

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



SANDRA ČERU

**VREDNOTENJE IZRAŽANJA GENA *atf3* PO MODULACIJI
PROTEASOMSKE AKTIVNOSTI**

**EVALUATION OF *atf3* GENE EXPRESSION AFTER
PROTEASOME ACTIVITY MODULATION**

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za klinično biokemijo, pod mentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič-Raščan, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Martine Gobec, mag. farm.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Ireni Mlinarič-Raščan, mag. farm za strokovno pomoč in nasvete pri izdelavi diplomske naloge ter za razumevanje, ko se prvotne ideje niso najbolje izšle. Zahvaljujem se somentorici, asist. dr. Martini Gobec, mag. farm., za vso pomoč pri delu, za potrpežljivost ob mojih neskončnih vprašanjih ter občasnih nerodnostih, za entuziazem v trenutkih, ko mi ga je primanjkovalo ter za vedno zabavne ure v laboratoriju. Nedolžni sarkazem & Tiffany sta zmagovalna kombinacija. ☺

Velika zahvala gre mojim staršem, ki so mi študij omogočili ter me vedno spodbujali. Hvala tudi vama babi in dedi, za vse tiste dodatne evrčke in ker verjameta vame. David hvala, ker te vedno skrbi zame.

Last but not least, en velik hvala vsem tistim, ki ste mi blizu (saj veste, kdo ste ;)) - ker je z vami vsak dan sončkast, ter moji dragi opoziciji - v teh letih se je nabralo toliko nepozabnih spominov, da bi zanje potrebovali mnogo več kot en album. ☺

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič-Raščan, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Martine Gobec, mag. farm.

Sandra Čeru

Ljubljana, april 2013

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Stane Srčič, mag. farm.

Članica diplomske komisije: doc. dr. Mojca Lunder, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO SLIK	III
KAZALO PREGLEDNIC	IV
KAZALO ENAČB.....	IV
POVZETEK.....	V
ABSTRACT	VII
SEZNAM KRATIC IN OKRAJŠAV.....	VIII
1 UVOD	1
1.1 LEVKEMIJE IN LIMFOMI	1
1.1.1 <i>Levkemije</i>	1
1.1.2 <i>Limfomi</i>	2
1.2 APOPTOZA	4
1.2.1 <i>Mehanizem apoptoze</i>	5
1.2.2 <i>Apoptoza in rak</i>	6
1.3 PROTEASOM IN ZAVIRALCI PROTEASOMA	7
1.4 STATMIN (STMN3).....	9
1.5 RGC-32.....	10
1.6 ATF3.....	12
1.6.1 <i>ATF3 in rakava obolenja</i>	12
2 NAMEN DELA	15
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 MATERIALI	16
3.1.1 <i>Kemikalije</i>	16
3.1.2 <i>Reagenti</i>	17
3.1.3 <i>Kompleti</i>	17
3.1.4 <i>Gojišča</i>	17
3.1.5 <i>Laboratorijska oprema</i>	18
3.1.6 <i>Humane celične linije</i>	19
3.2 METODE DELA S CELICAMI.....	20

3.2.1	<i>Gojenje celic</i>	20
3.2.2	<i>Subkultiviranje celičnih linij</i>	20
3.2.3	<i>Odmrzovanje celic</i>	20
3.3	ŠTETJE CELIC	21
3.4	TEST ZA DOLOČANJE CELIČNE METABOLNE AKTIVNOSTI Z REAGENTOM MTS	22
3.5	REAKCIJA POMNOŽEVANJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU	23
3.5.1	<i>Izolacija RNA</i>	23
3.5.2	<i>Reverzna transkripcija</i>	24
3.5.3	<i>Verižna reakcija s polimerazo v realnem času</i>	26
3.6	STATISTIČNA ANALIZA	29
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	30
4.1	IZBOR GENOV.....	30
4.2	IZRAŽANJE IZBRANIH GENOV PO MODULACIJI PROTEASOMSKE AKTIVNOSTI.....	31
4.2.1	<i>Izražanje gena <i>stmn3</i> po modulaciji proteasomske aktivnosti</i>	31
4.2.2	<i>Izražanje gena <i>rgc-32</i> po modulaciji proteasomske aktivnosti</i>	33
4.2.3	<i>Izražanje gena <i>atf3</i> po modulaciji proteasomske aktivnosti</i>	34
4.3	IZRAŽANJE GENA <i>ATF3</i> OB SOČASNI UPORABI ZAVIRALCEV SIGNALNIH POTI	36
4.4	VREDNOTENJE CITOTOKSIČNOSTI V LIMFOBLASTOIDNIH CELIČNIH LINIJAH (LCL).....	39
5	SKLEP	41
6	LITERATURA	42

KAZALO SLIK

Slika 1: Ekstrinzična in intrinzična pot apoptoze	5
Slika 2: Shematski prikaz strukture proteasoma.....	7
Slika 3: Struktura bortezomiba	8
Slika 4: Vloga statmina v mitotski fazi celičnega cikla.....	9
Slika 5: Shematski prikaz celičnega metabolizma reagenta MTS.....	22
Slika 6: Izražanje gena <i>stmn3</i> v celicah Ramos po tretiranju s spojino 15 in bortezomibom	31
Slika 7: Izražanje gena <i>stmn3</i> v celicah U937 po tretiranju s spojino 15 in bortezomibom.	32
Slika 8: Izražanje gena <i>rgc-32</i> v celicah Ramos po tretiranju s spojino 15 in bortezomibom	33
Slika 9: Izražanje gena <i>rgc-32</i> v celicah U937 po tretiranju s spojino 15 in bortezomibom	33
Slika 10: Izražanje gena <i>atf3</i> v celicah Ramos po tretiranju s spojino 15 in bortezomibom	34
Slika 11: Izražanje gena <i>atf3</i> v celicah U937 po tretiranju s spojino 15 in bortezomibom..	35
Slika 12: Izražanje gena <i>atf3</i> v celicah Ramos ob prisotnosti zaviralcev signalnih poti	36
Slika 13: Izražanje gena <i>atf3</i> v celicah U937 ob prisotnosti zaviralcev signalnih poti.	37
Slika 14: Metabolna aktivnost limfoblastoidnih celičnih linij pri tretiranju s spojino 15 in bortezomibom.....	40

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Primer izračuna redčitve vzorca za reverzno transkripcijo	25
Preglednica II: Sestavine osnovne zmesi za reakcijo reverzne transkripcije	26
Preglednica III: Program reakcije reverzne transkripcije.....	26
Preglednica IV: Primer normalizacije na hišni gen	28

KAZALO ENAČB

Enačba 1: Računanje koncentracije celic s hemocitometrom	21
Enačba 2: Računanje odstotka metabolne aktivnosti celic.....	23
Enačba 3: Izračun volumnov vzorca in vode, potrebnih za reakcijo reverzne transkripcije	25

POVZETEK

Rakava obolenja so v zahodnem svetu zelo razširjena in umrljivost je kljub napredku znanosti še vedno visoka. Mnoge študije so zato usmerjene k iskanju novih učinkovin in terapevtskih pristopov, s katerimi bi povišali stopnjo preživetja, zmanjšali neželene učinke obstoječih učinkovin ter izboljšali kakovost življenja bolnikov. Ker so tumorske celice pridobile sposobnost neskončne delitve, je glavni cilj protitumornih učinkovin selektivno povzročiti apoptozo v teh celicah. Predhodno so bili sintetizirani in ovrednoteni zaviralci serinskih proteaz kot modulatorji apoptoze. Pri tem je bilo ugotovljeno, da so spojine z N-amidinopiperidinskim skeletom selektivno toksične za celice Burkittovega limfoma, njihov mehanizem delovanja pa poteka preko zaviranja proteasoma. Spojina **15** je bila na podlagi najnižje konstante zaviranja izbrana za nadaljnje raziskave. Z našim raziskovalnim delom smo želeli doprinesiti k razumevanju molekularnih mehanizmov, ki so odgovorni za selektivno toksičnost spojine **15** za celice Burkittovega limfoma. S pomočjo eksperimentov na mikromrežah so bili identificirani geni, ki se značilno izražajo pri tretiranju s spojino **15**. Izmed teh genov smo izbrali tiste tri, pri katerih so bile opažene največje razlike v izražanju. Izkazalo se je, da je izražanje gena *atf3* najbolj povečano, izražanje gena *stmn3* najbolj zmanjšano, za gen *rgc-32* pa velja, da je sicer v celicah Burkittovega limfoma značilno povečano izražen, spojina **15** pa je njegovo izražanje močno znižala. Zato smo v prvem delu diplomske naloge želeli preveriti izražanje teh treh genov z metodo RT-PCR v celicah Ramos (celice Burkittovega limfoma) in sicer v različnih časovnih točkah po izpostavljanju spojini **15**. Za primerjavo smo kot pozitivno kontrolo uporabili bortezomib, ki je znan zaviralec proteasoma. Hkrati pa smo izražanje preverjali tudi v celicah U937 (monocitne celice iz difuznega histiocitnega limfoma), za katere je bilo že predhodno ugotovljeno, da niso dovzetne za spojino **15**. Največje razlike po primerjavi obeh tipov celic (Ramos in U937) ter po primerjavi tretiranja s spojino **15** in bortezomibom smo opazili pri izražanju gena *atf3*, s čimer smo potrdili njegov potencialen doprinos k doseganju selektivne citotoksičnosti spojine **15**. Da bi bolje razumeli njegovo vlogo, smo želeli preveriti, katere signalne poti so vpletene v regulacijo omenjenega gena. Z uporabo zaviralcev signalnih poti smo ugotovili, da je izražanje gena *atf3* v celicah Burkittovega limfoma zmanjšano v primeru uporabe wortmannina, kar nakazuje na vpletenost Akt signalne poti. Kljub ugotovitvi, da le eden izmed izbranih genov potencialno prispeva k selektivni citotoksičnosti spojine **15**, pa lahko ta gen predstavlja

izhodišče za nadaljnje raziskave, ki bi podrobneje razjasnile mehanizem delovanja te spojine.

ABSTRACT

Cancer is one of the most common diseases in the Western world and despite of the developed science the mortality rate is still high. Because of that numerous studies are focusing on finding new substances and therapeutic approaches to increase survival rate, reduce side effects of existing substances and improve quality of patients' lives. Since tumor cells have developed the ability of infinite division, the main goal of antitumorigenic compounds is to selectively cause apoptosis in those cells. In previous studies inhibitors of serine proteases have been synthesized and evaluated as modulators of apoptosis. It has been found that N-amidinopiperidine-based compounds are selectively toxic to Burkitt's lymphoma cells with proteasome inhibition as a mechanism of action. Compound **15** was chosen for further studies due to its lowest constant of inhibition. Our aim was to elucidate the molecular mechanisms which are responsible for the selective cytotoxicity of compound **15** towards the Burkitt's lymphoma cells. After analysis of data obtained from microarrays, a gene expression profile of cells exposed to compound **15** was determined. It has been found that expression of the *atf3* gene was the most up-regulated, while the most down-regulated was the *stmn3* gene. Expression of the *rgc-32* gene is known to be characteristically increased in Burkitt's lymphoma cells and was found to be significantly decreased in the presence of compound **15**. Therefore these three genes were chosen for further evaluation with RT-PCR. We performed the experiments on Ramos cells (Burkitt's lymphoma cells) that were exposed to compound **15** for various time points. As positive control proteasome inhibitor bortezomib was used. At the same time we were investigating expression of all three chosen genes on U937 (monocytes from diffuse histiocytic lymphoma), cells for which was previously demonstrated that they are not susceptible to compound **15** mediated cytotoxicity. After comparison of both cell lines and comparison of exposure to compound **15** and bortezomib, we found that a major difference was observed in the expression of the *atf3* gene. Thereby we postulate the potential involvement of ATF3 in mediating the selective cytotoxicity of compound **15**. To better understand its role, we explored the signaling pathways involved in the regulation of this gene. By using inhibitors of the main signaling pathways we observed a decreased expression of *atf3* gene in Ramos cells when using wortmannin, which indicated involvement of the Akt signaling pathway. To confirm the importance of *atf3* gene in mediating the selective cytotoxicity of compound **15** further studies are needed. Nevertheless, the obtained results present a basis for the future.

SEZNAM KRATIC IN OKRAJŠAV

Akt	serin/treonin kinaza
ATF3	aktivacijski transkripcijski faktor 3
BCR	B-celični receptor
BL	Burkittov limfom
CDK	od ciklinov odvisna kinaza
CRE	cAMP odzivni element
CREB	CRE vezavni protein
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EBV	virus Epstein-Barr (humani herpesvirus 4)
ERK	kinaza uravnavana z zunajceličnim signalom (angl. extracellular signal regulated kinase)
Fas	površinska molekula celic T _c , tarča za TNF
JNK	c-JUN NH ₂ – terminalna kinaza
LCL	limfoblastoidne celične linije
mRNA	informacijska RNA
MTS	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol
p53	tumor zaviralni protein
<i>rgc-32</i>	odzivni gen na komplement 32 (ang. response gene to complement 32)
RNA	ribonukleinska kislina
RNAza	encim, ki katalizira hidrolizo RNA
RPMI	medij za gojenje levkemičnih celičnih linij, kratica izvira iz Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času
TGF-β	dejavnik tumorske rasti β
TNF-R1	receptor za dejavnik tumorske nekroze

1 UVOD

1.1 LEVKEMIJE IN LIMFOMI

Maligna obolenja zajemajo veliko število različnih bolezni. So zelo razširjena v zahodnem svetu in po smrtnosti so umeščena takoj za kardiovaskularnimi boleznimi (1). Med maligna obolenja spadajo tudi levkemije in limfomi.

1.1.1 Levkemije

Levkemije so redke rakaste novotvorbe krvotvornega tkiva, katerih značilnost je kopičenje enega klona nenormalnih in posledično nefunkcionalnih krvnih celic v kostnem mozgu in v krvi. Ker celice ne podležejo apoptozi, se kopičijo v kostnem mozgu, zaradi česar se pojavi slabokrvnost, nevtropenija in trombocitopenija (2). Pri večini je sprožilni znak nepoznan, zato govorimo o primarnih oblikah levkemij, če pa je vzrok znan, gre za sekundarno obliko levkemije. Dejavniki, ki lahko sprožijo nastanek levkemij, so obsevanje z ionizirajočimi žarki, zdravljenje predhodne bolezni z obsevanjem, genetsko ozadje, različne kemijske spojine, citostatiki in nekateri virusi (3). Glede na vrsto celic jih delimo v limfatične in mieločne, glede na razvojno stopnjo levkemičnih celic in potek bolezni pa v akutne (hitro potekajoče) in kronične (dolgotrajne). Akutne levkemije so bolj pogoste, tip levkemije pa je pogosto odvisen od starosti (2).

Akutne levkemije so heterogena skupina klonskih bolezni, ki so posledica pridobljene somatske mutacije in nato nenadzorovane rasti multipotentne matične celice. V primeru, da gre za okvaro mieločne multipotentne celice, govorimo o akutni mieločni levkemiji, v primeru okvare limfatične multipotentne celice pa se razvije akutna limfocitna levkemija (3).

Kronične levkemije so skupina kronično potekajočih krvnih bolezni, pri katerih je povečano nastajanje krvnih celic zaradi motnje na ravni krvotvorne matične celice. Tudi tukaj ločimo kronično mieločno levkemijo, kjer pri večini bolnikov najdemo kromosomsko spremembo Philadelphia (Ph) kromosoma (t.j. recipročna translokacija med kromosomoma 9 in 22) ter kronične levkemije limfocitne vrste, ki sodijo med limfome (2).

1.1.2 Limfomi

Maligni limfomi so novotvorbe, ki nastanejo zaradi trajne in samostojne razrasti celic limfatičnega tkiva, ki je ireverzibilna. So klonske bolezni, ki nastanejo z maligno preobrazbo limfocitov T, B ali celic ubijalk (NK). Najpogosteje prizadenejo bezgavke, vranico, nebnici in kostni mozeg. V nekaterih primerih so maligni limfomi dolgo časa omejeni, drugi pa se hitro razširijo v kostni mozeg in kri. V osnovi jih delimo v dve večji skupini: Hodgkinov limfom, za katerega so značilne Reed-Sternbergove celice velikanke in Hodgkinove celice, ter ne-Hodgkinovi limfomi (3).

Približno 95 % limfomov je B-limfocitnega izvora in postaja jasno, da njihov nastanek ni povsem avtonomen, saj so ključni dejavniki, od katerih je odvisna normalna diferenciacija celic B, potrebni tudi za maligno rast večine B-celičnih limfomov. Eden takšnih dejavnikov je BCR (B-celični receptor), katerega izražanje je ključno za preživetje mnogih limfomov. Za precej B-celičnih limfomov so značilne recipročne kromosomske translokacije, v patogenezo pa so pogosto vključene tudi genomske amplifikacije (npr. gena *REL*, ki ima pomembno vlogo v preživetju in proliferaciji celic B), mutacije v tumor zaviralnih genih (npr. *p53*) ter virusi (npr. Epstein-Barr virus, humani herpes virus 8). Poleg tega predvidevajo, da so v razvoj limfomov vpleteni tudi eksogeni ali avto-antigeni ter stimulatívni signali iz same okolice limfoma (4).

Burkittov limfom (BL) je visoko agresivni B-celični ne-Hodgkinov limfom in je najhitreje rastoči humani tumor, pri katerem se celice podvojijo v 24 do 48 urah (5). Njegova genetska značilnost so kromosomske spremembe na *c-myc* onkogenu, ki prispevajo k limfomogenezi preko sprememb v regulaciji celičnega cikla, celični diferenciaciji, apoptozi, celični adheziji ter metabolizmu (6).

WHO klasifikacija opisuje tri različne klinične vrste: endemično, sporadično in povezano s pomanjkljivim imunskim odzivom. Medtem ko je endemična oblika značilna za ekvatorialno Afriko (t.j. endemično območje malarije) in je skoraj v vseh primerih povezana z Epstein-Barr virusom (EBV), sporadična oblika nima specifične klimatske ali geografske razporeditve. Imunopomanjkljiva oblika se ponavadi pojavlja pri bolnikih s HIV infekcijo in je pogostejša, ko je število CD4⁺ T celic višje od 200/μL (zgodaj v napredovanju HIV infekcije) (5,6). Predvidevajo, da virus HIV vpliva na celice B preko deregulacije z aktivacijo sprožene citidin deaminaze ter preko kronične aktivacije celic B. Ena izmed vlog EBV v endemičnem Burkittovem limfomu bi lahko bila blokada apoptoze

v celicah B preko *c-myc* translokacije. EBV lahko sproži tudi genomsko nestabilnost, deregulira funkcije telomer in inducira poškodbo DNA v okuženih celicah. V EBV pozitivni endemični in imunopomanjkljivi vrsti so opazili virusne mikroRNA, ki jih zato prav tako povezujejo s tumorigenezo (5).

Teorije o izvoru celic limfoma so različne – nekatere raziskave kažejo, da le-te izvirajo iz celic germinalnega centra, medtem ko druge nakazujejo, da limfom izvira iz spominskih B-celic (4,5). Poleg že omenjenega EBV, bolezen povezujejo z malarijo vrste *falciparum*, ki naj bi povečala tveganje za endemični BL prek interakcije z EBV okuženimi celicami (5).

V 70 do 80 % primerov BL najdemo translokacijo t(8;14)(q24;q32), ostali dve translokaciji t(2;8)(p12;q24) in t(8;22)(q24;q11) pa se pojavita v 10 do 15 % primerov. Omenjene mutacije povzročijo translokacijo *c-myc* zraven težkih oz. κ - ali λ -lahkih verig imunoglobulinov. Zaradi povečane transkripcijev genov za težke in lahke verige imunoglobulinov v zrelih limfocitih B, se nato poveča tudi transkripcija gena *c-myc*, ki ima ključno vlogo v nadzoru celičnega cikla (5,6).

Kljub temu, da je zaradi visokega izražanja proteina c-Myc BL definiran kot homogena bolezen, pa velja omeniti, da v približno do 10 % primerov BL niso zasledili translokacij povezanih s *c-myc* (5). Možno je, da je *c-myc* v teh primerih dereguliran preko drugih mehanizmov. Odkrili so na primer, da bi povečano izražanje proteina c-Myc lahko bila posledica mutacije na aminokislinskem ostanku treonina na mestu 58, kar bi vodilo v zmanjšano razgradnjo c-Myc preko proteasoma (7). Povečano izražanje proteina c-Myc v normalnih celicah B povzroči apoptozo preko p53 poti. Ker imajo mnogi BL prisotne mutacije tumor zaviralnega gena *p53*, bi tudi to lahko bil vzrok za moteno apoptozo (5,6). Od p53 neodvisna pot pa je morda povezana z znižanim izražanjem celičnega proteina Bim, ki je antagonist antiapoptotičnega proteina Bcl-2 (5).

Klinično se BL izraža v povečanih bezgavkah (limfadenopatiji), pogosto z nabreklih trebuhom ali čeljustjo ter infiltracijo kostnega mozga. Do 30 % bolnikov zbolijo za meningitisom. Celice BL površinsko izražajo IgM, Bcl-6 ter celične označevalce CD19, CD20, CD22, CD10 ter CD79a in so negativne za CD5, CD23, TdT ter pogosto za Bcl-2 (5,6). Zdravljenje Burkittovega limfoma sestojih iz kratkih, intenzivnih ciklov kemoterapije z različnimi kombinacijami citostatikov (ciklofosamid, vinkristin, metotreksat, doksorubicin in citarabin). Prognoza pri odraslih je sicer na splošno slabša kot pri otrocih, vendar pa se v zadnjem času s pomočjo agresivne kombinirane terapije ter

uporabe rituksimaba, monoklonskega protitelesa proti celičnemu označevalcu CD20, stopnja preživetja izboljšuje (5,6). Med potencialne nove učinkovine prištevajo tudi zaviralce DNA metiltransferaze, protismiselne oligonukleotide, katerih tarča je c-Myc, zaviralce od ciklinov odvisnih kinaz ter zaviralce proteasoma (6).

1.2 APOPTOZA

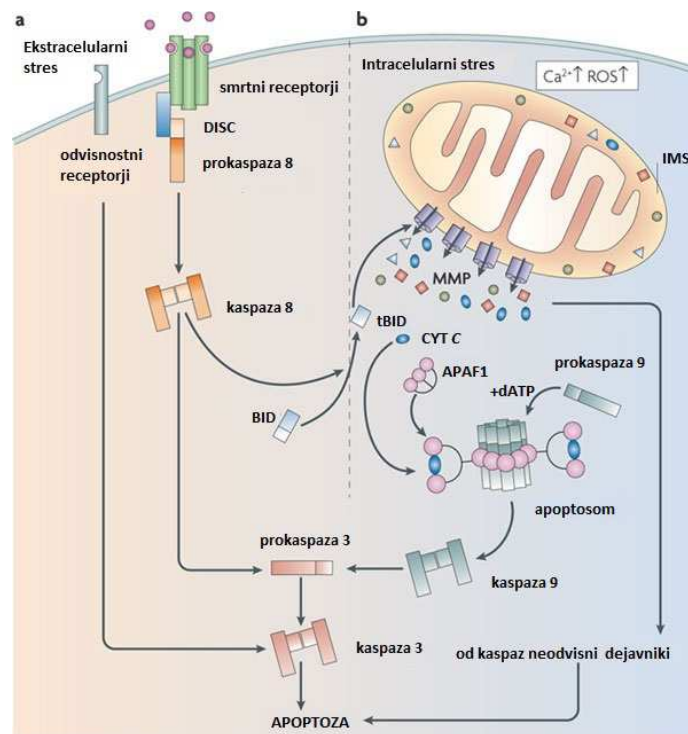
Izraz apoptoza, ki prihaja iz starodavne grške besede *a-po-toe-sis* in pomeni »listje, ki pada z dreves«, so prvič uporabili Kerr, Wyllie in Currie leta 1972 (8,9). Apoptoza ali programirana celična smrt je fiziološka oblika celične smrti, ki ima pomembno vlogo pri razvoju in zagotavljanju tkivne homeostaze. Prisotna je vse od embrionalnega razvoja do smrti in je med drugim pomembna v procesu staranja, v nadzoru poškodovanih ali spremenjenih tkiv in ko zdravo tkivo odmre (9,10).

Apoptozo lahko sprožijo številni dejavniki, med drugim protitumorne učinkovine, gama in ultravijolično sevanje, pomanjkanje dejavnikov preživetja (kot npr. interlevkin-1) in različnih citokinov, ki aktivirajo smrtne receptorje, kot so Fas in TNF receptorji. Preko različnih poti potem ti dražljaji sprožijo karakteristično pot izražanja mnogih genov (npr. genov Bcl-2 družine ali gena *p53*) (11).

Proces apoptoze se odraža v zaporedju značilnih morfoloških sprememb. V jedru poteče kondenzacija kromatina, ki se nato razporedi na periferiji le-tega. Pride tudi do krčenja citoplazme, kar povzroči, da se sama celica skrči ter izgubi stik s sosednjimi celicami. Jedro se razgradi in na membrani je mogoče opaziti majhne mehurčkaste izbokline (gre za t.i. brstenje membrane). V zadnjih fazah apoptoze iz celic nastanejo številna apoptotska telesca, to so delci citoplazme, obdani s celično membrano, ki lahko vsebujejo jedrne fragmente (8,9,11). Membrana celic kljub nekaterim spremembam med procesom apoptoze ohrani svojo integriteto. Najpomembnejša sprememba membrane je izpostavitve negativno nabitega fosfolipida, fosfatidilserina, na celično površino. Fosfatidilserin se sicer nahaja na notranji strani lipidnega dvosloja, med procesom apoptoze pa se prestavi na zunanjo stran membrane. S tem postane celični označevalec, preko katerega fagociti prepoznajo apoptotično celico in jo odstanijo. Pri tem ne pride do razlivanja celične vsebine ter poškodb ali vnetja okoliškega tkiva, kot se to zgodi pri nekrozi. Slednjo skoraj vedno povzroči patološki stimulus, medtem ko je stimulus za apoptozo lahko patološki ali fiziološki (8,9).

1.2.1 Mehanizem apoptoze

Osrednjo vlogo v procesu apoptoze imajo kaspaze, ki so visoko specifični proteolizni encimi iz skupine cisteinskih proteaz. Kaspaze so v normalnih celicah prisotne kot neaktivni proencimi, ki pa se lahko hitro aktivirajo, bodisi z avtoproteolitično razgradnjo ali pa z razgradnjo preko drugih kaspaz, ki poteče na specifičnih aminokislinskih ostankih. Poznamo dve vrsti kaspaz, ki sodelujejo pri procesu apoptoze. Iniciatorske kaspaze (kaspaze 2, 8, 9, 10) pretvorijo različne signale v proteazno aktivnost, efektorske kaspaze (kaspaze 3, 6, 7) pa v celici odstranijo aktinske in lamininske proteine, ki oblikujejo celični skelet ter tako povzročijo morfološke spremembe in apoptotično celično smrt. Aktivacija kaspaz in s tem programirana celična smrt sta lahko povzročeni preko dveh različnih, a konvergentnih poti: aktivacija smrtnih receptorjev (ekstrinzična pot) in mitohondrijska (intrinzična) pot (slika 1) (8,9,11).



Slika 1: Ekstrinzična in intrinzična pot apoptoze. Ekstrinzična pot se sproži po vezavi proteina iz TNF družine na njegov receptor, kar vodi v aktivacijo kaspaze 8. Intrinzična pot pa se sproži preko notranjih dejavnikov in vodi v sproščanje citokroma c preko mitohondrijske membrane. Pride do aktivacije kaspaze 9. Obe poti se združita z aktivacijo kaspaze 3 in sledi apoptoza. (povzeto po (9,13))

Ekstrinzično pot sproži vezava ligandov na smrtne receptorje, ki se nahajajo na površini celice. Najbolj znana med njimi sta receptor za Fas (FasR) ter receptor za dejavnik tumorske nekroze (TNF-R1). Po vezavi liganda se na smrtno domeno receptorja veže adapterska beljakovina, kar povzroči nastanek signalnega kompleksa, imenovanega DISC (angl. death-inducing signaling complex). Sem se veže tudi prokaspaza 8, ki se znotraj nastalega kompleksa proteolitično aktivira v kaspazo 8, ki je osrednji mediator apoptoze. Ta nato aktivira ostale kaspaze, med drugim tudi kaspazo 3, glavno efektorsko kaspazo (8-10,12).

Intrinzično pot pa lahko sprožijo mnogi dejavniki (reaktivne kisikove spojine, poškodbe DNA, znižanje ravnin rastnih faktorjev...), ki vodijo v povečanje prepustnosti membrane mitohondrija ter sproščanje mnogih molekul iz medmembranskega prostora, tudi citokroma c. Slednji se veže z Apaf-1 (apoptotični proteaze-aktivirajoči faktor 1) ter prokaspazo 9 v apoptosom, kar sproži aktivacijo kaspaze 9, ki potem aktivira kaspazo 3. Intrinzično pot nadzira ravnovesje med antiapoptotičnimi in proapoptotičnimi proteini Bcl-2 družine (8-10,12).

1.2.2 Apoptoza in rak

Ker je apoptoza eden izmed ključnih procesov za zagotavljanje homeostaze v organizmu, ni presenetljivo, da se v primeru spremenjenega poteka le-te lahko razvijejo različne bolezni. Preobsežno odmiranje celic je prisotno pri ishemiji po akutnem miokardnem infarktu, kapi, nevrodegenerativnih boleznih (Alzheimerjeva ali Parkinsonova bolezen), avtoimunih boleznih (npr. multipla skleroza), sindromu pridobljene zmanjšane imunske aktivnosti (AIDS), bakterijskih infekcijah (npr. *Neisseria meningitidis*), hematoloških motnjah (npr. mielodisplastični sindrom) in pri s toksini povzročenih boleznih (alkoholni hepatitis). Zavrta apoptoza pa se kaže v mnogih tumorjih, avtoimunih boleznih in arterosklerozi (9,10). Različne študije so pokazale s starostjo povezane spremembe v proteinih, ki regulirajo apoptozo, katere sovpadajo z večjo verjetnostjo za nastanek malignih, avtoimunih ali nevrodegenerativnih boleznih pri starejših ljudeh (10).

Akumulacija prevelikega števila malignih celic je rezultat prekomerne proliferacije in/ali nezadostne apoptoze. Tako mutacije, ki vodijo v inaktivacijo proapoptotičnih genov, kot tudi povečano izražanje in/ali aktivnost antiapoptotičnih proteinov povzročijo, da proces apoptoze v malignih celicah ne poteče (10). Najpogostejše spremembe predstavljajo

povečano izražanje antiapoptotičnih proteinov Bcl-2 družine ter mutacije v tumor zaviralnem genu *p53* (9). Opazili pa so tudi povečano izražanje IAP (proteinov iz družine zaviralcev apoptoze), mutacije gena *Fas* ter mutacije v genih, ki kodirajo kaspaze (10).

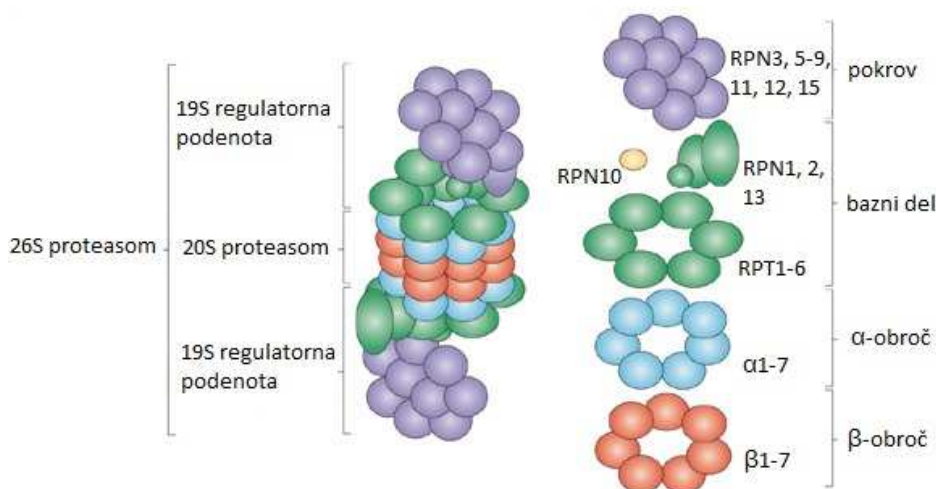
Večina učinkovin, ki se trenutno uporabljajo v terapiji raka, temelji na indukciji apoptoze preko obeh poti. Razvijajo se zaviralci kaspaz, zaviralci IAP, zaviralci antiapoptotičnih Bcl-2 proteinov ter zaviralci proteaz (10).

1.3 PROTEASOM IN ZAVIRALCI PROTEASOMA

Proteasom je multikatalitični kompleks, ki sodeluje z ubikvitinskim sistemom. Vključen je v različne biološke procese, med drugim tudi v napredovanje skozi celični cikel, popravilo DNA, apoptozo, imunski odziv, prenos signalov, transkripcijo in metabolizem. Proteasom 26S je sestavljen iz ene 20S podenote in dveh 19S podenot (slika 2) (14).

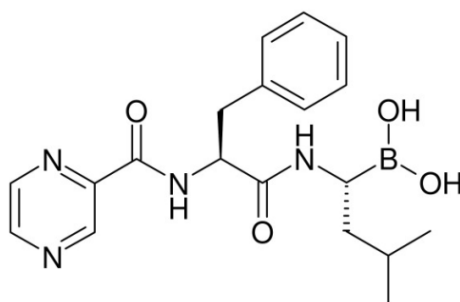
20S podenota predstavlja jedro, v katerem se proteini razgradijo. Je cilindrične oblike, zgrajena iz štirih heptamernih obročev, ki so sestavljeni iz dveh zunanjih α (strukturnih) ter dveh notranjih β (katalitičnih) podenot. Na notranji strani slednjih se nahajajo tri β podenote (β_1 , β_2 in β_5) s treoninom v aktivnem mestu, ki imajo hidrolitično aktivnost – imajo skupni mehanizem, a tri različne aktivnosti, in sicer kaspazi, tripsinu ter kimotripsinu podobno aktivnost (14).

Vsak konec jedra je povezan z 19S regulatorno podenoto, ki prepozna substrate proteasoma. 19S podenota sestoji iz 19 proteinov in je razdeljena na bazni del (10 proteinov) ter pokrov (9 proteinov). Bazni del je nujen za vezavo in razvijanje ubikvitiniliranih proteinov, pokrov pa skrbi za deubikvitiniranje substrata (14).



Slika 2: Shematski prikaz strukture proteasoma. (RPN: regulatorni ne-ATPazni del; RPT: ATPaza odvisni regulatorni del) (povzeto po (14))

Ker je proteasom ključni regulator razgradnje proteinov, predstavljajo **zaviralci proteasoma** edinstven pristop v terapiji rakavih obolenj (15). Strukturno so si precej različni in jih delimo v dve veliki skupini glede na to ali tvorijo kovalentno vez v aktivnem mestu. Vsi nekovalentni zaviralci so reverzibilni, kar pa velja tudi za nekatere kovalentne zaviralce. Mednje spada bortezomib (Velcade[®]), ki se v kliniki uporablja za zdravljenje multiplega mieloma (16). Bortezomib je analog dipeptida z molekulske formulo $C_{19}H_{25}BN_4O_4$, ki ima v svoji strukturi tudi boronsko kislino. (slika 3) (15). Spada v skupino peptidnih boronatov, ki tvorijo tetraedrične adukte z aktivnim mestom, ki so nato še dodatno stabilizirani z vodikovo vezjo med N-terminalno amino skupino in eno izmed hidroksilnih skupin boronske kisline (16). Bortezomib selektivno in reverzibilno zavira kimotripsinu podobno aktivnost, kar mu omogoči zaviranje razgradnje proteinov, ki so vpleteni v regulacijo celičnega cikla in preživetje celice (15).

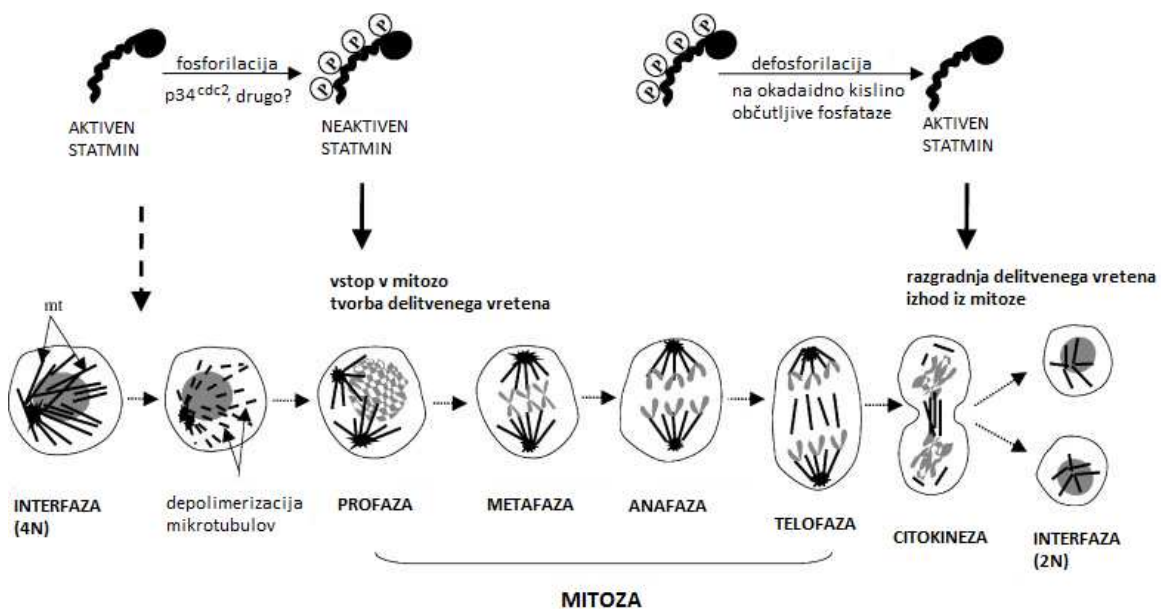


Slika 3: Struktura bortezomiba

1.4 STATMIN (STMN3)

Mikrotubuli so dinamični polimeri, sestavljeni iz dimernih podenot α/β tubulina, ki prispevajo k mnogim celičnim procesom, med drugim tudi k premikanju kromosomov in mitozi. Kar nekaj uspešnih protitumornih učinkovin deluje na mikrotubule ali tubulinske podenote, tarče pa postajajo tudi proteini, ki regulirajo sestavo in razgradnjo mikrotubulov. Eden izmed teh regulatornih proteinov je fosfoprotein statmin/onkoprotein 18 (17).

Je citosolni protein z molekulsko maso 17 kDa, ki regulira dinamiko mikrotubulov preko spodbujanja depolimerizacije le-teh in/ali preprečevanja polimerizacije heterodimerov tubulina. Pred vstopom v mitozo mikrotubuli polimerizirajo, da lahko tvorijo delitveno vreteno. Ta proces je omogočen s fosforilacijo statmina, ki se tako inaktivira. Preden celice zapustijo mitozo in vstopijo v interfazo, mora poteči ponovna aktivacija statmina z defosforilacijo (slika 4). Statmin je torej pomemben tako za tvorbo delitvenega vretena na začetku mitoze, kot za regulacijo funkcije le-tega v kasnejših fazah ter za pravočasen izhod celic iz mitoze. V primeru njegovega povečanega izražanja pride do ohromljene ali onemogočene tvorbe delitvenega vretena ter zastoja celic v zgodnjih fazah mitoze, zaviranje izražanja pa vodi v akumulacijo celic v G2/M fazah celičnega cikla ter je povezano z napakami v funkciji delitvenega vretena ter z oteženim izhodom celic iz mitoze (19).



Slika 4: Vloga statmina v mitotski fazi celičnega cikla. V začetku mitoze mikrotubuli (mt) depolimerizirajo in nato repolimerizirajo, da tvorijo delitveno vreteno. Inaktivacija statmina s fosforilacijo omogoči tvorbo delitvenega vretena in vstop v mitozo, medtem ko reaktivacija z defosforilacijo spodbudi razgradnjo le-tega in izhod iz mitoze (povzeto po (18)).

Izražanje statmina je povečano v mnogih rakavih obolenjih (levkemija, limfom, rak ploščatih celic, adenocistični rak, rak pljuč, hepatocelularni rak, adenokarcinom, rak prostate, sarkomi, glioma, rak dojke ter rak jajčnikov). Ugotovljeno je bilo, da so tumorji, kjer je ta protein prekomerno izražen, slabo diferencirani in imajo posledično slabšo prognozo, zato se statmin uporablja tudi kot biomarker za spremljanje stopnje napredovanja raka (17). Obstaja tudi močna korelacija med povečanim izražanjem statmina in celično proliferacijo, tako v normalnih kot v malignih celicah (17,18).

Dosedanje študije so pokazale, da zaviranje izražanja statmina v mnogih celičnih linijah vodi do zastoja celičnega cikla in apoptoze. Do slednje v določenih celicah pride že pri delnem zaviranju izražanja statmina, vendar pa predvidevajo, da vzrok zanjo ni zaustavitev mitoze. Na začetku namreč poteče fosforilacija statmina in med mitozo statmin mikrotubulov ne destabilizira, zato ni verjetno, da bi zaviranje preprečilo vstop celic v mitozo. Zadnji izsledki kažejo na to, da samo zaviranje statmina povzroči apoptozo le v tistih celičnih linijah (tako malignih kot normalnih), kjer je gen *p53* neaktiven, pri čemer celice zastanejo v G2 fazi celičnega cikla. Ti rezultati nakazujejo, da bi v terapiji lahko uporabili zaviranje izražanja statmina kot način povzročitve apoptoze v tumorjih brez funkcionalnega *p53* (17).

1.5 RGC-32

Rgc-32 gen je odzivni gen na komplement (angl. response gene to complement), katerega izražanje sproži aktivacija komplementa. Humani *rgc-32* gen kodira protein z molekularno maso 12.9 kDa in vsebuje zaporedje 117 aminokislin ter ima 92 % podobnost s podganjim in mišjim proteinom (19–21). Poleg aktivacije komplementa izražanje *rgc-32* gena sprožijo rastni faktorji, hormoni in citokini (19).

Protein RGC-32 ima pomembno vlogo v celičnem ciklu. Ugotovljeno je bilo, da deluje kot substrat in regulator od ciklina odvisne kinaze $p34^{CDC2}$ (CDK2) ter tako spodbuja proliferacijo. Direktno se veže na $p34^{CDC2}$ in poveča aktivnost kinaze, za vezavo pa je ključna fosforilacija RGC-32 in sicer na aminokislinskem ostanku treonina na mestu 91 (21). Ker ima pomembno vlogo v celični proliferaciji, ima vpliv tudi na procese diferenciacije. Slednje nakazuje ena izmed študij, kjer so iskali tarče v s TGF- β inducirani diferenciaciji gladkih mišičnih celic. Analiza eksperimentov na mikromrežah je namreč

pokazala, da je izražanje gena *rgc-32* močno povečano. Ker so že v poprejšnjih študijah ugotovili, da sta Smad in RhoA signalni poti nujni za to diferenciacijo, so predpostavili, da ju TGF- β aktivira, kar nadalje stimulira *rgc-32*. Slednji sproži transkripcijo gena za gladke mišične celice ter tako sproži diferenciacijo (22). Glede na to, da je *rgc-32* vključen v procese regulacije celičnega cikla ter diferenciacije, ni presenetljiva tudi njegova vloga v tumorigenezi (19).

V različnih študijah so bile opažene spremembe v izražanju RGC-32 proteina v tumorjih. Tako se je v raku debelega črevesa, jajčnikov, dojke, mehurja, pljuč ter prostate RGC-32 povečano izražal, medtem ko so v napredovalih stopnjah astrocitomov opazili zmanjšanje izražanja. Povečano izražanje *rgc-32* gena je bilo opaženo v kožnem T-celičnem limfomu, zmanjšano izražanje pa v multiplem mielomu. Tudi študije izražanja gena v invazivnih tumorjih so dale nasprotujoče si rezultate, in sicer je bilo izražanje povečano v raku dojke z osteolitičnimi metastazami, zmanjšano pa v metastaznem raku jeter in v na androgene odpornem metastaznem raku prostate (19,20).

Medtem ko povečano izražanje v tumorjih nakazuje na vlogo RGC-32 v tumorigenezi, pa je po drugi strani v različnih malignih celičnih linijah povečano izražanje vodilo v zakasnjeno napredovanje iz G2 v M fazo celičnega cikla (19,20). Zanimivo je, da so v študiji izražanja tega gena v nedrobnoceličnem pljučnem raku ugotovili, da je njegovo izražanje morda pogojeno z mutacijo gena *p53*. V tumorjih, ki so izražali divji tip *p53*, je *rgc-32* deloval kot tumor zaviralec in je metilacija v njegovi promotorski regiji vodila v nižjo stopnjo preživetja. Nasprotno pa je zmanjšanje izražanja preko metilacije v tumorjih z mutiranim *p53* vodilo v višjo stopnjo preživetja, kar nakazuje, da je deloval kot tumor promotor (23).

Vsi ti podatki kažejo na to, da je vloga *rgc-32* gena v rakavih obolenjih zelo kompleksna in še ni povsem raziskana. Potrebne so še nadaljnje študije, ki bi osvetlile njegovo natančno funkcijo.

1.6 ATF3

Protein ATF3 (aktivacijski transkripcijski faktor 3) je član družine ATF3/CREB (ang. ATF/cyclic AMP response element-binding) transkripcijskih faktorjev. Slednja predstavlja veliko skupino transkripcijskih faktorjev, ki imajo v osnovni regiji levcinsko zadrgo (bZIP; angl. basic-region leucine zipper). Osnovna regija v tej domeni je odgovorna za specifično vezavo DNA, medtem ko je t.i. levcinska zadruga odgovorna za oblikovanje homodimerov ali heterodimerov z drugimi bZIP-vsebujočimi proteini (24).

Aminokislinsko zaporedje ATF3 vsebuje 181 aminokislin, njegova molekulska masa pa je 22 kD. ATF3 dimerizira z drugimi ATF/CREB proteini, glede na vrsto promotorja pa lahko ti heterodimeri delujejo kot zaviralci ali aktivatorji transkripcije (24).

Atf3 gen je adaptivno-odzivni gen, ki sodeluje v različnih celičnih procesih z namenom prilagoditve na znotraj- ali zunajcelične spremembe (24). Njegovo izražanje je v mirujočih celicah nizko, v prisotnosti stresnih signalov pa se močno poveča. Izražanje povečajo tako karcinogeni, DNA poškodbe, hipoksija in anoksija, kot tudi signali, ki ne ustrezajo tipični definiciji stresnega signala – npr. adipocitokini ali prisotnost signala za napredovanje skozi S-fazo celičnega cikla (25).

1.6.1 ATF3 in rakava obolenja

Atf3 gen ima pomembno vlogo v tumorogenezi, saj regulira ravnotežje med proliferativnimi in apoptotičnimi signali, ki prispevajo k razvoju raka. Odvisno od vrste celice lahko igra *atf3* različne vloge. To lepo prikazuje študija, kjer so ugotovili, da je *atf3* okrepil s stresom povzročeno apoptozo v netransformiranih celicah humane celične linije raka dojke (MCF10A). Nasprotno pa je izražanje *atf3* v maligni celični liniji (MCF10CA1a) preprečilo s stresom inducirani zastoj celičnega cikla ter pospešilo gibljivost in invazivni potencial malignih celic. MCF10A in MCF10CA1a sta izogeni celični liniji z istim genetskim ozadjem, ki se razlikujeta le v spremembah, nastalih med maligno transformacijo, kar nakazuje, da stopnja malignosti vpliva na funkcijo *atf3* (26).

ATF3 kot onkogen

Povečano izražanje *atf3* gena v številnih tumorjih nakazuje, da morda deluje kot onkogen. Povečano izražanje so opazili v mnogih tumorjih dojke, potencialno zaradi pomnožitve gena. *Atf3* je namreč lokaliziran na kromosomu 1q32.3, znotraj amplikona 1q, regiji, ki je

najpogosteje pomnožena v tumorju dojke (26). Ugotovljeno je bilo tudi, da TGF- β v malignih celicah raka dojke sproži izražanje *atf3* gena, ki nato poveča izražanje tarčnih genov TGF- β . TGF- β je protein, ki nadzoruje celično proliferacijo, diferenciacijo ter druge procese v večini celic, v rakavih celicah pa so njegove signalne poti motene in zato prispeva k njihovi gibljivosti ter invazivnemu potencialu. Prav tako so ugotovili, da *atf3* poveča izražanje samega *tgf- β* gena in tako ustvarja pozitivno povratno zanko za signalizacijo TGF- β (25).

Povečano izražanje so opazili tudi pri raku ploščatih celic, (27) ter v celičnih linijah raka prostate (z največjo izraženostjo pri bolj agresivnih linijah) (28). V tkivu Hodgkinovega limfoma je bilo izražanje večje v primerjavi s tkivom ne-Hodgkinovega limfoma in ne-malignim tkivom. Pri zmanjšanju izražanja *atf3* se je tukaj zmanjšala proliferacija in število Hodgkin/Reed-Sternbegovih celic (29). Tudi v levkemičnih zrelih celicah T (ang. adult T-cell leukemia) je *atf3* povečal proliferacijo in sicer preko povečanega izražanja genov, ki so povezani s celičnim ciklom ter zmanjšanjem izražanja proapoptotičnih genov (30). Ugotovljeno je bilo tudi, da *atf3* spodbuja invazivnost celic tumorja prostate *in vitro*, *Drg-1* gen (metastaze zaviralni gen) pa zmanjša sposobnost metastaziranja teh celic preko zaviranja izražanja *atf3* (31).

ATF3 kot tumor zaviralec

V nasprotju z zgornjimi študijami, pa so nekatere druge raziskave nakazale, da *atf3* spodbuja apoptozo in zmanjša invazivni potencial različnih celičnih linij ter tako zavira tumorogenezo. V eni izmed študij so ugotovili, da se je po uporabi različnih kemopreventivnih substanc kot so sulindak sulfid, troglitazon in resveratrol, povečalo izražanje *atf3* v HCT-116 celicah kolorektalnega raka, ki je posledično vodilo v spremenjeno izražanje nekaterih genov, povezanih z invazivnostjo celic (32).

V celičnih linijah humanega gastričnega raka (TMK-1), raka kolona (HT29, HCT116, SW620) in raka pankreasa (L3.6pl) so pokazali, da zaviranje šaperona Hsp90 sproži povečano izražanje proteina ATF3. Hsp90 (ang. heat-shock protein 90) je s stresom inducirani protein, ki je povečano izražen v rakavih celicah. Znižanje ATF3 v HCT116 celičnih linijah je vodilo do povečane sposobnosti migracije rakavih celic *in vitro* ter povečane rasti tumorja *in vivo*, kar nakazuje, da ATF3 deluje kot tumor zaviralec in dejavnik zaviranja tumorske rasti (33).

Tako pristop pridobitve kot izgube funkcije *atf3* v mišjih fibroblastih sta pokazala, da je *atf3* proapoptičen, saj je zaviral napredovanje skozi celični cikel in sicer (vsaj delno) preko vpliva na cikline – vezal se je na promotor ciklina D1, sicer regulatorja celičnega cikla, in preprečil njegovo transkripcijo. *Atf3* je preko spodbujanja apoptoze tudi zavrl z Ras-om inducirano tumorogenezo, izguba funkcije pa je vodila v povečano proliferacijo Ras transformiranih celic (34). Ugotovili so tudi, da se protein ATF3 pod vplivom genotoksičnega stresa (doksorubicin, kampotekin, aktinomicin D) direktno veže na C-terminalni del proteina p53. Tako prepreči njegovo ubikvitinacijo in razgradnjo ter posledično poveča njegovo delovanje. Nasprotno pa izguba ATF3 ovira proapoptično in tumor zaviralno funkcijo p53 (35,36).

Vse zgoraj opisane študije potrjujejo dihotomno vlogo ATF3 v razvoju raka. Zdi se, da *atf3* gen, ki je povečano izražen v različnih tumorjih, prispeva k tumorogenezi, s stresom inducirani *atf3* pa le-to zavira. Razlog temu so najverjetneje različni učinki *atf3* na njegove tarčne gene. Nadaljnje raziskovanje in razumevanje molekularnega ozadja, ki določa vlogo ATF3 kot tumor zaviralca ali onkogeno bo lahko omogočilo racionalno načrtovanje učinkovin v prihodnosti.

2 NAMEN DELA

Diplomsko delo je nadaljevanje predhodnih študij, v katerih je bila sintetizirana in ovrednotena skupina zaviralcev serinskih proteaz kot induktorjev apoptoze. Pri tem je bilo ugotovljeno, da so spojine z N-amidinopiperidinskim skeletom selektivno toksične za celice Burkittovega limfoma. Mehanizem delovanja poteka preko zaviranja proteasoma, pri čemer je imela spojina **15** najnižjo konstanto zaviranja, zato je bila izbrana za nadaljnje raziskave. Izvedena analiza eksperimentov na mikromrežah je pokazala razlike v izražanju številnih genov, med katerimi smo izbrali tri za nadaljnje študije.

Namen našega dela je doprinesi k razumevanju molekularnih mehanizmov, ki so odgovorni za selektivno toksičnost spojine **15** za celice Burkittovega limfoma. Zato bomo v prvem delu diplomske naloge preverjali izražanje genov *stmn3*, *rgc-32* in *atf3* z metodo RT-PCR v celicah Ramos (celice Burkittovega limfoma) in sicer v različnih časovnih točkah po izpostavljanju spojini **15** ter bortezomibu, ki je znan zaviralec proteasoma. Izražanje teh genov bomo hkrati preverjali v celicah U937, za katere spojina **15** ni bila toksična. V primeru, da bomo potrdili razlike v izražanju genov, bomo v drugem delu diplomske naloge poskušali osvetliti signalizacijske poti, ki so vpletene v regulacijo teh genov. V ta namen bomo celice Ramos in U937 tretirali z zaviralci signalnih poti ter preverjali ali v katerem primeru pride do zmanjšane izražanja genov.

V zadnjem segmentu bomo ugotavljali citotoksičnost spojine **15** za limfoblastoidne celične linije, ki so se predhodno izkazale kot dobri modeli za iskanje tarč. V primeru, da bo naša spojina za katero od teh celičnih linij citotoksična, bomo tudi na teh linijah ovrednotili izražanje izbranih genov.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

Kemikalija	Proizvajalec
2-merkaptetanol	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
absolutni etanol (99 %)	KEFO, Ljubljana, Slovenija
antibiotik (streptomycin, penicilin) in antimikotik (amfotericin B), raztopina	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
bortezomib	Janssen-Cilag Internacional NV, Beerse, Belgija
DMSO (dimetilsulfoksid)	Merck Chemicals, Darmstadt, Nemčija
etanol 70 %	Merck Chemicals, Darmstadt, Nemčija
goveji serumski albumin (BSA)	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
zaviralec RNAz	Ambion, Invitrogen, California, ZDA
kloroform	MERCK, Whitehouse Station, NY, ZDA
medij RPMI 1640	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
oligonukleotidni začetniki za gen 18sRNA (PrimeTime™ Std qPCR Assay)	IDT®, Integrated DNA Technologies, Inc., Leuven, Belgija
oligonukleotidni začetniki za gen ATF3 (PrimeTime™ Std qPCR Assay)	IDT®, Integrated DNA Technologies, Inc., Leuven, Belgija
oligonukleotidni začetniki za gen RGC-32 (PrimeTime™ Std qPCR Assay)	IDT®, Integrated DNA Technologies, Inc., Leuven, Belgija
oligonukleotidni začetniki za gen STMN3 (PrimeTime™ Std qPCR Assay)	IDT®, Integrated DNA Technologies, Inc., Leuven, Belgija
oligonukleotidni začetniki (F in R) za gena 18sRNA in STMN3	KicqStart™ Primers for SYBR® Green I RT-qPCR, Sigma – Aldrich, MO, ZDA
raztopina tripanskega modrila (angl. Trypan Blue solution)	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
Trizol®	Invitrogen, California, ZDA

3.1.2 Reagenti

Reagent	Proizvajalec
Cell Titer 96 [®] AQueous One Solution Reagent (reagent za test celične metabolne aktivnosti)	Promega, Madison, WI, ZDA

3.1.3 Kompleti

Komplet	Proizvajalec
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems Inc., Foster City, California, ZDA
Purelink [™] RNA Mini Kit	Ambion, Invitrogen, California, ZDA
EvaGreen [®] qPCR Mix Plus	Solis BioDyne, Tartu, Estonija
Kapa Probe Fast Universal qPCR Kit	Kapa BioSystems, Inc., Woburn, MA, ZDA

3.1.4 Gojišča

Gojišče	Sestava
za celice Ramos	500 mL RPMI-1640 50 mL FBS 5,5 mL 200 mM L-glutamin 5,5 mL antibiotik/antimikotik 100x 0,5 mL 50 mM 2-merkaptetoetanol
za limfoblastoidne celične linije	500 mL RPMI-1640 50 mL FBS 11 mL 200 mM L-glutamin 5,5 mL antibiotik/antimikotik 100x

3.1.5 Laboratorijska oprema

Aparatura/Material	Proizvajalec
aparatura za PCR in reverzno transkripcijo 2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems, California, ZDA
aparatura za RT-PCR LightCycler 480	Roche Applied Science, Indianapolis, ZDA
avtoklav	A-21, Kambič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija
avtomatski števec za štetje celic (Countess™)	Invitrogen, Carlsbad, ZDA
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
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
komora z laminarnim pretokom zraka (LAF)	Waldner Electronics FAZ 3, Wangen, Nemčija
komora za delo z RNA in DNA – DNA/RNA UV-cleaner UVC/T-M-AR	Biosan, Riga, Latvija
krioviale	TPP, Trasadingen, Švica
krovna stekla	Assistent, Sondheim, Nemčija
LightCycler480 Multiwell plate 384, white	Roche Applied Science, Indianapolis, ZDA
Light Cycler 480 Sealing Foli	Roche Applied Science, Indianapolis, ZDA
mikrocentrifugirke (0,5, 1,5 in 2mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija
mikrotitrne ploščice za gojenje celičnih kultur (z 12, 24 ali 96 vdolbinami)	TPP, Trasadingen Švica
mikrotitrski čitalec (Safire ² ™ Genios)	Tecan, Genios, Zürich, Švica
nastavki za pipete (do 10, 200, 300 ali 1000	Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija

μL)	
pipete (100 – 1000 μl, 20 – 200 μL, 2 – 20 μL, 0,5 – 10 μL, 0,1 – 2,5 μL)	Eppendorf Research Plus, Nemčija
programska oprema za Tecan	Magellan V3.X IVD
serološke pipete za enkratno uporabo (5, 10 in 50 mL)	TPP, Trasadingen, Švica
spektrofotometer Nanodrop	Thermo Scientific, DE, ZDA
vibracijski mešalnik	Vortex GENIE 2, Scientific Industries, Orlando, Florida, ZDA Combi-Spin, Biosan, ZDA
vsebniki (T-flask) za gojenje celičnih kultur (s 25, 75 in 150 cm ² rastne površine)	TPP, Trasadingen, Švica
vodna kopel	Memmert, Schwabach, Nemčija
zamrzovalnik -80°C	Forma Scientific, ON, Kanada

3.1.6 Humane celične linije

Humane celične linije izvirajo iz malignega človeškega tkiva. So nesmrtni, kar pomeni, da so pridobile sposobnost neskončne delitve. To je tudi njihova glavna prednost v primerjavi s primarnimi celičnimi kulturami, katerih število delitev in s tem življenjska doba sta omejeni. Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali celične linije Ramos, U937 ter limfoblastoidne celične linije.

RAMOS

Ramos je celična linija humanega Burkittovega limfoma, pridobljena iz peritonealne tekočine 3-letnega kavkaškega dečka leta 1972. Celice so bile EBV negativne in izražajo nezreli fenotip limfocitov B. So okrogle celice, ki rastejo v suspenziji. Optimalna koncentracija je 0,5 – 1,5 x 10⁶ celic /mL. Podvojevalni čas je približno 48 ur.

U937

Celice U937 so monocitne celice, ki izvirajo iz difuznega histiocitnega limfoma in so bile pridobljene iz plevralne efuzije 37-letnega moškega. So okrogle do mnogokotne oblike, ki

rastejo posamično v suspenziji. Optimalna koncentracija je $0,1 - 1,0 \times 10^6$ celic /mL. Podvojevalni čas je približno 30 do 40 ur.

Limfoblastoidne celične linije (LCL; ang. lymphoblastoid cell lines)

LCL celične linije predstavljajo humane limfoblastoidne celične linije. Pridobljene so iz periferne krvi zdravih posameznikov, iz katere so izolirali limfocite B ter z EBV naredili nesmrtno celične linije. LCL celične linije je doniral prof. Gurwitz (medicinska fakulteta Tel-Aviv, Izrael).

3.2 METODE DELA S CELICAMI

Pri delu s celicami moramo vedno zagotavljati sterilne pogoje. V ta namen delo opravljamo v komori z laminarnim pretokom zraka (komora LAF), ki je nameščena v prostorih, kjer velja poseben režim čistoče (uporaba zaščitne halje, obutve in rokavic iz lateksa). LAF komora zagotavlja sterilne pogoje z omejenim dostopom ter stalnim pretokom preko HEPA filtrov filtriranega zraka na delovno površino (zrak onemogoča dostop kontaminantom in prahu). Komoro pred uporabo razkužimo s polurnim obsevanjem z ultravijolično svetlobo, tik pred pričetkom dela pa površine komore očistimo s 70 % etanolom. Pred vnosom v komoro s 70 % etanolom razkužimo tudi ves material in pripomočke, ter zaščitne rokavice (slednje večkrat razkužimo tudi med samim delom).

3.2.1 Gojenje celic

Celične linije RAMOS, U937 in LCL smo gojili in redčili v vsebnikih za gojenje celičnih kultur ali ploščicah za celične kulture v inkubatorju, ki zagotavlja ustrezne pogoje za rast celic (temperatura 37°C, 100 % vlažnost ter atmosfera s 5 % CO₂).

3.2.2 Subkultiviranje celičnih linij

Za doseganje ustreznega števila in optimalne rasti celic smo jih morali subkultivirati vsake dva do tri dni, tako da smo jih redčili z medijem RPMI, segretim na 37°C.

3.2.3 Odmrzovanje celic

Celične kulture shranjujemo v kriovialah pri -80°C v zamrzovalniku ali pri -180°C v Dewarjevi posodi s tekočim dušikom. Celice so shranjene v 10 % DMSO, ki je citotoksičen, zato se mora postopek odmrzovanja izvesti na hitro.

Kriovialo s celicami smo takoj prenesli iz zamrzovalnika oz. tekočega dušika v vodno kopal, segreti na 37°C in jo rahlo stresali, da smo pospešili odmrzovanje. Odmrznjeno vsebino smo prenesli v 15 mL centrifugirko, v katero smo predhodno odpipetirali 10 mL medija RPMI, segretega na 37°C. Suspenzijo smo centrifugirali 5 minut pri 1200 obr./min. Nastali supernatant smo odpipetirali in celice resuspendirali v ustreznem volumnu medija RPMI, segretega na 37°C. Celično suspenzijo smo prenesli v vsebnik za gojenje celičnih kultur in jo inkubirali v CO₂ inkubatorju.

3.3 ŠTETJE CELIC

Ročno štetje celic

Celice smo šteli s pomočjo hemocitometra pod invertnim mikroskopom. Pri tej metodi preštejemo celice v znanem volumnu in s pomočjo tega podatka izračunamo koncentracijo celic v suspenziji (št. celic/mL). Pod sterilnimi pogoji smo celično suspenzijo najprej resuspendirali, nato pa odpipetirali 10 µL celične suspenzije in jo prenesli v mikrocentrifugirko. Dodali smo 10 µL tripanskega modrila, ki obarva poškodovane in mrtve celice modro ter dobro premešali s pipeto. 10 µL pripravljene mešanice smo nanegli na hemocitometer. Nato smo pod mikroskopom prešteli število živih celic v štirih velikih kvadratih ter izračunali koncentracijo po spodnji enačbi:

$$\text{Št. celic/mL} = \frac{A + B + C + D}{4} \times f \times 10^4$$

A, B, C, D - št. živih celic v posameznem polju hemocitometra

f - faktor redčenja zaradi redčitve z gojiščem in mešanja s tripan modrim

10⁴ - volumen celične suspenzije nad kvadratom (1/mL)

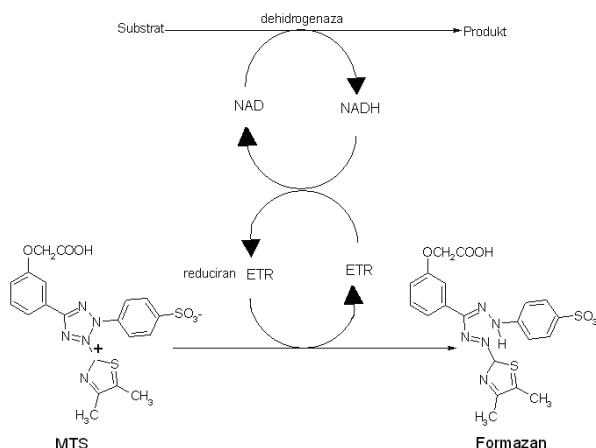
Enačba 1: Računanje koncentracije celic s hemocitometrom

Avtomatsko štetje celic

Za avtomatsko štetje celic smo uporabili avtomatski števec CountessTM. Mešanico smo pripravili na enak način kot pri ročnem štetju celic, nato pa smo 10 µL nanegli na ploščico, ki je sestavljena iz dveh merilnih celic. Ploščico smo vstavili v instrument in v 30 sekundah smo dobili naslednje rezultate: celokupno število celic, število živih celic in število mrtvih celic.

3.4 TEST ZA DOLOČANJE CELIČNE METABOLNE AKTIVNOSTI Z REAGENTOM MTS

Test MTS je kolorimetrična metoda za določanje števila preživelih celic v testu proliferacije ali citotoksičnosti. Reagent je sestavljen iz MTS-reagenta [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol], v obliki soli in fenazin etosulfata (angl. phenazine ethosulfate; PES), ki je reagent za prenos elektronov. PES ima okrepljeno kemijsko stabilnost, ki mu omogoča, da z MTS-reagentom tvori stabilno raztopino. Ta tetrazolijeva sol prehaja v celice, kjer se pod vplivom reducirajočih reagentov v mitohondrijih reducira do formazana (slika 5). Količina nastalega formazana je sorazmerna številu živih metabolno aktivnih celic in jo lahko merimo spektrofotometrično pri 490 nm (37).



Slika 5: Shematski prikaz celičnega metabolizma reagenta MTS. Redukcija MTS v formazan v metabolno aktivnih celicah je posledica delovanja dehidrogenaz, ki tvorijo reducirajoče reagente, npr. NADH ali NADPH. NADH prenese svoj elektron na reagent za prenos elektronov (angl. electron transfer reagent; ETR), kot npr. PES v našem primeru in ga tako reducira. Ta reduciran reagent za prenos elektronov lahko direktno reagira z MTS, ga reducira in nastane močno obarvan formazan (povzeto po (37)).

Postopek:

Najprej smo si pripravili suspenzijo izbrane celične kulture v koncentraciji $3,3 \times 10^5$ celic/mL v mediju RPMI 1640. Suspenzijo celic smo alikvotirali po 1000 μ L na ustrezno mikrotitrsko ploščico. LCL celične linije smo nato tretirali s spojino **15** v koncentraciji 75 μ M. Kot kontrolo smo uporabili netretirano celično kulturo oz. celično kulturo, ki smo ji dodali le DMSO. Po tretiranju smo celice v triplicatu po 100 μ L prenesli na mikrotitrsko

ploščico s 96 vdolbinicami. Inkubacija je potekala v inkubatorju za gojenje celic (37°C, 5 % CO₂). Po 48 urah smo v vsako vdolbinico dodali 10 µL reagenta MTS in inkubirali še 2-3 ure v inkubatorju. Po končani inkubaciji smo z mikrotitrskim čitalcem Tecan Safire² izmerili absorbanco nastalega formazana pri 492 nm. Večja kot je bila izmerjena absorbanca, večja je bila metabolna aktivnost celic. Istočasno smo test izvedli tudi z medijem RPMI (brez celic) in 10 µL MTS, s čimer smo določili absorbanco ozadja (slepa kontrola) in jo odšteli od absorbance vzorcev.

$$\% \text{ metabolne aktivnosti} = \frac{c(\text{vzorca}) - c(\text{slepe})}{c(\text{kontrola}) - c(\text{slepe})} \times 100$$

Enačba 2: Računanje odstotka metabolne aktivnosti celic

3.5 REAKCIJA POMNOŽEVANJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU

Reakcija pomnoževanja s polimerazo v realnem času (RT-PCR) je metoda, ki nam omogoča *in vitro* pomnoževanje DNA in spremljanje koncentracije DNA v vsakem ciklu (v realnem času). Omogoča nam, da potem določimo začetno koncentracijo DNA v vzorcu.

Pred izvajanjem RT-PCR reakcije smo morali najprej celice lizirati in izolirati RNA. Ker pa so molekule RNA precej nestabilne, RNAze v zraku in na koži pa jih hitro razgradijo, je potrebno za analitiko izražanja genov z RT-PCR RNA predhodno še prepisati v komplementarno zaporedje DNA.

3.5.1 Izolacija RNA

Ker je bil naš cilj merjenje izražanja genov, smo morali izmeriti količino mRNA v celicah, saj s tem določamo tudi izražanje le-teh.

Za hitrejšo izolacijo smo uporabili komercialni reagent Trizol. Je enofazna raztopina fenola in gvanidin izocianata, ki med celično lizo ohranja integriteto RNA molekul, hkrati pa celico uniči in razgradi njene komponente. Sledila je ekstrakcija s kloroformom, ki omogoči, da RNA ostane v vodni fazi, DNA in proteini pa v organski fazi. Izolirano RNA smo očistili s pomočjo kolon (PurelinkTM RNA Mini Kit, Ambion), ki vsebujejo membrane iz silikagela, na katere se veže RNA. S spiranjem se očistijo nečistote, na koncu pa se RNA eluira z vodo.

Postopek:

Celično kulturo smo prenesli v 15 mL centrifugirke ter jo centrifugirali 5 minut pri 2300-2400 obratih/min. Supernatant smo odpipetirali ter peleti dodali 1 mL Trizola. Suspenzijo smo dobro resuspendirali ter prenesli v mikrocentrifugirko, ki smo jo takoj dali na led. Po končanem delu smo vzorce do čiščenja shranjevali v zamrzovalniku pri -80°C .

Delo je potekalo v posebni RNA komori, katere površine smo predhodno razkužili z zaviralcem RNAz ter 15 minut obsevali z ultravijolično svetlobo. Z zaviralcem RNAz smo razkužili tudi vse reagentne in pripomočke.

Pred čiščenjem smo vzorce odmrznili ter inkubirali 5 minut na sobni temperaturi. Dodali smo 0,2 mL kloroforma ter mikrocentrifugirke močno stresali 15 sekund, da smo začeli ekstrakcijo. Stresali smo z roko in ne z vorteksiranjem, saj bi lahko poškodovali RNA. Po inkubaciji 2-3 minute na sobni temperaturi smo vzorce prenesli v centrifugo ter centrifugirali 15 minut na 12000xg pri 4°C . Po centrifugiranju se v mikrocentrifugirki pojavijo tri faze: rdeča kloroform-fenolna, interfaza in vodna faza; volumen slednje je približno 600 μL . Približno 400 μL vodne faze smo prenesli v mikrocentrifugirko, pri tem pa smo morali paziti, da nismo zraven zajeli tudi interfaze ali rdeče faze. Zatem smo dodali enak volumen 70 % etanola ter dobro premešali z obračanjem. Polovico vzorca smo prenesli na kolono. Kolone smo centrifugirali na 12000xg 15 sekund pri sobni temperaturi, eluat zavrgli, na kolono prenesli preostanek vzorca ter ponovno centrifugirali in zavrgli eluat. Kolono smo spirali s pufrji iz kompleta ter na koncu eluirali RNA v 50 μL vode brez RNAz. Koncentracijo RNA smo izmerili s spektrofotometrom Nanodrop.

3.5.2 Reverzna transkripcija

Kot prej omenjeno, reakcijo reverzne transkripcije uporabimo za pripravo komplementarne DNA iz RNA zaporedja. Prepis omogoča poseben encim, imenovan reverzna transkriptaza, ki jo v naravi najdemo v nekaterih virusih (npr. HIV). Reakcija poteka pri konstantni temperaturi, količina nastale cDNA pa je po končani reakciji enaka količini matične RNA.

Postopek:

Ker pri postopku reverzne transkripcije še vedno rokujemo z RNA, je delo tudi tukaj potekalo v posebni RNA komori, katere površine smo predhodno razkužili z zaviralcem

RNAz ter 15 minut obsevali z ultravijolično svetlobo. Z zaviralcem RNAz smo razkužili tudi vse reagente in pripomočke.

Odtaljene vzorce z očiščeno RNA smo premešali z vorteksiranjem. Izračunali smo potrebne redčitve vzorcev, da smo dobili potrebno končno koncentracijo zmesi za reverzno transkripcijo. Ta koncentracija je optimalna za kasnejšo aplikacijo na RT-PCR. Uporabili smo mikrocentrifugirke, vanje smo najprej odpipetirali vodo, nato pa še vzorce. Končni volumen redčitve je bil odvisen od količine RNA, ki smo jo želeli prepisati (običajno 400 ng, pa tudi 600 ng, 800 ng,..) Potrebne volumne vzorcev in vode smo izračunali po naslednjih enačbah:

$$V_{\text{vzorca}} = \frac{m(\text{RNA})}{c(\text{vzorca})} \text{ in } V(\text{H}_2\text{O}) = V(\text{zmesi za reakcijo}) - V(\text{vzorca})$$

Enačba 3: Izračun volumnov vzorca in vode, potrebnih za reakcijo reverzne transkripcije

Preglednica I: Primer izračuna redčitve vzorca za reverzno transkripcijo. V tem primeru je bila izbrana količina za prepis 600 ng RNA, končni volumen na reakcijo pa 15 µL.

Vzorec	C _{RNA} [ng/µL]	V _{vzorca} [µL]	V _{vode} [µL]
7	233	2,58	12,42
8	260	2,31	12,69
9	202,1	2,97	12,03

Nato smo pripravili osnovno zmes (mastermix), ki vsebuje reverzno transkriptazo, nukleotide, naključne začetne nukleotide, zaviralec RNAz ter reagenčni pufer (glej preglednico II). Mastermix smo dobro premešali s pipeto, dodali potrebno količino v vsak vzorec, ponovno premešali in na kratko centrifugirali. Vzorce smo vstavili v napravo za PCR reakcijo ter zagnali program za reverzno transkripcijo (preglednica III). Po končanem programu smo vzorce takoj uporabili za RT-PCR ali pa smo jih shranili v zamrzovalniku na -20°C.

Preglednica II: Sestavine osnovne zmesi za reakcijo reverzne transkripcije. V preglednici je prikazan tudi primer izračuna količine osnovne zmesi za 600 ng RNA.

Komponenta	Volumen/reakcija po predpisu [μL]	Volumen/reakcija [μL]
10 x RT Buffer	2.0	3
25x dNTP Mix (100mM)	0.8	1.2
10 x RT Random Primers	2.0	3.0
Multiscribe Reverse Transcriptase	1.0	1.5
RNAse inhibitor	1.0	1.5
Nuclease-free H ₂ O	3.2	4.8
Skupni volumen/reakcija	10	15

Preglednica III: Program reakcije reverzne transkripcije

	1.korak	2.korak	3.korak	4.korak
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	25	37	85	4
Čas	10 min	120 min	5 sek	∞

3.5.3 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času nam omogoča *in vitro* pomnoževanje DNA s hkratno kvantifikacijo novo nastale DNA. Prav tako kot klasična PCR reakcija nam omogoča detekcijo in kvantifikacijo (v smislu absolutnega števila kopij ali pa relativne vrednosti glede na začetno DNA) specifičnega segmenta DNA molekule. Njena prednost je v tem, da lahko DNA za razliko od klasične PCR reakcije kvantificiramo po vsakem ciklu. To lahko dosežemo z uporabo nespecifičnih fluorescenčnih sond, ki se interkelirajo v nastalo DNA in fluorescirajo ali pa uporabimo specifične sonde v obliki oligonukleotidov. Ti so označeni s fluorescenčnimi barvili, ki emitirajo svetlobo šele po hibridizaciji na komplementarno DNA zaporedje in odstranitvi dušilke.

Princip RT-PCR

Princip RT-PCR je v bistvu enak tistemu za klasično PCR reakcijo in sestoji iz aktivacije encima, prileganja oligonukleotidov ter pomnoževanja specifičnega odseka DNA. Za izvajanje reakcije je torej potreben ciklični termostat. Ta potem spreminja temperaturo po

vnajprej nastavljenem programu. V diplomskem delu smo uporabili dva različna kompleta za RT-PCR reakcijo.

1. EvaGreen[®] qPCR Mix Plus (Solis BioDyne)

Reakcijsko zmes najprej segrejemo na 95°C za 15 minut, da aktiviramo encim. Nato sledijo trije koraki, ki sestavljajo en cikel RT-PCR reakcije. Cikel se prične z denaturacijo dvovijačne DNA s segrevanjem na 95°C za 15 sekund. Tu se razdrejo vodikove vezi med obema verigama DNA. Nato temperaturo za 20 sekund spustimo na optimalno temperaturo začetnih nukleotidov, t.j. 60°C, saj se lahko stabilen hibrid začetni nukleotid – DNA matrica tvori le pri zelo dobrem ujemanju baz. Na ta hibrid se potem veže polimeraza in prične s sintezo komplementarne verige. Za proces podaljševanja DNA verige dvignemo temperaturo na 72°C za 20 sekund. DNA polimeraza sintetizira novo, komplementarno DNA verigo med obema začetnima nukleotidoma v smeri 5' proti 3'. V optimalnih pogojih se DNA podvoji, torej količina eksponentno narašča z vsakim ciklom.

Pri EvaGreen[®] postopku uporabimo nespecifične fluorescenčne sonde, ki interkelirajo v novo nastalo DNA in fluorescirajo.

2. Kapa Probe Fast Universal qPCR Kit (Kapa BioSystems)

Princip pri uporabi te polimeraze je podoben, razlika je v tem, da je potek te reakcije bistveno hitrejši. Najprej reakcijsko zmes segrejemo na 95°C za 2 minuti, da aktiviramo encim. Nato sledi polimerizacija v samo v dveh korakih in sicer najprej povišamo temperaturo na 95°C za 3 sekunde, nato pa jo spustimo na 60°C za 20 sekund. Na koncu spustimo temperaturo na 40°C za 10 sekund.

V reakcijsko zmes smo dodali tudi sonde označene s fluorescenčnim barvilom. Sonde so sestavljene iz oligonukleotida, na katerega sta vezana še fluorescenčno barvilo ter dušilec. Dokler sta ti dve molekuli na istem oligonukleotidu, dušilec onemogoča fluoresciranje barvila. Po razgradnji te sonde se dušilec in barvilo ločita in barvilo po ekscitaciji z laserjem fluorescira, kar zaznamo z detektorjem. Sonde se sicer priležejo na DNA matrico v istem času kot začetni oligonukleotidi. Ko DNA polimeraza sintetizira novo DNA verigo in doseže sonde, jih s svojim 5'-3' eksonukleaznim delom razgradi, kar loči barvo od dušilca in na detektorju lahko zaznamo fluorescenco.

Kvantifikacija rezultatov

Ker je fluorescenca direktno proporcionalna količini pomnožene DNA, lahko relativne koncentracije spremljamo z risanjem grafa fluorescence v odvisnosti od cikla. Določimo mejo kvantifikacije in cikel, v katerem jo fluorescenca vzorca preseže, imenujemo prazni cikel (ang. cycle threshold – C_T). Tako lahko potem določimo relativno koncentracijo DNA. Teoretično bi se naj količino DNA podvojila v vsakem ciklu. Ker pa niso vsi začetni nukleotidi enako učinkoviti, je učinkovitost reakcije redko 2. Zato vedno izračunamo učinkovitost reakcije (E), relativna koncentracija pa je nato izračunana po enačbi $c(\text{relativna}) = E^C$. Količino DNA v vzorcu nato izračunamo iz standardne krivulje. Standarde pripravimo tako, da serijsko redčimo znane količine DNA. Pri kvantifikaciji pa je potrebno upoštevati tudi biološko variabilnost med vzorci. Zato izračunano koncentracijo DNA normaliziramo na koncentracijo hišnega gena (ang. housekeeping gen) (glej preglednico IV). Tega izberemo tako, da se njegovo izražanje v vzorcu skoraj ne spreminja (oz. so razlike v izražanju le zaradi prisotnosti človeškega faktorja). Pri našem delu smo uporabili hišni gen 18sRNA.

Preglednica IV: Primer normalizacije na hišni gen. Izračunano koncentracijo preučevanega gena delimo s koncentracijo hišnega gena.

Vzorec	C_{ATF3}	C_{18sRNA}	C_{ATF3} / C_{18sRNA}
1	2,70386317	1,03909023	2,60214473
2	3,54905374	1,02756192	3,45385876
3	1,89257567	1,05323294	1,79692032

Postopek:

Delo smo izvajali v posebni DNA komori, katere površine smo pred delom prebrisali z 70 % etanolom ter obsevali z ultravijolično svetlobo 15 minut. Z 70 % etanolom smo pred vnosom v komoro razkužili tudi ves material in pripomočke ter zaščitne rokavice. Sonde, oligonukleotidne začetnike in vodo smo odtalili na sobni temperaturi.

1. Kapa Probe Fast Universal qPCR Kit (Kapa BioSystems)

Najprej smo pripravili osnovno zmes za RT-PCR reakcijo. Uporabili smo splošno osnovno zmes, ki je že pripravljena s strani proizvajalca, ter ji dodali specifične sonde in vodo. Pripravili smo osnovne zmesi za hišni gen in tarčne gene. Na

mikrotitrsko ploščico s 384 vdolbinami smo nanesti po 4 μL osnovnih zmesi. Vzorčke smo razredčili do koncentracije 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ali 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (kar se je predhodno izkazalo za bolj optimalno) ter jih v triplikatih nanesti v vdolbinice. V vsako vdolbino smo dodali po 2 μl vzorčka. Za tem smo si pripravili standarde za standardno krivuljo. Potrebne količine vzorčkov smo združili ter jih serijsko redčili v razmerju 1:1 (imeli smo 5 koncentracijskih standardov - 20, 10, 5, 2.5 in 1.25 $\text{ng}/\mu\text{L}$ oz. 10, 5, 2.5, 1.25 in 0.625 $\text{ng}/\mu\text{L}$). Volumen standardov, ki smo ga pipetirali, je bil prav tako 2 μL .

2. EvaGreen[®] qPCR Mix Plus (Solis BioDyne)

Kljub številnim optimizacijam pri uporabi Kapa Probe Fast Universal qPCR Kit-a nismo mogli določiti standardne krivulje za gen *stmn3*. Zato smo uporabili drug postopek.

Tudi tukaj smo najprej pripravili osnovno zmes za RT-PCR reakcijo, in sicer v koncentraciji 300 nM. Uporabili smo splošno osnovno zmes, ki je že pripravljena s strani proizvajalca, ter ji dodali začetne nukleotide (»forward« in »reverse«) in vodo. Na mikrotitrsko ploščico s 384 vdolbinami smo nanesti po 9 μL osnovne zmesi. Vzorčke smo razredčili do koncentracije 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ter jih v triplikatih nanesti v vdolbinice. V vsako vdolbino smo dodali po 6 μl vzorčka. Za tem smo si pripravili standarde za standardno krivuljo. Potrebne količine vzorčkov smo združili ter jih serijsko redčili (imeli smo 4 koncentracijske standarde – 30, 20, 10 in 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$). Volumen standardov, ki smo ga pipetirali, je bil prav tako 6 μL .

3.6 STATISTIČNA ANALIZA

Rezultate testov smo podali kot povprečje bioloških ponovitev skupaj s standardnim odklonom. Rezultate vzorcev smo statistično primerjali z rezultati kontrol. Pri tem smo za ovrednotenje statistično signifikantne razlike uporabili Studentov t-test. Za statistično signifikantni smo vzeli vrednosti * $p < 0,05$ ali ** $p < 0,01$.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 IZBOR GENOV

Predhodno je bila sintetizirana in ovrednotena skupina zaviralcev serinskih proteaz z N-amidinopiperidinsko strukturo, ki so bili selektivno citotoksični za celice Burkittovega limfoma (Ramos) in so povzročili celično smrt z indukcijo od kaspaz odvisne apoptoze. Mehanizem delovanja poteka preko zaviranja proteasoma, pri čemer je imela spojina **15** najnižjo konstanto zaviranja, zato je bila izbrana za nadaljnje raziskave (38). Izvedeni so bili eksperimenti na mikromrežah.

Tehnologija DNA mikromrež omogoča celostne študije genoma (DNA) in transkriptoma (RNA). Na ravni transkriptoma sledimo izražanju genov z uporabo ekspresijskih mikromrež. Vsak gen je na mikromreži zastopan na določenem mestu. Organizirana razporeditev skupin DNA molekul predstavlja matrico, na kateri po hibridizaciji določimo razliko v izražanju genov med poskusnim vzorcem in kontrolo. Postopek temelji na hibridizaciji komplementarnih baz oz. verig. Mikromrežo izpostavimo fluorescentno ali radioaktivno označeni sondi, ki jo pripravimo iz preiskovanih celic ali tkiv. Hibridizacijski signal na določenem mestu matrice nam izraža identiteto nukleotidnega zaporedja, velikost signala pa je merilo za količino izraženega genskega produkta. Za izražanje genov se uporabljajo tako oligonukleotidne kot cDNA mikromreže. V prvem primeru čip vsebuje gene, ki jim je skupna fizična lokacija (npr. človeški kromosom 22) ali kar vse gene določenega organizma, pri drugem pristopu pa čip vsebuje izbrane gene, ki so med seboj smiselno (tematsko) povezani (39). Pri eksperimentalnem delu so bile uporabljene cDNA mikromreže in sicer čipi HumanHT-12 v4 Beadchip (Illumina). Postopek (pretvorba mRNA v cDNA, hibridizacija in detekcija) je bil izveden v CBM (AREA Science Park, Trieste), analiza podatkov pa je bila opravljena na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani, in sicer s programom Chipster (CST-IT Center for Science, Ltd., Finland).

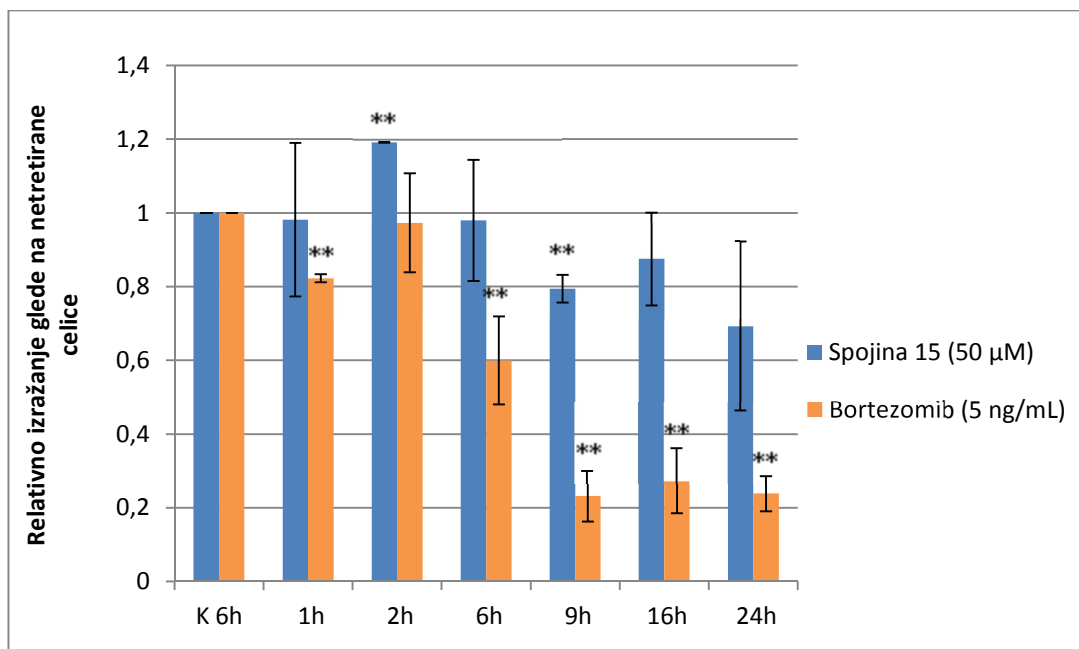
Analiza eksperimentov na mikromrežah je pokazala značilne razlike v izražanju številnih genov. Ugotovljeno je bilo, da je v celicah Burkittovega limfoma izražanje gena *atf3* najbolj povečano, izražanje gena *stmn3* najbolj zmanjšano, za gen *rgc-32* pa velja, da je v celicah Burkittovega limfoma značilno povečano izražen, a je spojina **15** njegovo izražanje močno znižala. Zato smo v prvem delu diplomske naloge želeli preveriti izražanje teh treh genov z metodo RT-PCR v celicah Ramos in sicer v različnih časovnih točkah po

izpostavljanju spojini **15** ter bortezomibu, ki je znan zaviralec proteasoma, a ni selektivno citotoksičen. V našem eksperimentu smo preverili, kako spojina **15** v primerjavi z bortezomibom modulirana izražanje teh genov. Izražanje genov smo preverili tudi v celicah U937, za katere so predhodno ugotovili, da niso dovzetne za spojino **15**.

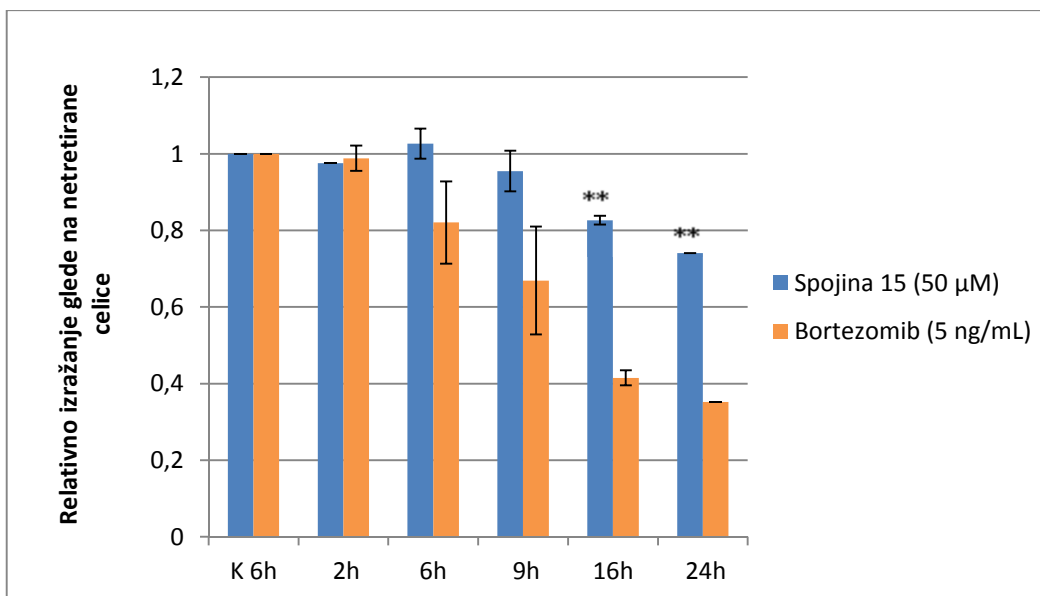
4.2 IZRAŽANJE IZBRANIH GENOV PO MODULACIJI PROTEASOMSKEAKTIVNOSTI

Celice Ramos ter U937 (v koncentraciji 1×10^6 /mL) smo tretirali s spojino **15** ($c = 50 \mu\text{M}$) ter z bortezomibom ($c = 5 \text{ ng/mL}$). Inkubirali smo jih različno dolgo ter jih nato po določenih časovnih točkah lizirali, izolirali mRNA ter določili nivo izražanja genov z metodo RT-PCR. Časovne točke in koncentracije smo izbrali na podlagi testov metabolne aktivnosti ter določanja apoptoze, ki so bili izvedeni v predhodnih študijah (38). Rezultate smo primerjali z izražanjem genov v netretiranih celicah in predstavljajo povprečje štirih (celice Ramos) oz. dveh (celice U937) bioloških ponovitev.

4.2.1 Izražanje gena *stmn3* po modulaciji proteasomske aktivnosti



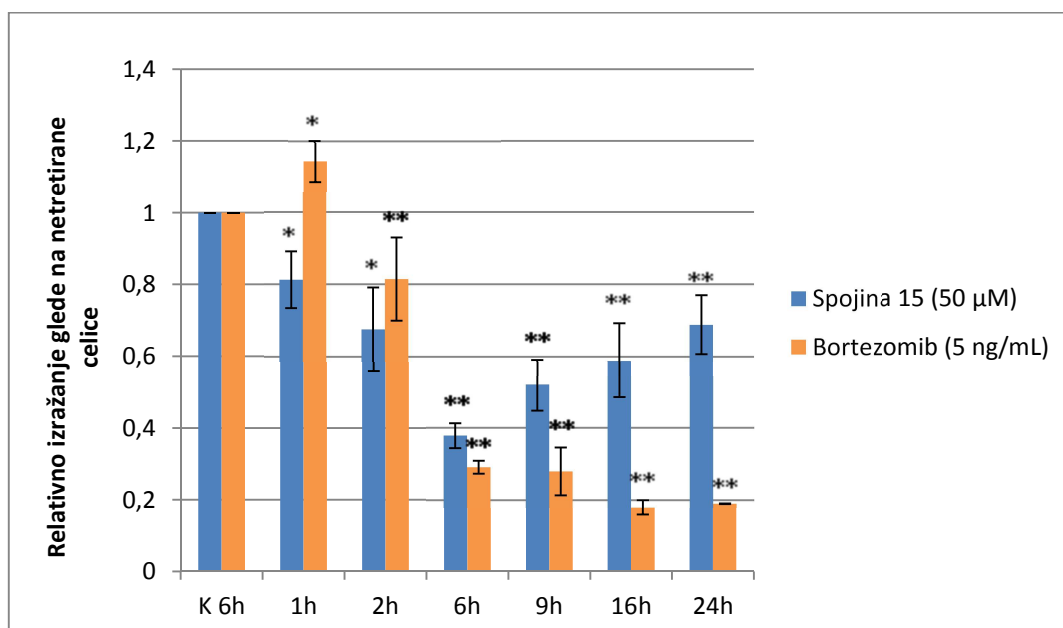
Slika 6: Izražanje gena *stmn3* v celicah Ramos po tretiranju s spojino **15 in bortezomibom.** Izražanje gena smo določali z metodo RT-PCR in rezultate normalizirali glede na netretirane celice. Koncentracije spojin: $c(\text{spojina } \mathbf{15}) = 50 \mu\text{M}$; $c(\text{bortezomib}) = 5 \text{ ng/mL}$; K 6h – kontrola 6h; ** $p < 0.01$



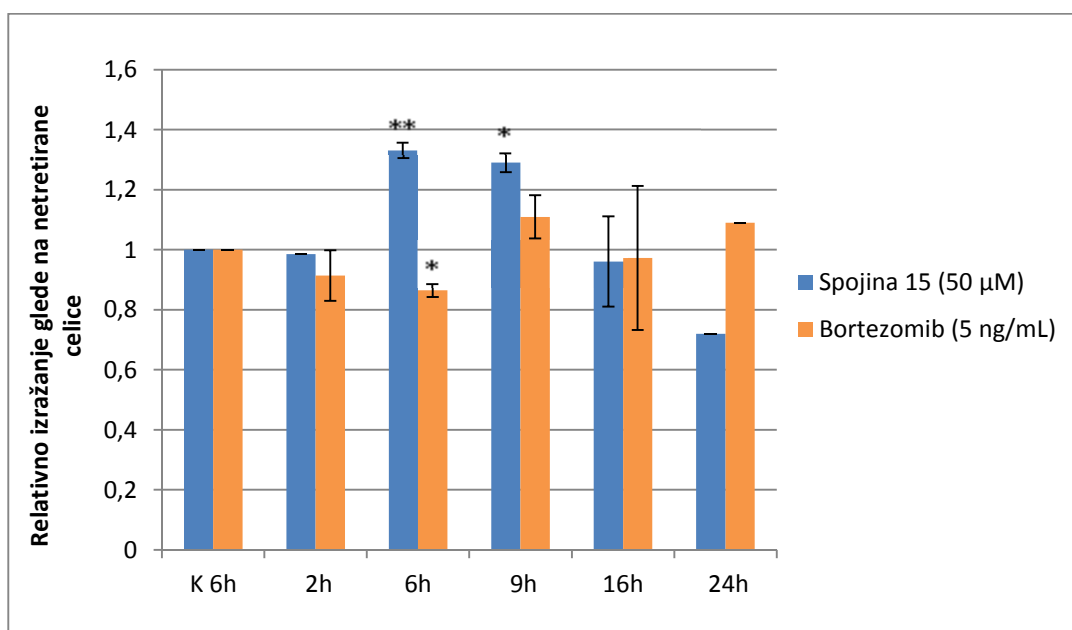
Slika 7: Izražanje gena *stmn3* v celicah U937 po tretiranju s spojino 15 in bortezomibom. Izražanje gena smo določali z metodo RT-PCR in rezultate normalizirali glede na netretirane celice. Koncentracije spojin: c(spojina 15) = 50 µM; c(bortezomib) = 5 ng/mL; K 6h – kontrola 6h; ** p < 0.01

Na slikah 6 in 7 vidimo, da je tako v celicah Ramos kot v celicah U937 po stimulaciji s spojino 15 in bortezomibom prišlo do zmanjšane izražanja gena *stmn3*, ki pa je podobno v obeh tipih celic. Izražanje gena *stmn3* po stimulaciji s spojino 15 je zmanjšano za največ 20 odstotkov, medtem ko bortezomib izražanje tega gena opazno bolj zmanjša, sploh v kasnejših časovnih točkah. Kot je bilo že omenjeno, so celice Ramos dovzetne za spojino 15, celice U937 pa ne, zato je naš cilj poiskati tiste gene, pri katerih so (ob izpostavljanju spojini 15) razlike v izražanju med obema tipoma celic velike. Ker je trend in nivo izražanja podoben v celicah Ramos in U937 pri uporabi iste koncentracije spojine 15, lahko predvidevamo, da gen *stmn3* ni ključen pri doseganju selektivne citotoksičnosti spojine 15.

4.2.2 Izražanje gena *rgc-32* po modulaciji proteasomske aktivnosti



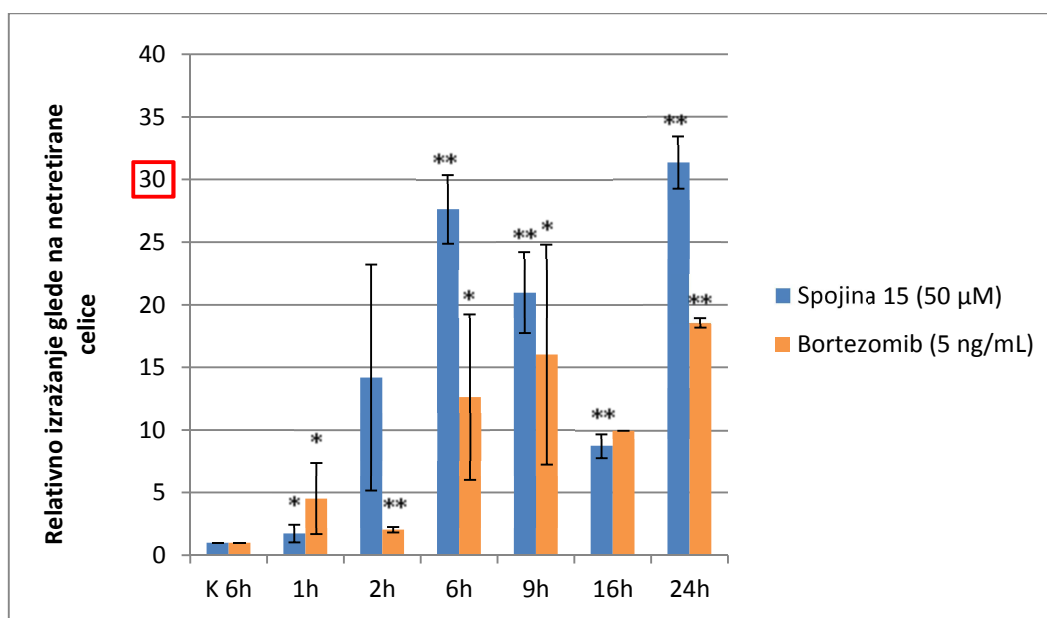
Slika 8: Izražanje gena *rgc-32* v celicah Ramos po tretiranju s spojino 15 in bortezomibom. Izražanje gena smo določali z metodo RT-PCR in rezultate normalizirali glede na netretirane celice. Koncentracije spojin: c(spojina 15) = 50 µM; c(bortezomib) = 5 ng/mL; K 6h – kontrola 6h; * p < 0.05; ** p < 0.01



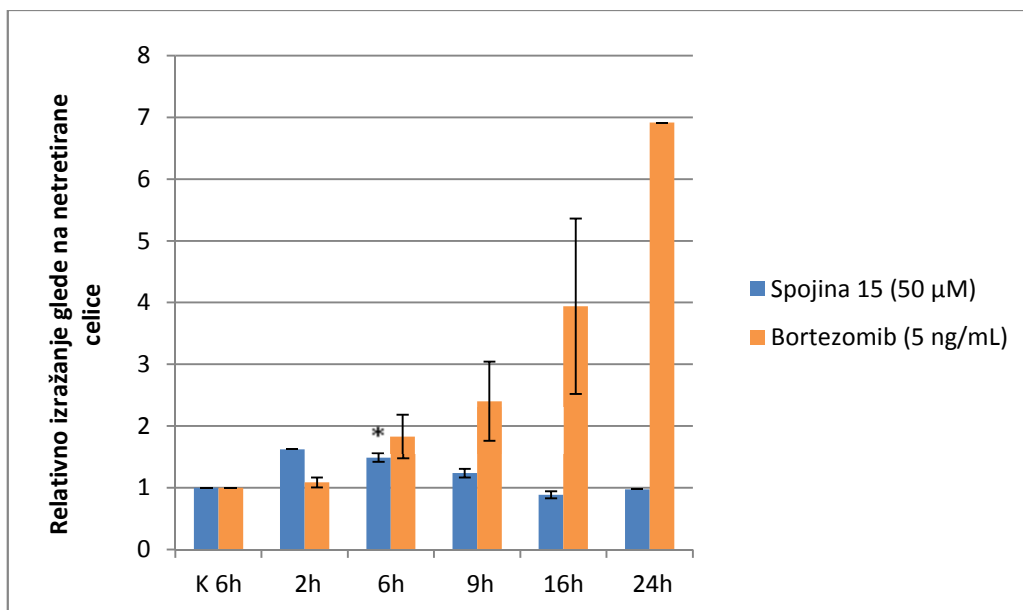
Slika 9: Izražanje gena *rgc-32* v celicah U937 po tretiranju s spojino 15 in bortezomibom. Izražanje gena smo določali z metodo RT-PCR in rezultate normalizirali glede na netretirane celice. Koncentracije spojin: c(spojina 15) = 50 µM; c(bortezomib) = 5 ng/mL; K 6h – kontrola 6h; * p < 0.05; ** p < 0.01

Iz grafa na sliki 8 je razvidno, da je izražanje gena *rgc-32* v celicah Ramos po tretiranju s spojino **15** zmanjšano, in sicer se izražanje zmanjšuje do časovne točke 6 ur, nato pa začne ponovno naraščati. Pri bortezomibu je opaženo majhno povečanje izražanja po 1 uri, v ostalih časovnih točkah pa je izražanje manjše kot pri netretiranih celicah. V celicah U937 je situacija nekoliko drugačna, saj je nivo izražanja vseskozi približno enak kot pri netretiranih celicah, pri izpostavljanju spojini **15** se v časovnih točkah 6 ur in 9 ur celo nekoliko zviša. Torej, v celicah Ramos tako spojina **15** kot bortezomib povzročita znižanje *rgc-32*, medtem ko v celicah U937 na izražanje skoraj ne vplivata. Sklepamo lahko, da tudi ta gen ni ključen za doseganje selektivne citotoksičnosti spojine **15**.

4.2.3 Izražanje gena *atf3* po modulaciji proteasomske aktivnosti



Slika 10: Izražanje gena *atf3* v celicah Ramos po tretiranju s spojino **15** in bortezomibom. Izražanje gena smo določali z metodo RT-PCR in rezultate normalizirali glede na netretirane celice. Koncentracije spojin: c(spojina **15**) = 50 µM; c(bortezomib) = 5 ng/mL; K 6h – kontrola 6h; * p < 0.05; ** p < 0.01



Slika 11: Izražanje gena *atf3* v celicah U937 po tretiranju s spojino 15 in bortezomibom. Izražanje gena smo določali z metodo RT-PCR in rezultate normalizirali glede na netretirane celice. Koncentracije spojin: c(spojina 15) = 50 µM; c(bortezomib) = 5 ng/mL; K 6h – kontrola 6h; * $p < 0.05$

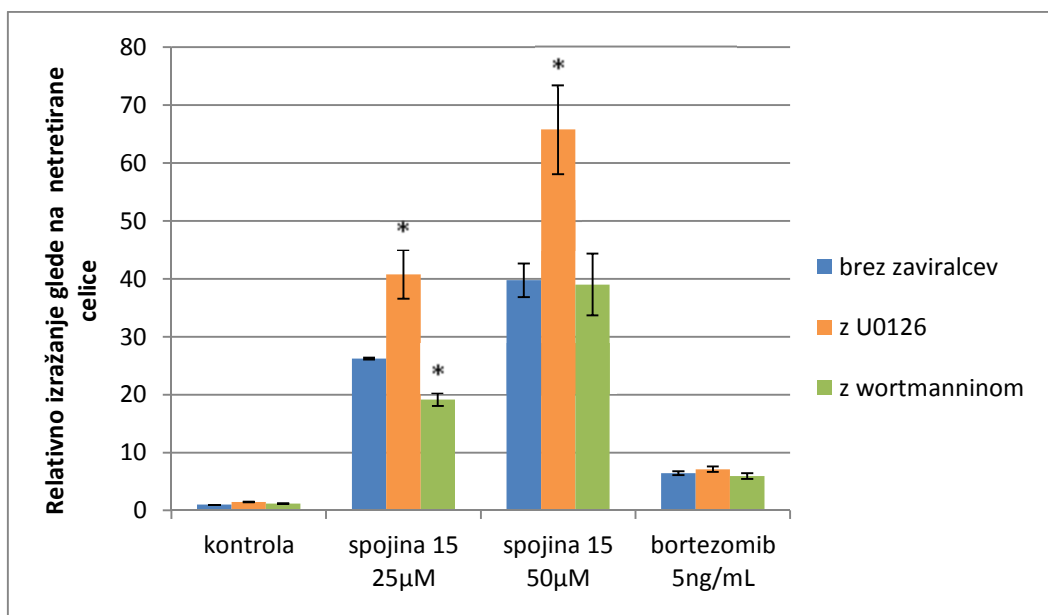
Pri izražanju gena *atf3* je prišlo do največjih sprememb, če primerjamo celice Ramos in U937. V celicah Ramos se je opazno povečalo izražanje *atf3* tako po tretiranju celic s spojino 15 kot po tretiranju z bortezomibom. Nivo izražanja se je po 6 urah povečal za skoraj 30-krat, nato pa se je začel ponovno zmanjševati, po 24 urah pa se je ponovno povišal. Na grafu, ki predstavlja izražanje gena *atf3* v celicah U937 tretiranih s spojino 15, je opaziti le neznatno povečanje izražanja gena (največ cca. 1,5-krat v časovni točki 2 uri), nato pa izražanje spet pada in po 16 urah je nivo celo nižji kot pri netretiranih celicah. Kljub temu, da je med rezultati različnih bioloških ponovitev prišlo do nekoliko višje standardne deviacije, je bil v vseh primerih opažen enak trend. Za razliko od spojine 15, ki skoraj ne spremeni izražanja *atf3*, pa pri U937 celicah tretiranih s bortezomibom, opazimo časovno odvisno povišano izražanje. Na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo, da je *atf3* pomemben pri doseganju selektivne citotoksičnosti. Namreč bortezomib, ki je bil toksičen tako za U937 kot Ramos, v celicah obeh linijah povzroči povišan prepis gena, medtem pa te spremembe za spojino 15 v U937 celicah ne vidimo.

V prvem delu diplomske naloge smo torej ugotovili, da je le eden izmed treh izbranih genov tisti, ki potencialno prispeva k selektivni citotoksičnosti spojine 15.

4.3 IZRAŽANJE GENA *atf3* OB SOČASNI UPORABI ZAVIRALCEV SIGNALNIH POTI

V drugem delu diplomske naloge smo se osredotočili na *atf3* gen. Zanimalo nas je, katere signalne poti so vpletene v njegovo regulacijo. V ta namen smo izražanje slednjega ugotavljali ob dodatku zaviralcev signalnih poti, in sicer U0126 (zavira del MAP kaskade) ter wortmannina (zavira Akt signalno pot).

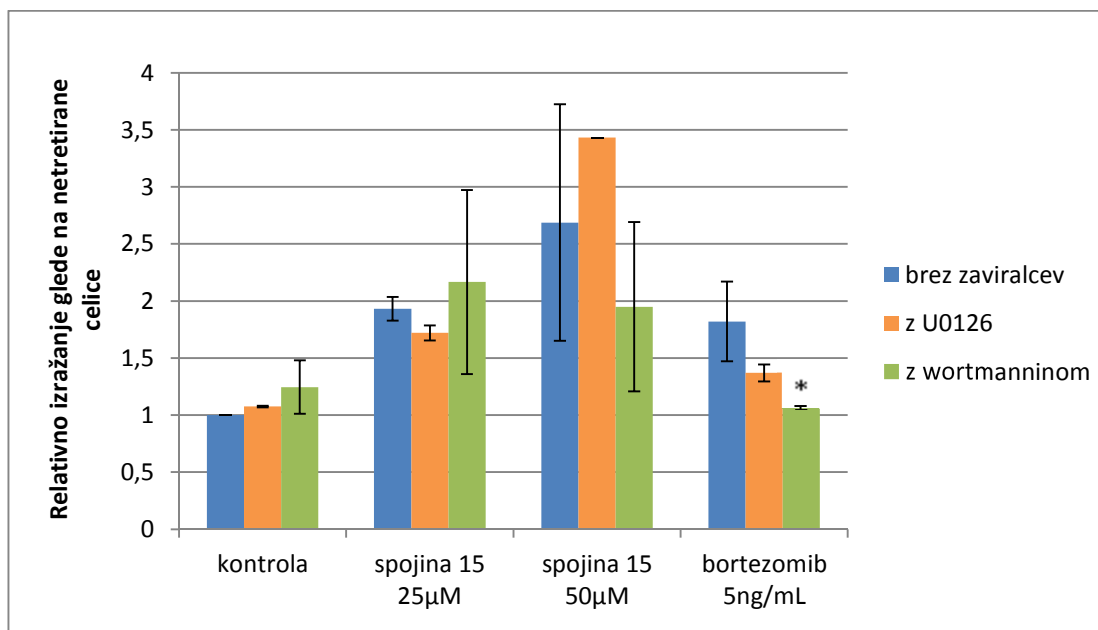
Celice Ramos ter U937 (v koncentraciji 1×10^6 /mL) smo tretirali s spojino **15** ali z bortezomibom in sicer v prisotnosti ali odsotnosti zaviralca U0126 ali wortmannina. Izražanje gena *atf3* smo merili v časovni točki 6 ur, saj smo v predhodnih eksperimentih pokazali, da je takrat njegov nivo izražanja najvišji. V tej časovni točki smo celice lizirali, izolirali mRNA ter določili nivo gena z metodo RT-PCR. Primerjali smo izražanje ob dodatku enega ali drugega zaviralca s celicami, ki so bile tretirane samo s spojino **15** ali bortezomibom. Rezultati predstavljajo povprečje dveh bioloških ponovitev.



Slika 12: Izražanje gena *atf3* v celicah Ramos ob prisotnosti zaviralcev signalnih poti. Izražanje gena smo določali z metodo RT-PCR in rezultate normalizirali glede na netretirane celice. Celice smo tretirali 6 ur. Koncentracije spojin: c(spojina **15**) = 25 µM ali 50 µM; c(bortezomib) = 5 ng/mL; c(U0126) = 5 µM; c(wortmannin) = 300 nM; * p < 0.05

Prvi trije stolpci na grafu (slika 12) predstavljajo izražanje gena v celicah Ramos samo v mediju z 0,1 % DMSO, ter ob dodatku U0126 ($c = 5 \mu\text{M}$) oz. wortmannina ($c = 300 \text{ nM}$). Kot vidimo, je nivo izražanja približno enak, kar kaže na to, da smo uporabili koncentracije zaviralcev, ki same po sebi ne vplivajo na izražanje *atf3*.

Primerjava izražanja gena v celicah tretiranih s $25 \mu\text{M}$ spojino **15** in wortmaninom ali U0126 pokaže signifikantni vpliv na nivo *atf3*. Zaviranje MAP kinaznih poti z U0126 vodi v rahlo povišanje, medtem pa prisotnost wortmannina povzroči znižanje izražanja. Slednji učinek izzveni, če uporabimo višje koncentracije spojine **15**, saj wortmannin ne more več premostiti močnega delovanja spojine na izražanje gena. To nakazuje, da je Akt signalna pot sicer vpletena v *atf3* regulacijo, vendar najverjetneje ni ključnega pomena. Za natančnejše razumevanje bi bilo potrebno te mehanizme podrobneje raziskati. Pri tretiranju celic v kombinaciji bortezomib in zaviralci, ni opaziti razlik v izražanju.



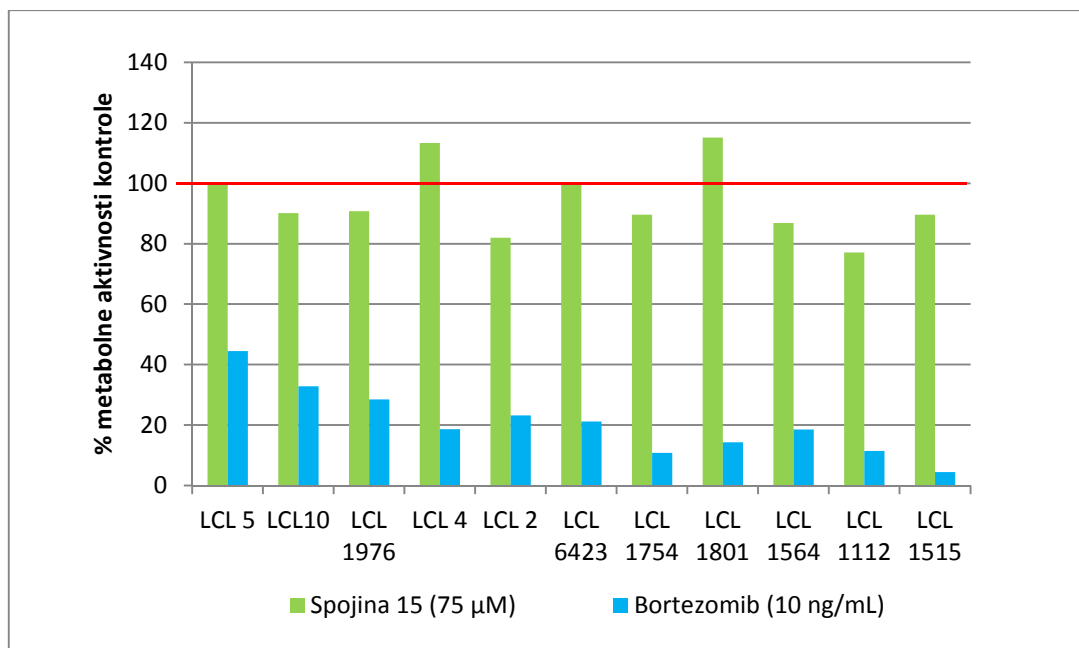
Slika 13: Izražanje gena *atf3* v celicah U937 ob prisotnosti zaviralcev signalnih poti. Izražanje gena smo določali z metodo RT-PCR in rezultate normalizirali glede na netretirane celice. Celice smo tretirali 6 ur. Koncentracije spojin: $c(\text{spojina } \mathbf{15}) = 25 \mu\text{M}$ ali $50 \mu\text{M}$; $c(\text{bortezomib}) = 5 \text{ ng/mL}$; $c(\text{U0126}) = 5 \mu\text{M}$; $c(\text{wortmannin}) = 300 \text{ nM}$; * $p < 0.05$

Za primerjavo smo enak preizkus opravili še na celicah U937. Lahko vidimo, da je sama skala izražanja *atf3* gena v prisotnosti spojine **15** v teh celicah v primerjavi s celicami Ramos precej nižja. Izražanje gena *atf3* v U937 celicah je tako po 6-urnem tretiranju s spojino **15** ali z bortezomibom precej podobno. Medtem ko v celicah Ramos opazimo vpliv Akt kot tudi MAP kinazne signalne poti na regulacijo *atf3*, pa v U937 temu ni tako. Sočasno tretiranje s spojino **15** in U0126 ali wortmanninom namreč ni doprineslo k signifikantnim spremembam v izražanju tega gena. V U937 celicah pa je viden vpliv wortmannina na izražanje *atf3*, ki ga povzroči bortezomib, saj ga značilno zniža. Če povzamemo rezultate, lahko sklepamo, da ima ATF3 vlogo pri selektivni toksičnosti spojine **15**, saj so opazne razlike tako med celicami Ramos in U937 kot tudi, če primerjamo izražanje z izražanjem pri izpostavljanju bortezomibu. Ti podatki predstavljajo osnovo za nadaljne študije, kjer bo potrebno dodatno osvetliti in potrditi vlogo ATF3.

4.4 VREDNOTENJE CITOTOKSIČNOSTI V LIMFOBLASTOIDNIH CELIČNIH LINIJAH (LCL)

Limfoblastoidne celične linije (LCL) izvirajo iz B limfocitov in ohranijo večino njihovih fenotipskih lastnosti. Zanje je značilno, da se EBV genom ne vključi v jedrno DNA, tako da jedrno genomsko zaporedje ostane intaktno, transkriptomi LCL celičnih linij pa vsebujejo velik del humanih genov iz različnih signalnih poti celic. Ker LCL-i ohranijo genomske, transkriptomске in proteomske variacije, odražajo heterogenost, specifično za posameznika in tako predstavljajo preprost, zanesljiv, ponovljiv in učinkovit vir za študije v humani genetiki, farmakogenetiki ter v študijah transkriptoma, epigenoma in proteoma. Te linije so se izkazale kot dobre v študijah, kjer so preko izražanja genov iskali nove markerje v reakcijah za občutljivost na učinkovine. Primerjali so transkriptome »krajnih« LCL-ov, t.j. tistih celičnih linij z relativno nizko ali visoko občutljivostjo na potencialne citotoksične učinkovine (40).

V zadnjem delu smo zato želeli ovrednotiti citotoksičnost spojine **15** za te celice. V ta namen smo izbrali 11 LCL linij (LCL 5 , LCL 10, LCL 1976, LCL 4, LCL 2, LCL 6432, LCL 1754, LCL 1801, LCL 1564, LCL 1112 ter LCL 1515). Celice smo tretirali s spojino **15** ($c = 75 \mu\text{M}$) ter z bortezomibom ($c = 10 \text{ ng/mL}$), ki smo ga uporabili z namenom, da bi lažje ocenili citotoksičnost spojine **15**. Celice smo inkubirali 48 ur, nato pa izvedli test MTS, kot je opisano v protokolu. Rezultate smo podali v odstotkih metabolne aktivnosti glede na kontrolo, ki jo predstavljajo netretirane celice.



Slika 14: Metabolna aktivnost limfoblastoidnih celičnih linij pri tretiranju s spojino 15 in bortezomibom. 11 celičnih linij LCL smo inkubirali s spojino 15 ($c = 75 \mu\text{M}$) ali bortezomibom ($c = 10 \text{ ng/mL}$) 48 ur. S testom MTS smo izmerili celično metabolno aktivnost. Slika prikazuje metabolno aktivnost celic, normaliziranih na metabolno aktivnost kontrolnih (netretiranih) celic.

Na podlagi testa MTS je razvidno, da je bortezomib mnogo bolj citotoksičen za celice LCL kot spojina 15. Slednja ne izkazuje nobenega vpliva na metabolno aktivnost LCL 5, LCL 4 in LCL 1801. Tudi na ostalih celičnih linijah je prisoten le minimalen vpliv na metabolno aktivnost. Zaključimo lahko, da celične linije LCL niso dovzetne za spojino 15. Ker s pomočjo testa MTS nismo uspeli določiti »krajnih« LCL-ov (t.j. tistih z relativno nizko ali visoko občutljivostjo na spojino 15), LCL linij nismo mogli uporabiti kot model za nadaljnje vrednotenje izražanja izbranih genov.

5 SKLEP

Burkittov limfom spada med najbolj agresivne B-celične limfome. Ker se za zdravljenje uporablja kombinacija zelo agresivnih citostatikov, so neželeni učinki pogosti. V želji po iskanju novih terapevtskih pristopov, ki bi bolj selektivno vplivali na molekularne spremembe Burkittovega limfoma, je bila sintetizirana in ovrednotena skupina zaviralcev serinskih proteaz kot induktorjev apoptoze. Pri tem je bilo ugotovljeno, da so spojine z N-amidinopiperidinskim skeletom selektivno toksične za celice Burkittovega limfoma, njihov mehanizem delovanja pa poteka preko zaviranja proteasoma. S spojino, ki je imela najnižjo konstanto zaviranja, je bila izvedena analiza na mikromrežah, ki je pokazala razlike v izražanju številnih genov.

Da bi ovrednotili rezultate, dobljene na mikromrežah, smo v prvem delu diplomske naloge preverili izražanje treh genov, katerih izražanje je najbolj izstopalo, z metodo RT-PCR. Ugotovili smo, da so signifikantne razlike v izražanju genov ob tretiranju celic Burkittovega limfoma ter celic U937 (za katere se je predhodno izkazalo, da izbrana spojina zanje ni toksična) s spojino **15** ter neselektivnim zaviralcem proteasoma bortezomibom, prisotne le pri genu *atf3*. Zato smo v drugem delu diplomske naloge poskušali ugotoviti, katere signalne poti so vpletene v regulacijo gena, ki ima vlogo v selektivni citotoksičnosti te spojine. Z uporabo zaviralcev signalnih poti smo ugotovili, da je izražanje gena *atf3* v celicah Burkittovega limfoma zmanjšano v primeru uporabe wortmannina, kar nakazuje potencialno vpletenost Akt signalne poti v regulacijo tega gena. Da bi to nedvomno potrdili, bi bilo potrebno opraviti še druge preizkuse, lahko bi na primer preverili, kateri transkripcijski faktorji se vežejo na promotorsko regijo *atf3* gena in z uporabo zaviralca signalnih poti nato preverjali, ali pride do zaviranja katerega od transkripcijskih faktorjev.

Želeli smo tudi preveriti izražanje gena *atf3* v celicah limfoblastoidnih celičnih linij, ki so dober model za iskanje molekul, ki povzročajo različno občutljivost na učinkovine. V ta namen smo opravili test MTS, s pomočjo katerega pa smo ugotovili, da nobena izmed 11-ih uporabljenih LCL celičnih linij ni bila dovzetna za delovanje spojine **15**, zato tudi nismo mogli iskati korelacije med izražanjem *atf3* in občutljivostjo na spojino in nadalje nismo vrednotili izražanja *atf3* gena v LCL-ih.

6 LITERATURA

1. Kumar P, Clark M. Clinical Medicine, 6th Ed. Elsevier Limited, 2009: 483–516.
2. Glaser M. Kronične levkemije. Med razgl 2005; 44: 33–41.
3. Andolšek D. Bolezni krvi in krvotvornih organov. Interna medicina, glavni uredniki: Kocjančič A, Mravlje F, Štajer D. Littera picta, 5. izdaja. Ljubljana 2012: 1231–56.
4. Küppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. Nature reviews. Cancer 2005; 5 (4): 251–62.
5. Molyneux EM, Rochford R, Griffin B, Newton R, Jackson G, Menon G, et al. Burkitt's lymphoma. Lancet 2012; 379 (9822): 1234–44.
6. Blum KA, Lozanski G, Byrd JC. Adult Burkitt leukemia and lymphoma. Blood 2004; 104 (10): 3009–20.
7. Gregory MA, Hann SR. c-Myc Proteolysis by the Ubiquitin-Proteasome Pathway: Stabilization of c-Myc in Burkitt's Lymphoma Cells. Molecular and Cellular Biology 2000; 20 (7): 2423–35.
8. Elmore S. Apoptosis: A review of Programmed Cell Death. Toxic Pathol 2007; 35 (4): 495–516.
9. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. The New England journal of medicine 2009; 361 (16): 1570–83.
10. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. Annals of hematology 2005; 84 (10): 627–39.
11. Renehan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? British Medicinal Journal 2001; 322: 1536–8.
12. Debatin K-M. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. Cancer Immunol Immunother 2004; 53 (3): 153–9.
13. Galluzzi L, Blomgren K, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. Nat rev Neurosci. 2009; 10 (7): 481–94.
14. Murata S, Yashiroda H, Tanaka K. Molecular mechanisms of proteasome assembly. Nature reviews. Molecular cell biology 2009; 10 (2): 104–15.
15. Richardson PG, Mitsiades C, Hideshima T, Anderson KC. Bortezomib: proteasome inhibition as an effective anticancer therapy. Annual review of medicine 2006; 57: 33–47.

16. Kisselev AF, Van der Linden WA, Overkleeft HS. Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target. *Chemistry & biology* 2012; 19 (1): 99–115.
17. Carney BK, Cassimeris L. Stathmin/oncoprotein 18, a microtubule regulatory protein, is required for survival of both normal and cancer cell lines lacking the tumor suppressor, p53. *Cancer Biology & Therapy* 2010; 9 (9): 699–709.
18. Rubin CI, Atweh GF. The role of stathmin in the regulation of the cell cycle. *Journal of cellular biochemistry* 2004; 93 (2) : 242–50.
19. Vlaicu SI, Cudrici C, Ito T, Fosbrink M, Tegla CA, Rus V, et al. Role of response gene to complement 32 in diseases. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis* 2008; 56 (2): 115–22.
20. Vlaicu SI, Tegla C a, Cudrici CD, Danoff J, Madani H, Sugarman A, et al. Role of C5b-9 complement complex and response gene to complement-32 (RGC-32) in cancer. *Immunologic research* 2012; e32.
21. Badea T, Niculescu F, Soane L, Fosbrink M, Sorana H, Rus V, et al. RGC-32 increases p34CDC2 kinase activity and entry of aortic smooth muscle cells into S-phase. *The Journal of biological chemistry* 2002; 277 (1): 502–8.
22. Li F, Luo Z, Huang W, Lu Q, Wilcox CS, Jose P a, et al. Response gene to complement 32, a novel regulator for transforming growth factor-beta-induced smooth muscle differentiation of neural crest cells. *The Journal of biological chemistry* 2007; 282 (14): 10133–7.
23. Kim DS, Lee JY, Lee SM, Choi JE, Cho S, Park JY. Promoter methylation of the RGC32 gene in nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2011; 117 (3): 590–6.
24. Thompson MR, Xu D, Williams BRG. ATF3 transcription factor and its emerging roles in immunity and cancer. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 2009; 87 (11): 1053–60.
25. Yin X, Wolford CC, Chang Y-S, McConoughey SJ, Ramsey SA, Aderem A, et al. ATF3, an adaptive-response gene, enhances TGF{beta} signaling and cancer-initiating cell features in breast cancer cells. *Journal of cell science* 2010; 123 (20): 3558–65.
26. Yin X, Dewille JW, Hai T. A potential dichotomous role of ATF3, an adaptive-response gene, in cancer development. *Oncogene* 2008; 27 (15): 2118–27.

27. Kim MS, In SG, Park OJ, Won CH, Lee MW, Choi JH, et al. Increased expression of activating transcription factor 3 is related to the biologic behavior of cutaneous squamous cell carcinomas. *Human pathology* 2011; 42 (7): 954–9.
28. Pelzer AE, Bektic J, Haag P, Berger AP, Pycha A, Schäfer G, et al. The expression of transcription factor activating transcription factor 3 in the human prostate and its regulation by androgen in prostate cancer. *The Journal of urology* 2006; 175 (4): 1517–22.
29. Janz M, Hummel M, Truss M, Wollert-Wulf B, Mathas S, Jöhrens K, et al. Classical Hodgkin lymphoma is characterized by high constitutive expression of activating transcription factor 3 (ATF3), which promotes viability of Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* 2006; 107 (6): 2536–9.
30. Hagiya K, Yasunaga J-I, Satou Y, Ohshima K, Matsuoka M. ATF3, an HTLV-1 bZip factor binding protein, promotes proliferation of adult T-cell leukemia cells. *Retrovirology* 2011; 8 (1): e19.
31. Bandyopadhyay S, Wang Y, Zhan R, Pai SK, Watabe M, Iizumi M, et al. The tumor metastasis suppressor gene Drg-1 down-regulates the expression of activating transcription factor 3 in prostate cancer. *Cancer research* 2006; 66 (24): 11983–90.
32. Bottone FG, Moon Y, Kim JS, Alston-Mills B, Ishibashi M, Eling TE. The anti-invasive activity of cyclooxygenase inhibitors is regulated by the transcription factor ATF3 (activating transcription factor 3). *Molecular cancer therapeutics* 2005; 4 (5): 693–703.
33. Hackl C, Lang SA, Moser C, Mori A, Fichtner-Feigl S, Hellerbrand C, et al. Activating transcription factor-3 (ATF3) functions as a tumor suppressor in colon cancer and is up-regulated upon heat-shock protein 90 (Hsp90) inhibition. *BMC cancer* 2010; 10 (1): e668.
34. Lu D, Wolfgang CD, Hai T. Activating transcription factor 3, a stress-inducible gene, suppresses Ras-stimulated tumorigenesis. *The Journal of biological chemistry* 2006; 281 (15): 10473–81.
35. Yan C, Lu D, Hai T, Boyd DD. Activating transcription factor 3, a stress sensor, activates p53 by blocking its ubiquitination. *The EMBO journal* 2005; 24 (13): 2425–35.
36. Boyd DD, Yan C. ATF3 Regulates the Stability of p53. *Landes Bioscience* 2006; 5 (9): 926–9.

37. Promega Corporation. http://www.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-assays/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-_mts_/.
Dostop: oktober 2012
38. Gobec M, Obreza A, Prijatelj M, Brus B, Gobec S, Mlinaric-Rascan I. Selective cytotoxicity of amidinopiperidine based compounds towards Burkitt's lymphoma cells involves proteasome inhibition. *PloS one* 2012; 7 (7): e41961.
39. Juvan P, Rozman D. Tehnologija DNA mikromrež in njena uporaba v medicini. *Infor Med Slov* 2006; 11 (1): 2–15.
40. Morag A, Oron-karni V, Rehavi M, Stingl JC, Gurwitz D. Genome-wide expression profiling of human lymphoblastoid cell lines identifies CHL1 as a putative SSRI antidepressant response biomarker. *Pharmacogenomics* 2011; 12 (2): 171–84.