Technical Data Sheet: PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I. BD Pharmingen™ 559763 Rev. 8.
69. Protein Assay. Bio-Rad Laboratories SIG 120197, LIT 448 RevD.
70. Siriporn J, et al: N α -tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK) induces caspase-dependent apoptosis in transformed human B cell lines with transcriptional downregulation of anti-apoptotic HS1-associated protein X-1 (HAX-1). *J Biol Chem* 2009; 284(41): 27827–27837.
71. <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=8259A7B6-7DA6-41CF-9D55-AA6C14F31193>
72. <http://www.invivogen.com/quantiblu>
73. Berkelman T, Stenstedt T: 2-D Electrophoresis: Principles and Methods. Amersham Biosciences.
74. Smolnikar I, et al: Design, synthesis and molecular modelling of 1-amidinopiperidine thrombin inhibitors. *Pharmazie* 2007; 62: 243–254.
75. Čelhar T, et al: Azaphenylalanine-based serine protease inhibitors induce caspase-mediated apoptosis. *European Journal of Pharmacology* 2009; 602: 15–22.