

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**NADJA GRUJIĆ**

**VREDNOTENJE CITOTOKSIČNIH UČINKOV ANTAGONISTA  $\alpha$ -  
ADRENERGIČNIH RECEPTORJEV**

**DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI PROGRAM FARMACIJA**

**Ljubljana, 2013**

Univerza v *Ljubljani*  
Fakulteta *za farmacijo*



**NADJA GRUJIĆ**

**VREDNOTENJE CITOTOKSIČNIH UČINKOV ANTAGONISTA  $\alpha$ -  
ADRENERGIČNIH RECEPTORJEV**

**EVALUATION OF CYTOTOXIC EFFECTS OF  $\alpha$ -ADRENERGIC  
RECEPTOR ANTAGONIST**

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 strokovne nasvete pri opravljanju diplomskega dela in somentorici, asist. dr. Martini Gobec, mag. farm., za praktične nasvete in pomoč pri laboratorijskem delu diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi staršem za finančno in moralno podporo tekom celotnega študija, ostalim domačim, ki so me vedno spodbujali, in sošolcem, s katerimi smo skupaj iskali sprostitev med napornim učenjem. Velika zahvala gre tudi mojemu fantu, ki mi je med opravljanjem praktičnega in pisnega dela diplome ves čas stal ob strani in mi pomagal pri tehnični plati oblikovanja besedila.

### *Izjava*

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

Ljubljana, februar 2013

Nadja Grujić

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

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

<b>POVZETEK .....</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>IV</b>
<b>SEZNAM KRATIC IN OKRAJŠAV .....</b>	<b>V</b>
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 Levkemije .....	1
1.2 Limfomi .....	2
1.2.1 <i>Burkittov limfom</i> .....	2
1.3 Celična smrt .....	5
1.3.1 <i>Celični cikel</i> .....	5
1.3.2 <i>Mehanizmi celične smrti</i> .....	6
1.3.2.1 <i>Apoptoza</i> .....	7
1.3.2.2 <i>Apoptoza in rak</i> .....	10
1.4 NFκB signalizacija.....	11
1.4.1 <i>Mehanizmi aktivacije NFκB</i> .....	12
1.4.2 <i>NFκB in rak</i> .....	13
1.5 Antagonisti na α-adrenergičnih receptorjih .....	14
<b>2 NAMEN DELA .....</b>	<b>16</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE.....</b>	<b>17</b>
3.1 Materiali.....	17
3.1.1 <i>Kemikalije in reagenti</i> .....	17
3.1.2 <i>Kompleti</i> .....	18
3.1.3 <i>Medij za gojenje celic</i> .....	18
3.1.4 <i>Protitelesa</i> .....	18
3.1.5 <i>Pufri in raztopine</i> .....	19
3.1.6 <i>Geli za SDS-PAGE</i> .....	20
3.1.7 <i>Laboratorijska oprema</i> .....	21
3.2 Metode .....	22

3.2.1 Gojenje celičnih kultur.....	22
3.2.2 Test MTS.....	23
3.2.3 Analiza celičnega cikla .....	24
3.2.4 Test barvanja s kombinacijo aneksin V-PE/PI .....	25
3.2.5. Izolacija in merjenje koncentracije proteinov .....	26
3.2.6 Merjenje aktivnosti kaspaz-3/-7 .....	27
3.2.7 Prenos po Westernu .....	28
3.2.8 Statistična analiza .....	30
<b>4 REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>31</b>
4.1 Ireverzibilni $\alpha$ -adrenergični antagonist izkazuje selektivno toksičnost proti celični liniji Burkittovega limfoma .....	31
4.2 Zastoj v S fazi celičnega cikla in povečana smrtnost Ramos celic po inkubaciji z ireverzibilnim $\alpha$ -adrenergičnim antagonistom.....	34
4.3 Ireverzibilni $\alpha$ -adrenergični antagonist inducira od kaspaz odvisno apoptozo.....	35
4.4 Indukcija apoptotične smrti Ramos celic je povezana z modulacijo NF $\kappa$ B signalne poti .....	38
<b>5 SKLEP .....</b>	<b>40</b>
<b>6 LITERATURA.....</b>	<b>43</b>

## POVZETEK

Veliko študij se posveča iskanju novih, bolj učinkovitih protirakavih učinkovin. Obetavne rezultate kažejo modulatorji apoptoze. Tumorske celice so se sposobne preko različnih mehanizmov izogniti procesu apoptoze, kar jim omogoča nenadzorovano rast. Z modulatorji apoptoze, ki delujejo na različne tarče v signalizaciji apoptotičnih poti, pa lahko to preprečimo. V predhodni farmakogenomski študiji so identificirali zdravilno učinkovino, ki je znani ireverzibilni antagonist na  $\alpha$ -adrenergičnih receptorjih (AAR), kot potencialni induktor apoptoze. Z našim raziskovalnim delom smo želeli ovrednotiti apoptotične učinke, ki jih na celični liniji Burkittovega limfoma (Ramos) povzroča izbrana učinkovina. S testom presnovne aktivnosti smo ugotavljali citotoksičnost in ugotovili, da je AAR toksičen za celice Ramos, saj se metabolična aktivnost celic zmanjšuje v odvisnosti od koncentracije učinkovine in je pri koncentraciji 10  $\mu$ M zmanjšana že za polovico v primerjavi s kontrolo. Na drugih vrstah levkemičnih celic (Jurkat, U937) in na zdravih perifernih krvnih mononuklearnih celicah (PBMC) nismo opazili enakega učinka, kar kaže na to, da je AAR selektivno citotoksičen le za celice Ramos. Vzrok za zmanjšano presnovno aktivnost celic Ramos smo ugotavljali z analizo celičnega cikla, ki je pokazala, da se pod vplivom AAR poveča smrtnost celic in da spojina povzroča zastoj rasti v S-fazi cikla. Nadalje smo s testom označevanja z aneksinom V in z merjenjem aktivnosti kaspaz ugotavljali mehanizem celične smrti in ugotovili, da gre za od kaspaz odvisno apoptozo. Inkubacija celic z AAR je močno povečala število apoptotičnih celic in aktivnost kaspaz-3 in -7. Nazadnje smo ugotavljali, preko katerih signalnih poti pride do apoptotičnega učinka. Ker je jedrni faktor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) eden glavnih dejavnikov preživetja v tumorskih celicah, smo z metodo prenosa po Westernu preverili proteine, ki sodelujejo pri njegovi aktivaciji. Ugotovili smo, da AAR povzroči kopičenje fosforilirane oblike I $\kappa$ B, kar bi lahko pomenilo, da je indukcija apoptoze, vsaj delno, posledica zmanjšane aktivacije NF $\kappa$ B. Naše ugotovitve kažejo na morebitno novo indikacijo že znane učinkovine.

## ABSTRACT

A substantial research is dedicated to finding new and more efficient drugs for cancer treatment. A group of active substances called modulators of apoptosis is showing very promising results. Tumor cells are able to avoid the process of apoptosis by changing its mechanisms which enables their uncontrolled growth. On the other hand modulators of apoptosis can prevent this ability. A previous pharmacogenomic-based study identified a known irreversible  $\alpha$ -adrenergic antagonist as a potential apoptosis-inducing substance. In our research we evaluated apoptotic effects of the tested substance on Burkitt's lymphoma cells, Ramos. First, we investigated the cytotoxicity by performing a metabolic activity assay. The test showed that treatment with the tested substance is cytotoxic for Ramos cells. It caused a severe decrease in their metabolic activity in a concentration-dependant manner, at a concentration of 10  $\mu$ M, metabolic activity decreased for 50 %. By performing the same test on other leukaemic cells (Jurkat, U937) and on healthy periferal blood mononuclear cells (PBMC), we found that the tested substance is selectively cytotoxic only for Ramos cells, because the same effect was not noticed on Jurkat, U937 and PBMC. To delineate the molecular basis of decreased metabolic activity of Ramos cells we performed cell cycle analysis which showed increased mortality rate of Ramos cells, and arrest in the S-phase of the cycle. In the next step, we conducted a staining assay with annexin V/propidium iodide, and we measured the activity of caspases-3 and -7 in order to determine the mechanism of death of Ramos cells. Treatment with the tested substance markedly increased the number of apoptotic cells and the activity of caspases-3/-7, indicating that they undergo apoptosis. Furthermore, we tried to elucidate through which signaling pathways apoptosis was induced, and since nuclear factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) is one of the main survival factors in tumor cells, we focused on it's signaling. Western blot analysis of proteins involved in this signaling pathway showed an increased amount of phospho-I $\kappa$ B, indicating that apoptosis may in part occur due to down-regulation of NF $\kappa$ B. Our findings show a potential new indication for this already known drug.

## SEZNAM KRATIC IN OKRAJŠAV

AAR	irevezibilni antagonist na $\alpha$ -adrenergičnih receptorjih
ALL	akutna limfoblastna levkemija
AML	akutna mieloična levkemija
Apaf-1	apoptozni proteazni aktivacijski faktor 1
APS	amonijev persulfat
BCR	B-celični receptor
BFM	bromfenolno modro, indikator
BL	Burkittov limfom
BSA	albumin iz govejega seruma
CDK	od ciklinov odvisna kinaza
CŽS	centralni živčni sistem
DMSO	dimetilsulfoksid
dox	doksazosin
EBV	virus Epstein-Barr
FADD	protein, ki se veže na smrtno domeno FasR
FasR	receptor za Fas ligand
FBS	fetalen goveji serum
GIT	gastrointestinalni trakt
HHV-8	humani herpes virus 8
HTLV-I	humani T-levkemični virus tipa I
IAP	proteini iz družine zaviralcev apoptoze
Ig	imunoglobulin
I $\kappa$ B	proteini iz družine zaviralcev aktivacije NF $\kappa$ B
IKK	I $\kappa$ B-kinaza
IL-6	interlevkin 6
KLL	kronična limfocitna levkemija
KML	kronična mieloična levkemija
MTS	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol



NFκB	jedrni faktor κB, transkripcijski faktor
NHL	Nehodgkinov limfom
NIK	NFκB inducirajoča kinaza
NK	celice naravne ubijalke
PI	propidijev jodid
PI3K	fosfatidilinozitol-3-kinaza
PMSF	fenilmetilsulfonilfluorid
SDS	natrijev dodecilsulfat
SLB	nanašalni pufer
TAD	transaktivacijska domena
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
TNFα	dejavnik tumorske nekroze α
TRADD	protein, ki se veže na smrtno domeno receptorja za TNFα

# 1 UVOD

## 1.1 Levkemije

Burkittov limfom sodi med maligne bolezni krvnih celic bele vrste. Slednje vključujejo poleg limfomov tudi levkemije.

Levkemije so redke rakaste novotvorbe krvotvornega tkiva, za katere je značilno kopičenje enega kлона nenormalnih in nefunkcionalnih belih krvnih celic v kostnem mozgu in krvi. Glede na vrsto celic levkemije delimo na limfocitne in mieloične, glede na razvojno stopnjo celic in potek bolezni pa na akutne ali hitro potekajoče in kronične ali dolgotrajne (1).

Akutne levkemije predstavljajo 10 % vseh rakavih bolezni pri ljudeh in so najpogostejše maligno obolenje pri otrocih. Nastanejo zaradi mutacije nezrele, multipotentne celice. Ločimo akutno mieloično levkemijo (AML) in akutno limfoblastno levkemijo (ALL), ki pa je lahko B-celična ali T-celična. Večina ALL je B-celičnih. Za vse podvrste akutnih levkemij so značilne citogenetske nepravilnosti, predvsem recipročne kromosomske translokacije. Te povzročijo nastanek novih, fuzijskih genov in tvorbo fuzijskih proteinov. Ena najbolj znanih mutacij je kromosom Philadelphia, kjer pride do recipročne translokacije delov kromosomov 9 in 22. Tak kromosom kodira fuzijski protein Bcr-Abl. Slednji s svojo tirozin-kinazno aktivnostjo poveča proliferacijo celic in zavira apoptozo. Med dejavnike tveganja za nastanek bolezni štejemo tudi sevanje, kancerogene spojine (npr. benzen, citostatična zdravila), okužbe z virusi (npr. človeški T-levkemični virus tipa I, HTLV-I) in ostale kromosomske nepravilnosti (npr. Downov sindrom). Celični označevalci, s pomočjo katerih določimo podtip akutne levkemije, so CD13 in CD33 za AML, CD19, CD22, CD79a in CD10 za B-ALL ter CD3 in CD7 za T-ALL (2).

Kronične levkemije se, za razliko od akutnih, pojavljajo predvsem pri odraslih po 50. letu. Pogosteje obolevajo moški. Mutacija nastane v celici z določeno stopnjo zrelosti. Bolezen poteka kronično oz. dolgotrajno. Podobno kot pri akutnih levkemijah, tudi te razdelimo na kronično mieloično levkemijo (KML) in kronično limfocitno levkemijo (KLL). Več kot 95 % KLL je B-celičnih. Levkemične celice KLL izražajo na svoji površini celične označevalce CD5, CD19, CD20 in CD23, medtem ko je površinski IgM

slabo izražen. Najpogostejša kromosomska sprememba je delecija 13q14.3. Pri bolnikih s KML najpogosteje najdemo kromosom Philadelphia, na podlagi katerega sloni tudi diagnoza (1,2).

## 1.2 Limfomi

Maligni limfomi so novotvorbe zrelih celic B, T in naravnih celic ubijalk (NK). Nastanejo zaradi trajnega in samostojnega razraščanja celic limfatičnega tkiva. Maligno celico primerjamo glede na morfološke in imunološke značilnosti celične membrane in citoplazme s posamezno stopnjo v normalnem razvoju celic limfatične vrste in jo po njej tudi imenujemo. Večino limfomov predstavljajo novotvorbe zrelih B-limfocitov. V grobem limfome delimo v dve skupini: Hodgkinov limfom in Nehodgkinovi limfomi (NHL).

Hodgkinov limfom je maligna novotvorba limfatičnega tkiva s progresivnim potekom in je v 98 % primerov B-limfocitnega izvora. Spoznamo ga po značilnih Reed-Sternbergovih celicah velikankah z dvema ali več jedri ter Hodgkinovih celicah z enim jedrom. Te celice so CD30<sup>+</sup> in CD15<sup>+</sup>.

Nehodgkinovi limfomi so heterogena skupina malignih tumorjev. 88 % NHL je B-limfocitnega izvora, preostalih 12 % tumorjev pa izvira iz limfocitov T in NK. Pojav bolezni pogosto sovпада z virusno ali bakterijsko okužbo. Tako je za endemični tip Burkittovega limfoma značilna okužba z Epstein-Barr virusom (EBV), za primarni limfom velikih celic B okužba s humanih herpes virusom 8 (HHV-8), za T-celični limfom okužba s HTLV-I, za MALT (z mukozo povezano limfatično tkivo) limfom želodca okužba s *Helicobacter pylori* itd. Podobno kot pri bolnikih z levkemijo, tudi pri bolnikih z NHL najdemo številne kromosomske nepravilnosti. Le-te določajo potek bolezni, omogočajo diferencialno diagnostično prepoznavo posameznih podvrst limfomov in vplivajo na uspešnost zdravljenja. Najpogostejše so translokacije med različnimi kromosomi (2).

### 1.2.1 Burkittov limfom

Burkittov limfom (BL) je bil prvič opisan leta 1958 s strani kirurga Dennisa Burkitta, ki je bolezen odkril med svojim delom v centralni Afriki pri otrocih, ki so imeli zelo izmaličene obraze ali velike novotvorbe v trebuhu. Kasneje je bolezen po svojem odkritelju dobila tudi ime (3). Danes jo uvrščamo v skupino NHL in velja za enega najbolj agresivnih limfomov zrelih limfocitnih B-celic. Če ga ne zdravimo, lahko bolnik umre v roku šestih mesecev (5). Poznamo tri klinične različice: endemični in sporadični BL ter

BL, povezan s pomanjkljivim imunskim odzivom. Razlikujejo se v klinični sliki in geografskem področju pojavljanja bolezni. Tako se endemični tip pojavlja predvsem na področjih ekvatorialne Afrike, kjer so pogoste tudi okužbe z malarijo, pri otrocih, starih med 4 in 7 let, sporadični tip pa v Zahodni Evropi in ZDA tako pri otrocih kot tudi pri odraslih (1-2 % odraslih bolnikov z limfomom ima sporadično različico BL). Endemični tip prizadene čeljusti in druge kosti obraza, lahko tudi ledvici in GIT, medtem ko se sporadični tip kaže predvsem s tumorskimi masami v trebuhu. Imunopomanjkljivi tip opazamo pri odraslih bolnikih, okuženih z virusom HIV, v manjši meri pa tudi pri bolnikih, ki so doživeli transplantacijo. Klinična slika je takšna kot pri sporadičnemu tipu. Če se bolezen razširi v kostni mozeg ali CŽS, to predstavlja slab prognostični znak za bolnika in slabši izid terapije (3,4).

Glavna značilnost bolezni in najverjetneje tudi vzrok za nastanek, ker jo najdemo pri vseh treh tipih BL, je deregulacija onkogene *c-myc*. Ta je posledica t.i. »Burkittove translokacije« med genom *c-myc* in genom za težko IgH ali katerokoli od lahkih verig IgL (5). V 80 % primerov najdemo translokacijo t(8;14)(q24;q32), kjer se gen *c-myc* prestavi iz kromosoma 8 na mesto kromosoma 14, kjer se nahaja gen za IgH, v ostalih 20 % pa t(2;8)(q12;q24) ali t(8;22)(q24;q11), kjer se *c-myc* prestavi zraven gena za bodisi  $\kappa$  bodisi  $\lambda$  lahko verigo Ig. Ker je za zrele limfocite B značilna povečana transkripcija genov za težke in lahke verige Ig, se zaradi omenjenih translokacij poveča tudi transkripcija gena *c-myc*, to pa povzroči celo vrsto sprememb v celici, saj protein c-Myc vpliva na številne procese, kot so regulacija celičnega cikla, celična rast, apoptoza, celična adhezija, diferenciacija, metabolizem itd. Mutirane celice se začnejo pospešeno razmnoževati, hkrati pa ne umirajo, saj se zavre proces apoptoze (3,4,5). Povečana ekspresija c-Myc pri bolnikih z BL bi lahko bila tudi posledica mutacije na aminokislinskem ostanku treonina na mestu 58, s čimer bi se zmanjšala razgradnja c-Myc preko proteasoma (4). V številnih študijah so ugotovili, da so »Burkittovi translokaciji« pogosto pridružene še druge mutacije, ki vplivajo na povečano celično rast. Ena najpogostejših je inaktivacija tumor supresorskega gena *p53*, zaradi katere je proces apoptoze, ki ga posreduje *p53*, zavrt in celice ne dobivajo notranjih in zunanjih signalov za smrt (5). V eni od novejših študij pa so s poskusi na miškah, pri katerih sta bili hkrati povečani ekspresija c-Myc in aktivnost PI3K (fosfoinozimid-3-kinaza), opazili nastanek tumorjev, ki so po histoloških, genetskih in imunofenotipskih značilnostih povsem ustrezali človeškemu BL (6). BL povezujejo tudi z okužbo z virusom EBV. Skoraj vsi bolniki z endemičnim tipom in 15-30 % bolnikov s sporadičnim tipom

bolezni je EBV<sup>+</sup> (3). Samo okužba z EBV ni dovolj za nastanek bolezni, lahko pa k temu močno prispeva in to na različne načine. Večino zgoraj omenjenih genov regulirajo signali iz B-celičnega receptorja (BCR). EBV lahko prispeva k limfomagenezi tako da, ali predstavlja kronični antigenski stimulus ali oponaša signalizacijo BCR ali direktno inducira poliklonsko hiperaktivacijo limfocitov B (7,8).

Glede na morfologijo celice BL delimo na klasični tip - enakomerno srednje velikosti, z okroglimi jedri in več manjšimi bazofilnimi jedrci in na »Burkitt-like« tip - imajo manjše število bolj vidnih jedrc in izkazujejo večji jedrni pleomorfizem. Značilen je vzorec »zvezdnatega neba«. Pojavi se kot posledica številnih dendritičnih celic, ki se vrinejo med tumorske celice in fagocitirajo apoptotične ostanke. Ne glede na morfološki tip, vse celice BL izražajo površinske IgM, Bcl-6 in celične označevalce CD19, CD20, CD22, CD10 in CD79a, ne pa tudi CD5, CD23 in TdT (terminalna deoksinukleotidil-transferaza) (3,4).

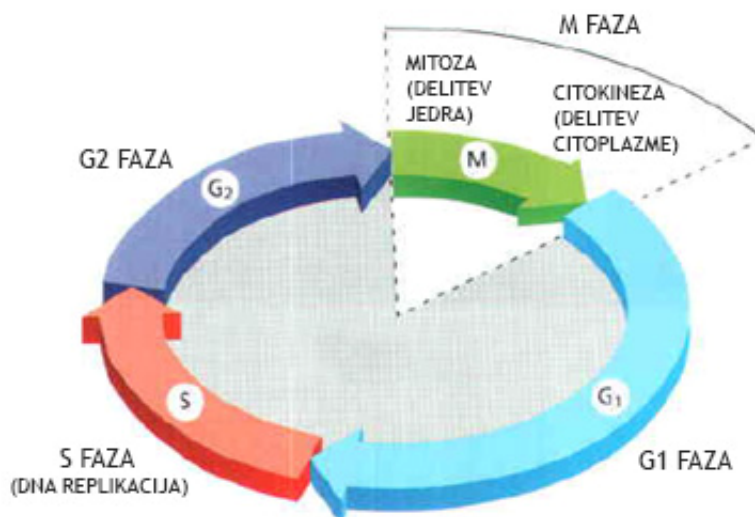
Današnja terapija BL zajema kratke, visokointenzivne cikle kemoterapije z različnimi kombinacijami citostatikov. Pogosto se hkrati izvaja tudi intratekalna kemoterapija za zaščito CŽS. Eden učinkovitejših režimov zdravljenja je CODOX-M/IVAC, ki kombinira cikle ciklofosfamida, doksorubicina in metotreksata s ciklom ifosfamida, vinkristina, etopozida in citarabina. S takšnim režimom so se uresničili cilji izboljšanja možnosti preživetja ter omejili toksični učinki citostatičnih zdravil, čeprav si želimo le-te še zmanjšati. Večina bolnikov se na omenjeno terapijo dobro odziva, problemi pa se pojavljajo pri bolnikih s slabšo prognozo in ponovitvijo bolezni. Prognostični faktorji še niso povsem razjasnjeni. V študijah so omenjeni visoka starost, poznejši stadiji bolezni, razširitev v kostni mozeg ali CŽS, anemija, prisotnost blastov v krvnem obtoku. Zanesljivo slab prognostični znak pa je nezmožnost dosega remisije. Eno novejših zdravil, ki bi lahko izboljšalo stanje tudi takšnih bolnikov, je rituksimab. To je monoklonsko protitelo, usmerjeno proti celičnemu označevalcu CD20. Še eno možnost predstavlja transplantacija zarodnih celic (4). Sicer pa večina poznanih citostatikov deluje tako, da v tumorskih celicah sproži apoptotični proces, kar vodi v celično smrt.

### 1.3 Celična smrt

V človeškem telesu celice konstantno umirajo bodisi zaradi nepopravljivih poškodb genetskega materiala ali zunanjih signalov, ki povzročijo vklop strogo reguliranega programa celične smrti, bodisi zaradi ishemičnih ali mehanskih poškodb tkiva. Da se število celic povrne nazaj v začetno stanje, organizem odmrle celice nadomesti z novimi. Tako sta celična delitev in celična smrt nujna in dopolnjujoča se procesa, ki skrbita za homeostazo tkiv. Kakršnokoli porušenje tega ravnotežja, vodi v nastanek bolezni.

#### 1.3.1 Celični cikel

Celična delitev poteka skozi zaporedje dogodkov, imenovanih celični cikel. Glavni namen celičnega cikla je prenos genske informacije na naslednje generacije celic. Celični cikel delimo v štiri faze:  $G_1$ , S,  $G_2$  in M fazo (slika 1).



Slika 1: Shematski prikaz faz celičnega cikla (povzeto po 9).

S in M faza sta glavni fazi cikla, saj takrat potekajo bistveni dogodki za delitev celic. To so podvajanje DNA v S fazi (S, sinteza) in segregacija kromosomov ter razdelitev celice v M fazi (M, mitoz). Fazi  $G_1$  in  $G_2$  predstavljata razmika med glavnima fazama in omogočata razvoj celice do take stopnje, da lahko vstopi v naslednjo fazo. Celica mora namreč dovolj zrasti in podvojiti tudi organele ter proteine, kar pa običajno zahteva več časa kot samo podvajanje kromosomov in mitoz. V fazi  $G_1$  so izredno pomembni tudi zunanji signali. V primeru, da pogoji okolja niso ugodni, se celični cikel na tej stopnji povsem ustavi in celica vstopi v t.i.  $G_0$  fazo oz. fazo mirovanja. V nasprotnem primeru se cikel nadaljuje v S fazo. Za pravilen potek procesa skrbi kontrolni sistem celičnega cikla, ki ga predstavljajo številni regulatorni proteini. Najpomembnejši med njimi so od ciklinov odvisne kinaze (CDK - cyclin-dependant kinases) in ciklini, ki skupaj tvorijo ciklin-CDK komplekse. CDK s svojo kinazno aktivnostjo fosforilirajo znotrajcelične proteine in na ta način sprožijo in nadzirajo glavne dogodke celičnega cikla. Za svojo aktivnost potrebujejo cikline, popolnoma aktivni pa postanejo z dodatno vezavo CDK-aktivirajoče kinaze (CAK). Funkcija ciklin-CDK kompleksov je regulirana preko vezave CDK zaviralnih molekul p27, p21 in p16. Komplekse zavira tudi protein-kinaza Wee1 s fosforilacijo aktivnega mesta CDK, obratno pa jih fosfataza Cdc25 aktivira. V nadzor so vpleteni še mnogi drugi proteini, npr. ubikvitin-ligaze, ki povzročajo razgradnjo ciklinov, pa tudi spremembe v transkripciji genov, ki kodirajo našete beljakovine (9).

### *1.3.2 Mehanizmi celične smrti*

Ločimo več tipov celične smrti: apoptozo, nekrozo ter avtofagijo oz. z avtofagijo povezano celično smrt. Apoptoza je programirana celična smrt, kar pomeni, da poteka pod strogim genetskim nadzorom takrat, kadar je to potrebno. Ima torej pomembno fiziološko vlogo, medtem ko nekroza poteka naključno, brez nadzora in je največkrat posledica poškodbe tkiva. Avtofagija je proces, v katerem stradajoča celica razgrajuje svoje organele in makromolekule z namenom pridobivanja energije in metabolitov za preživetje. Dolgoročno pomanjkanje hranil privede celico do tega, da fagocitira samo sebe (10).

Skladno s temo diplomske naloge bomo večjo pozornost namenili mehanizmu apoptoze.

### *1.3.2.1 Apoptoza*

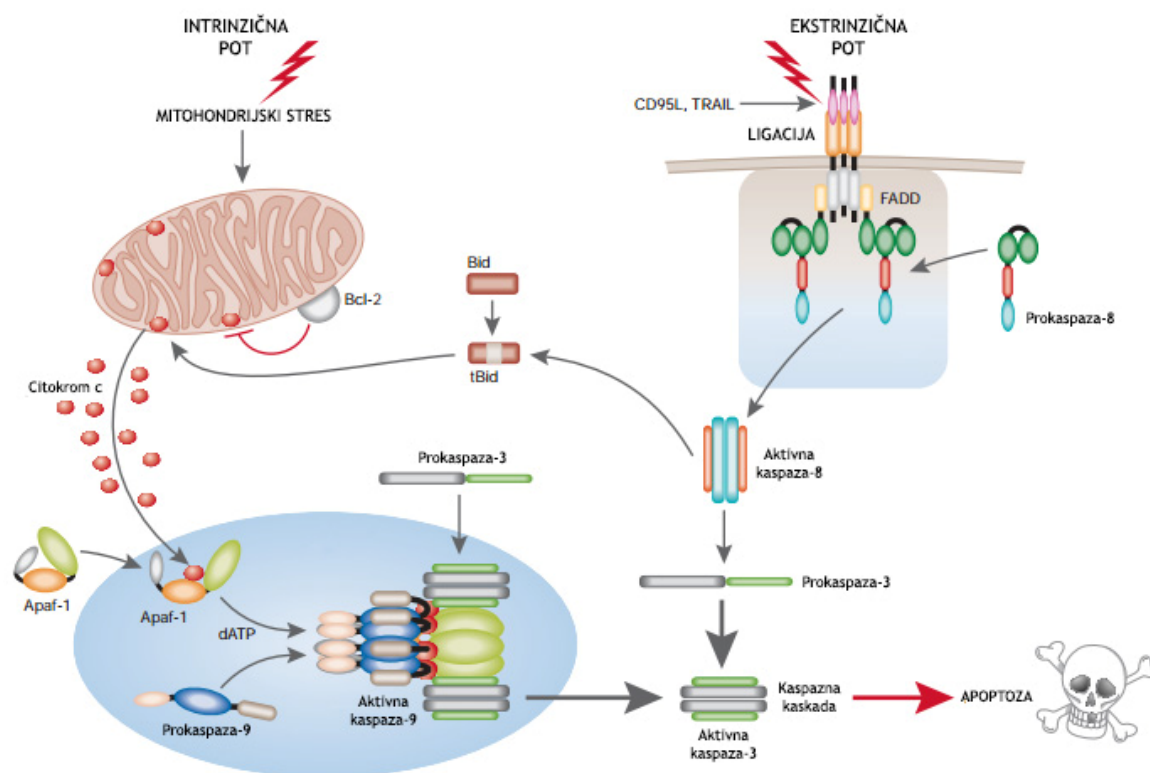
Apoptoza je ena od oblik programirane celične smrti. Celice imajo v svojem genomu zapisan program, ki se ob določenih dražljajih vklopi in vodi v njihovo smrt. Na ta način se organizem znebi odvečnih in potencialno ogrožujočih celic. Ugotovili so, da ima apoptoza številne fiziološke vloge, saj se preko nje odstranjujejo odvečne celice tekom fetalnega razvoja in staranja organizma, celice, ki so okužene z virusi, celice, ki jih poškodujejo toksične snovi iz okolja ipd. (11). Apoptotične celice so prvič prepoznali po njihovi specifični morfologiji. V procesu apoptoze je celica podvržena številnim morfološkim spremembam, kot so skrčenje celice, kondenzacija kromatina, fragmentacija DNA in brstenje membrane, ki lahko rezultira v odcepitvi posamičnih delov citoplazme, obdanih s celično membrano. Delce po odcepitvi imenujemo apoptotična telesa. Celična membrana med apoptozo sicer doživi določene spremembe, vendar pa tekom celotnega procesa ohrani svojo integriteto. Najpomembnejša sprememba celične membrane je izpostavitve negativno nabitega fosfolipida, fosfatidilserina, na celični površini. Ta se sicer nahaja na notranji strani lipidnega dvosloja, ki obdaja celico, v procesu apoptoze pa se prestavi na zunanjo stran zunanjšega sloja. Izpostavljen fosfatidilserin postane celični označevalec, preko katerega okoliški makrofagi in dendritične celice prepoznajo apoptotično celico in jo fagocitirajo. Tu se pokaže pomen eksternalizacije fosfatidilserina, saj hitra fagocitoza umirajočih celic prepreči vnetni odgovor in poškodbo okoliških celic (9-13). Če na tem mestu primerjamo apoptozo in nekrozo, opazimo bistvene razlike med procesoma. Pri nekrozi celična membrana že zgodaj v procesu izgubi svojo integriteto, kar omogoči prodiranje elektrolitov in tekočine iz okolice v celico. Taka celica začne nabrekati, dokler v končni fazi ne počne in razlije svoje vsebine med okoliško tkivo. Temu sledi močan vnetni odziv, poškodovane pa so tudi sosednje celice. Bistvena prednost apoptoze je torej ta, da celico uniči na način, ki minimalno poškoduje sosednje celice (13).

Ključno vlogo v procesu apoptoze igrajo kaspaze (cistein aspartil-specifične proteaze). To so encimi, ki imajo v svojem aktivnem mestu cistein in specifično prepoznajo tetrapeptidno aminokislinsko zaporedje z aspartatom na zadnjem mestu. Za tem mestom razcepijo peptidno verigo. V celici se nahajajo v neaktivni prokaspazni obliki. Aktivirajo jih različni zunanji in notranji dražljaji, aktivirane kaspaze pa nato zaženejo apoptotični proces in cepijo številne celične beljakovine, ki povzročijo zgoraj naštetih morfološke



spremembe. V sesalskih celicah so odkrili že 14 različnih kaspaz. Apoptotske kaspaze razdelimo v dve skupini: aktivatorske ali iniciatorske kaspaze (kaspaze 2, 8, 9, 10) ter efektorske ali eksekutorske kaspaze (kaspaze 3, 6, 7). Niso pa vse kaspaze udeležene v procesu apoptoze. Kaspaze 1, 4, 5, 11 in 13 sodelujejo pri vnetnih in imunskih reakcijah, zato jih imenujemo vnetne kaspaze (14).

Dve glavni signalni poti, preko katerih se sproži apoptotična celična smrt, sta ekstrinzična in intrinzična pot (slika 2). Ekstrinzična pot je povezana z vezavo ligandov na receptorje smrti, kot sta receptor za Fas (FasR) in receptor za faktor tumorske nekroze (TNF-R1). To sta transmembranska receptorja, ki imata na citoplazemskem delu t.i. smrtno domeno. Po vezavi liganda, se na smrtno domeno receptorja veže adapterska beljakovina FADD (ang. Fas-associated death domain protein) ali TRADD (ang. TNF receptor-associated death domain protein), na njo pa prokaspaza-8, ki se znotraj nastalega kompleksa aktivira. Endogeni zaviralec ekstrinzične poti je protein c-FLIP, ki inaktivira FADD in kaspazo-8. Intrinzično pot izzovejo številni dražljaji, kot so pomanjkanje rastnih dejavnikov, hormonov in citokinov, sevanje, virusne infekcije ter škodljive kemikalije (tudi citotoksična zdravila). Dražljaji povzročijo spremembe v mitohondrijih. Poveča se prepustnost mitohondrijske membrane, zaradi česar se iz medmembranskega prostora sprostijo številne molekule, med njimi tudi citokrom c. Slednji se ob prisotnosti dATP veže na Apaf-1 (apoptotični proteaze-aktivirajoči faktor 1) in prokaspazo-9. Podobno kot pri ekstrinzični poti, udeleženi proteini tvorijo kompleks, znotraj katerega se aktivira kaspaza-9 (12,15).



**Slika 2: Ekstrinzična in intrinzična signalna pot apoptoze.** Z vezavo liganda na receptor smrti se začne ekstrinzična pot apoptoze. Smrtna domena receptorja, adapterska beljakovina in prokaspaza-8 se povežejo v kompleks, kar vodi v aktivacijo kaspaze-8. Intrinzična pot apoptoze se začne pod vplivom raznih dejavnikov, ki vplivajo na prepustnost mitohondrijske membrane. Iz medmembranskega prostora se sprosti citokrom c, ki se poveže z dATP, Apaf-1 in prokaspazo-9 v kompleks, znotraj katerega se aktivira kaspaza-9 (povzeto po 15). Apaf-1, apoptotični proteaze-aktivirajoči faktor 1.

Intrinzična pot je strogo regulirana s strani Bcl-2 družine proteinov. Ta regulacija zagotavlja, da se proces apoptoze sproži le takrat, ko je to res potrebno. Proteini iz družine Bcl-2 nadzirajo intrinzično signalno pot preko regulacije sproščanja citokroma c (in drugih medmembranskih mitohondrijskih proteinov). Bcl-2 proteini se delijo na proapoptotične, ki povečajo sproščanje citokroma c v citosol (Bax, Bak, Puma Noxa,...), in antiapoptotične, ki njegovo sproščanje zavirajo (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>,...). Ravnovesje med obema skupinama določa, ali bo celica preživela ali ne (9).

Omenjeni proteini regulirajo intrinzično pot apoptoze pred tvorbo kompleksa, v katerem se aktivira kaspaza-9. Od tu dalje pa regulacijo prevzame družina proteinov, imenovanih zaviralci apoptoze (IAP), za katere domnevajo, da prenašajo ubikvitin na kaspaze ter jih tako označijo za razgradnjo preko proteasoma (17).

Aktivacija kaspaz je kaskadna reakcija. Aktivirane iniciatorske kaspaze (kaspaza-8 in -9), aktivirajo efektorske kaspaze (kaspaza-3), te pa nato cepijo številne kaspazne substrate. Od aktivacije kaspaze-3 naprej govorimo o skupni ali »usmrtilveni« fazi apoptoze. Po nekaterih podatkih naj bi bilo več kot 400 kaspaznih substratov (15), od katerih so najpomembnejši: zaviralec kaspazno-aktivirane DNaze, fodrin, gelsolin, lamina A in B, poli(ADP-riboza) polimeraza in drugi. To so beljakovine citoskeleta in jedrnega matriksa, zaviralci endonukleaz, beljakovine, ki sodelujejo pri signalizaciji itd. Cepitev teh substratov v končni fazi povzroči vse zgoraj navedene morfološke spremembe in odstranitev apoptotičnih celic oz. teles s fagocitozo (12,14). Največji pomen med efekorskimi kaspazami pripisujejo kaspazi-3. S poskusi na celicah, ki so jim odstranili posamezne kaspaze, so ugotovili, da kaspaza-3 cepi veliko večino kaspaznih substratov in ima esencialno vlogo v normalnem poteku apoptoze. Odsotnost kaspaz-6 ali -7 ni imela tako izraženega vpliva na preiskovane parametre (16).

### *1.3.2.2 Apoptoza in rak*

Nenormalen potek procesa apoptoze lahko vodi v nastanek številnih bolezni. Prekomerna apoptoza je povezana z nevrodegenerativnimi boleznimi, nezadostna apoptoza pa z avtoimunimi in rakavimi boleznimi. Veliko pozornosti se posveča vlogi apoptoze v nastanku raka. Ugotovili so, da je zmanjšan obseg apoptoze pri rakavih bolnikih posledica porušenega ravnotežja med proapoptotičnimi in antiapoptotičnimi proteini. Mutacije, ki povzročijo inaktivacijo proapoptotičnih genov in povečano izražanje ali aktivnost antiapoptotičnih proteinov, omogočijo, da proces apoptoze v spremenjenih celicah ne poteče. Najbolj pogosta mutacija, ki dokazano vodi v nastanek raka, je inaktivacija tumor supresorskega gena *p53*. Najdemo jo kar pri polovici človeških tumorjev. *p53* uravnava veliko število genov, ki so udeleženi pri zastoju celičnega cikla in indukciji apoptoze. Spremembe v tem genu izničijo njegovo zaščitno vlogo in dajejo mutiranim celicam prosto pot za nenadzorovano deljenje. Pogosta sprememba je tudi prekomerno izražanje antiapoptotičnih proteinov iz družine Bcl-2. Povišano raven Bcl-X<sub>L</sub> so odkrili pri bolnikih s KML in multiplim mielomom. Našli so tudi mutacije v genu *Fas* (11). Te mutacije vključujejo zmanjšano izražanje FasR na površini celic ali izražanje nefunkcionalnega FasR (12). Z natančnejšim poznavanjem biokemičnih mehanizmov in molekularnih osnov uravnavanja apoptoze se razvija tudi nov terapevtski pristop k zdravljenju raka. Tega predstavlja skupina učinkovin, imenovanih modulatorji apoptoze. Razvijajo se zaviralci

kaspaz, zaviralci IAP, zaviralci antiapoptotičnih Bcl-2 proteinov ter zaviralci proteaz. Poleg zaviralcev imajo na tem področju velik pomen tudi tehnike utišanja genov z majhnimi ovirajočimi RNA (siRNA - small interfering RNA) in nasprotnosmiselnimi oligonukleotidi (23).

#### 1.4 NF $\kappa$ B signalizacija

K akumulaciji prevelikega števila celic pri rakavih obolenjih prispevata dva mehanizma. Po eni strani k temu prispeva zmanjšan obseg apoptoze, po drugi strani pa povečan obseg celične delitve. Za povečano proliferacijo celic so ključni dejavniki preživetja, med katere spada NF $\kappa$ B. NF $\kappa$ B je jedrni transkripcijski faktor, ki posreduje stimulatorne signale za razvoj, proliferacijo, aktivacijo in preživetje limfocitov. Kot transkripcijski faktor, pod vplivom številnih dražljajev, inducira transkripcijo genov. Med njegove tarčne gene sodijo regulatorji celičnega cikla (geni za cikline in c-Myc), antiapoptotični faktorji (geni za Bcl-X<sub>L</sub> in IAP), imunoregulatorni geni, ki kodirajo citokine, itd. (18). Biološki sistem, v katerem NF $\kappa$ B igra najpomembnejšo vlogo, je imunski sistem, zato ga nekateri raziskovalci postavljajo v ospredje pri adaptaciji organizma na spremembe v okolju. Udeležen pa je tudi pri razvoju in normalnem delovanju številnih tkiv, kot so kosti, koža, mlečne žleze in CZS (19).

V sesalskih celicah je prisotnih pet članov družine NF $\kappa$ B transkripcijskih faktorjev: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF $\kappa$ B1 (p50/p105) in NF $\kappa$ B2 (p52/p100). Pripadnost tej družini določa aminokislinsko zaporedje, ki ga najdemo pri vseh članih in se imenuje REL področje. V tem področju se nahajajo domene za dimerizacijo, jedrno lokalizacijo in vezavo na DNA. RelA, RelB in c-Rel imajo na C-koncu peptidnega zaporedja transaktivacijsko domeno (TAD), ki sproži transkripcijo tarčnih genov, ko je NF $\kappa$ B vezan na DNA. NF $\kappa$ B1 in NF $\kappa$ B2 te domene nimata, se pa za razliko od drugih v celici nahajata v prekursorski obliki, saj se mora p105 oz. p100 del proteina najprej procesirati, da se sprostita aktivna faktorja p50 oz. p52. Značilnost NF $\kappa$ B transkripcijskih faktorjev je, da tvorijo homodimere in heterodimere. p50 in p52 običajno tvorita heterodimere z enim od treh predstavnikov, ki posedujejo TAD.

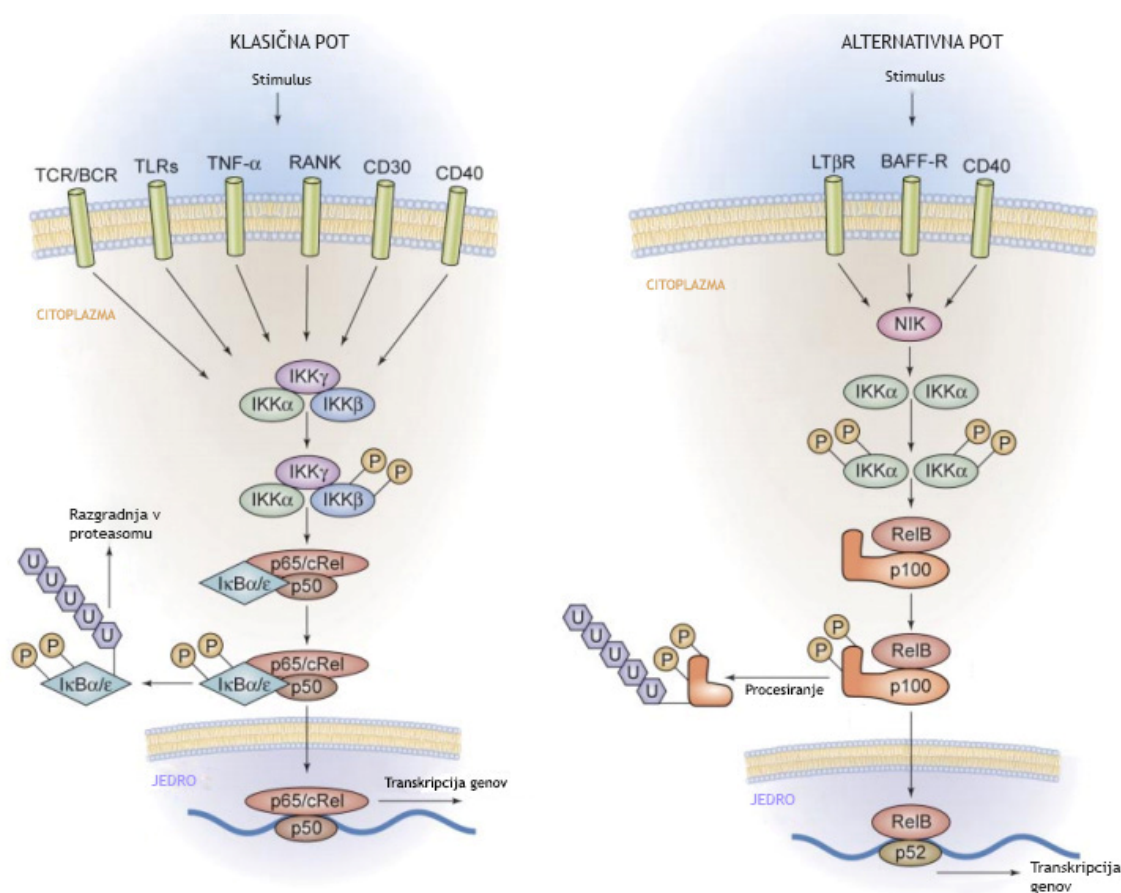
Aktivnost NF $\kappa$ B regulirajo zaviralni proteini I $\kappa$ B, kamor štejemo I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$  in Bcl-3. Sem spadata tudi prekursorja NF $\kappa$ B1 in NF $\kappa$ B2, p105 in p100. Družino I $\kappa$ B zaznamuje 6 do 7 ankirinskih ponovitev, preko katerih se vežejo na NF $\kappa$ B dimere in jih neaktivne zadržujejo v citoplazmi celic. I $\kappa$ B $\alpha$  in I $\kappa$ B $\epsilon$  sta sposobna tudi odstraniti NF $\kappa$ B iz

vezavnih mest na DNA in ga transportirati nazaj v citoplazmo. Ker NF $\kappa$ B sam regulira izražanje I $\kappa$ B, se preko negativne povratne zanke, kmalu po dosegu svojih učinkov, odstrani iz jedra. V normalnih razmerah so torej učinki NF $\kappa$ B prehodni. Da pa sploh postane aktiven, skrbijo I $\kappa$ B-kinaze (IKK), ki sprožijo razgradnjo I $\kappa$ B. Ta razgradnja omogoči, da se sprostijo prosti NF $\kappa$ B dimeri, ki se nato translocirajo v jedro. IKK kompleks sestavljata dve katalitični podenoti IKK $\alpha$  in IKK $\beta$  ter regulatorna podenota IKK $\gamma$ , ki jo imenujemo tudi NEMO (NF $\kappa$ B esencialni modulator) (20).

#### *1.4.1 Mehanizmi aktivacije NF $\kappa$ B*

Ločimo dve signalni poti, preko katerih se aktivira NF $\kappa$ B (slika 3). Klasično pot sprožijo številni dražljaji, od citokinov, virusov, bakterij in patogenov do signalov, ki jih posredujejo T- in B-celični receptorji ter limfocitni koreceptorji CD40 in CD30. Ti dražljaji aktivirajo IKK kompleks, ki nato fosforilira I $\kappa$ B. IKK kompleks je sestavljen iz IKK $\alpha$ ,  $\beta$  in  $\gamma$ , pri čemer ima glavno vlogo za fosforilacijo IKK $\beta$ . Fosforiliran I $\kappa$ B se nadalje ubikvitinilira in razgradi preko proteasoma. Prosti NF $\kappa$ B dimeri se translocirajo iz citoplazme v jedro, kjer aktivirajo transkripcijo tarčnih genov. Alternativno pot pa sprožajo specifični dražljaji, ki se prenašajo preko limfotoksin- $\beta$  receptorja, receptorja za B-celice aktivirajoči dejavnik (BAFF-R) in CD40. Dražljaji aktivirajo NF $\kappa$ B inducirajočo kinazo (NIK), ta pa aktivira IKK kompleks. V alternativni poti je IKK kompleks homodimer IKK $\alpha$ , brez regulatorne podenote. IKK $\alpha$  fosforilira p100, ki se po ubikvitinilaciji razgradi. Sprosti se p52, ki je največkrat vezan v heterodimer z RelB. Enako kot prej, sproščen dimer potuje v jedro, kjer učinkuje (18,20).

Klasična signalna pot je odgovorna za kontrolo prirojene imunosti in vnetja. Alternativni signalni poti pa pripisujejo ključno vlogo v kontroli razvoja, organizacije in funkcije sekundarnih limfatičnih organov ter v promociji zorenja in preživetja limfocitov B (21).



**Slika 3: Aktivacija NFκB preko klasične in alternativne poti.** Različni dražljaji aktivirajo eno ali drugo aktivacijsko signalno pot. Signali iz receptorjev delujejo na IKK kompleks, direktno ali posredno preko NIK. Aktiviran IKK fosforilira IκB oz. p100, ki se po nadaljnjem procesiranju (ubikvitinilacija) razgradi. To sprosti proste NFκB dimere iz prej neaktivnega kompleksa. NFκB se translocira v jedro, kjer sproži transkripcijo tarčnih genov (povzeto po 18). NIK, NFκB inducirajoča kinaza.

#### 1.4.2 NFκB in rak

V zdravih celicah je aktivacija NFκB inducibilna in prehodna. V tumorskih celicah pa se pogosto prehodni učinek izgubi, ker NFκB postane konstitutivno aktiviran. To se zgodi, če se okvari regulatorni sistem aktivacije. Vzroki za okvare se skrivajo v spremembah signalnih poti, mutacijah in kromosomskih preureditvah. Posledično to pomeni tudi deregulirano izražanje vseh tarčnih genov in lahko vodi v nastanek in/ali progresijo raka (22). Zaradi vpletenosti NFκB v uravnavanje proliferacije, diferenciacije in preživetja limfocitov, njegova povečana aktivnost prispeva k onkogenezi številnih limfomov (20).

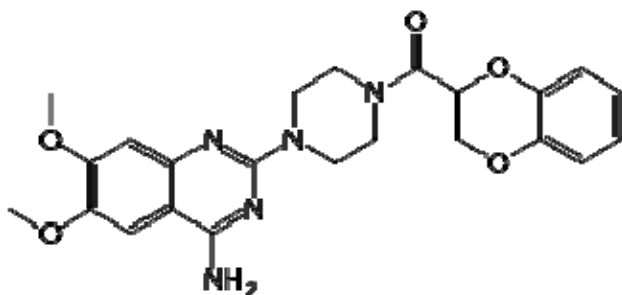
Ugotovili so, da igra spremenjena aktivacija NFκB pomembno vlogo v vseh korakih nastajanja raka kot tudi v progresiji in metastaziranju. Z uravnavanjem izražanja genov za

celično delitev (npr. geni, ki kodirajo rastne faktorje, kot sta TNF- $\alpha$  in IL-6), povečana aktivacija NF $\kappa$ B omogoča pospešeno delitev tumorskih celic, z uravnavanjem izražanja genov, ki kodirajo antiapoptotične proteine (npr. IAP, Bcl-2, c-FLIP, ...), pa omogoča njihovo preživetje. Z uravnavanjem izražanja genov za številne proteaze, npr. metaloproteinaze, ki razgrajujejo komponente ekstracelularnega matriksa, NF $\kappa$ B prispeva k invazivnosti tumorskih celic. Preko regulacije vaskularnega endotelijskega ravnega dejavnika, prispeva k angiogenezi, ki velja za ključen proces tumorske progresije. Metastaziranje pa posreduje preko regulacije specifičnih molekul, ki tumorskim celicam dajejo sposobnost prodiranja skozi žilne stene. Spremenjena aktivacija NF $\kappa$ B je povezana tudi z rezistenco tumorskih celic na obstoječa citotoksična zdravila in s slabo prognozo bolnikov z rakom. Zaradi vseh naštetih razlogov je postal NF $\kappa$ B zanimiva tarča za razvoj novih protirakavih učinkovin, ki bi zavirale njegovo aktivacijo. Študije kažejo obetavne rezultate, saj so bile številne preučevane učinkovine, od zaviralcev proteasoma, zaviralcev IKK, zaviralcev acetilacije, protismiselnih RNA do zaviralcev vnetja, uspešne pri zaviranju NF $\kappa$ B aktivacije (22). Zanimive so tudi ugotovitve, da nekatere naravne učinkovine (npr. resveratrol, kurkumin, flavonoidi) zavirajo prekomerno aktivacijo NF $\kappa$ B in bi se kot take lahko uporabljale v preventivi rakavih obolenj (21).

### 1.5 Antagonisti na $\alpha$ -adrenergičnih receptorjih

Eno novejših orožij v boju proti raku bi utegnili biti antagonisti na  $\alpha$ -adrenergičnih receptorjih. Ti se sicer uporabljajo za zdravljenje povišanega krvnega tlaka in benigne hiperplazije prostate, v zadnjih letih pa študije kažejo tudi na njihovo sposobnost indukcije apoptoze v rakavih celicah. Predmet študij so predvsem selektivni  $\alpha_1$ -adrenergični antagonisti, kot so doksazosin (dox), prazosin in terazosin. Te učinkovine so testirali na različnih vrstah rakavih celic. Ugotovili so, da dox (slika 4) zavira proliferacijo in inducira apoptozo malignih celic dojke. Indukcija apoptoze temelji na zaviranju EGFR (receptor za epidermalni rastni dejavnik) in NF $\kappa$ B signalnih poti (24). Podobne učinke je dox izkazal na malignih celicah hipofize, kjer so opazili zaviranje proliferacije in indukcijo apoptoze preko modulacije NF $\kappa$ B signalne poti. Dox je zmanjšal izražanje fosforilirane oblike I $\kappa$ B $\alpha$  (25). Preizkušali so ga tudi na rakavih celicah prostate in ugotovili, da bi lahko z njim ustavili ali vsaj zadržali tumorsko rast. Vplival je na številne signalne poti in med drugim povzročil apoptozo rakavih celic prostate zaradi izgube povezav med celicami in ekstraceličnim matriksom (26). Doksazosin, terazosin in prazosin, s skupnim imenom

kinazolinski antagonisti na  $\alpha_1$ -adrenoceptorjih, so bili predlagani kot modelna učinkovina za razvoj novih spojin, ki bi delovale samo v smeri indukcije apoptoze v tumorskih celicah, brez stimulacije adrenergičnih receptorjev. Večina študij je namreč dokazala, da je apoptotični učinek delno neodvisen od  $\alpha$ -adrenoceptorjev (27). Razen kinazolinskih  $\alpha_1$ -adrenergičnih antagonistov je bil preskušan tudi novejši antagonist kalcijevih kanalčkov, labedipinedilol-A, ki izkazuje visoko afiniteto tudi do  $\alpha_{1A}$ - in  $\alpha_{1D}$ -adrenergičnih receptorjev. Študija je razkrila, da je inkubacija, tako hormonsko odvisnih kot hormonsko neodvisnih rakavih celic prostate, z labedipinedilolom-A zavrla proliferacijo z zastojem v  $G_0/G_1$  ali v  $G_2/M$  fazi celičnega cikla (odvisno od koncentracije učinkovine) ter povzročila indukcijo apoptoze preko modulacije izražanja Bcl-2 proteinov in drugih signalnih poti (28).



Slika 4: Struktura doksazosina.



## 2 NAMEN DELA

V predhodnih raziskavah so odkrili skupino zaviralcev serinskih proteaz z N-amidinopiperidinsko strukturo, ki je izkazovala selektivno citotoksičnost proti celicam Ramos. S pomočjo farmakogenetskega pristopa - primerjave genskih ekspresijskih signatur, so se nadalje lotili iskanja majhnih aktivnih molekul z enakim učinkom. Izsledki te študije so privedli do naše testne učinkovine.

Predpostavili smo, da bo zaradi podobne genske signature naša učinkovina, tako kot omenjeni zaviralci serinskih proteaz, selektivno toksična za celice Ramos in bo povzročala njihovo smrt z indukcijo od kaspaz odvisne apoptoze. Da bi te hipoteze potrdili, bomo najprej ugotavljali selektivno citotoksičnost s testom presnovne aktivnosti na različnih celičnih linijah (Ramos, Jurkat, U937, PBMC). Nato bomo izvedli analizo celičnega cikla, s čimer bomo ugotovili če in v kateri fazi pride do zastoja rasti. S testom, v katerem celice označimo s kombinacijo aneksin V/propridijev jodid in z merjenjem aktivnosti kaspaz bomo določili mehanizem celične smrti oz. ugotavljali, ali je smrt celic posledica indukcije od kaspaz odvisne apoptoze. Nazadnje pa se bomo dotaknili še proučevanja signalizacije, preko katere poteče apoptoza, in sicer z metodo prenosa po Westernu.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 Materiali

##### 3.1.1 Kemikalije in reagenti

<i>Kemikalija</i>	<i>Proizvajalec</i>
Ac-DEVD-AFC peptidni substrat	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
akrilamid in N,N'-metilen-bisakrilamid	Fluka Chemie AG, Buchs, Švica
antibiotik in antimikotik, raztopina	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
aprotinin	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
APS	Fluka Chemie AG, Buchs, Švica
BFM (bromfenol modro)	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
BSA	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
DMSO	Merck Chemicals, Darmstadt, Nemčija
Halt fosfataza	Thermo Fisher Scientific, IL, ZDA
izopropanol	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
2-merkaptioetanol	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
MTS-reagent Cell Titer 96® AQueous	Promega, Madison, WI, ZDA
PMSF (fenilmetilsulfonilfluorid)	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
propidijev jodid	Invitrogen, CA, ZDA
RPMI 1640 medij	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
SDS	Promega, Madison, WI, ZDA
SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen, CA, ZDA
SuperSignal® West Femto	Thermo Fisher Scientific, IL, ZDA
TEMED	Bio-Rad, Richmond, CA, ZDA
tripansko modriilo, raztopina	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
Tween 20	Bio-Rad, Richmond, CA, ZDA
zVADfmk	BD Pharmingen, NJ, ZDA

### 3.1.2 Kompleti

<i>Komplet</i>	<i>Proizvajalec</i>
Bio-Rad Protein Assay Kit I, komplet za določanje koncentracije proteinov	Bio-Rad, Richmond, CA, ZDA
PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I, komplet za določanje števila apoptotičnih celic	BD Biosciences

### 3.1.3 Medij za gojenje celic

RPMI 1640 medij: 500 mL RPMI 1640, 50 mL FBS, 5 mL L-glutamina (200 mM), 5 mL raztopine antibiotik/antimikotik, 0,5 mL 2-merkaptetanola (50 mM)

### 3.1.4 Protitelesa

<i>Protitelo</i>	<i>Proizvajalec</i>
Primarna kunčja monoklonska protitelesa proti I $\kappa$ B $\alpha$	Cell Signaling, Danvers, MA, ZDA
Primarna kunčja monoklonska protitelesa proti p-I $\kappa$ B $\alpha$	Cell Signaling, Danvers, MA, ZDA
Primarna mišja monoklonska protitelesa proti $\beta$ -aktinu	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
Sekundarna kozja anti-kunčja protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo	Upstate (Temecula, CA, ZDA)
Sekundarna kozja anti-mišja protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo	Upstate (Temecula, CA, ZDA)

### 3.1.5 Pufri in raztopine

- 10 % amonijev persulfat v dH<sub>2</sub>O (APS)
- 1 M fosfatni pufer (pH 6,0): 2,14 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 12,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,37 g EDTA, 5,84 g NaCl in dH<sub>2</sub>O do 100 mL
- kaspazni lizatni pufer: 0,1 % Triton X-100, fosfatni pufer (100 mM) pH 6,0, EDTA (1,3 mM) in NaCl (100 mM)
- kaspazni reakcijski pufer: PIPES pH 7,2 (20 mM), 10 % saharoza, 0,1 % CHAPS, EDTA (1 mM), NaCl (100 mM) in dH<sub>2</sub>O
- 10x PBS (pH 7,4): 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in dH<sub>2</sub>O do 1000 mL
- pufer za barvanje (celični cikel): Tris (100 mM, pH 7,4), NaCl (150 mM), CaCl<sub>2</sub> (1 mM), MgCl<sub>2</sub> (0,5 mM), 0,1 % Nonidet P40
- RIPA pufer: 1 % Nonidet P40, 0,5 % Na-deoksiholat, 0,1 % SDS, 0,004 % NaN<sub>3</sub>
- lizatni RIPA pufer: 1600 µL RIPA, 1,6 µL aprotinin, 8 µL PMSF, 16 µL Halt-fosfataza
- 3x SLB (ang. sample loading buffer): 30 % glicerol, 0,3 % BFM, 9 % SDS, Tris/HCl (195 mM, pH 6,8) in dH<sub>2</sub>O
- nanašalni pufer: 13,33 µL 3x SLB, 1,6 µL BFM, 2,4 µL 2-merkaptioetanol (za 1 vzorec)
- ločevalni pufer (ang. separating buffer): Tris (1,5 M, pH 8,8), 0,4 g SDS in dH<sub>2</sub>O
- koncentracijski pufer (ang. stacking buffer): Tris (0,5 M, pH 6,8), 0,4 g SDS in dH<sub>2</sub>O
- 5x elektroforezni pufer Tris-glicin: Tris (25 mM), glicin (250 mM), 0,1 % SDS in dH<sub>2</sub>O
- 10 % SDS (pH 7,2): 10 g SDS in 90 mL dH<sub>2</sub>O
- 10x TBS (pH 7,4): Tris (250 mM), NaCl (1370 mM), KCl (30 mM) in dH<sub>2</sub>O do 1000 mL
- TTBS: 0,02 % Tween 20 v 1x TBS
- 5 % raztopina mleka: 5 g mleka v prahu in 50 mL TTBS
- pufer za odstranjevanje vezanih protiteles (ang. stripping buffer): 2 % SDS, Tris (62,5 mM, pH 6,8), 2-merkaptioetanol (100 mM)

### 3.1.6 Geli za SDS-PAGE

#### 8 % ločevalni gel:

30 % akrilamid	2,7 mL
1,5 M Tris, pH 8,8	2,5 mL
H <sub>2</sub> O	4,6 mL
10 % SDS	100 µL
10 % APS	100 µL
TEMED	6 µL

#### 5 % koncentracijski gel:

30 % akrilamid	850 µL
0,5 M Tris, pH 6,8	625 µL
H <sub>2</sub> O	3,4 mL
10 % SDS	50 µL
10 % APS	50 µL
TEMED	5 µL

### 3.1.7 Laboratorijska oprema

<i>Aparatura/material</i>	<i>Proizvajalec</i>
avtoklav	A-21, Kambič laboratorijska oprema, Semič, SLO
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
G-box in programska oprema SynGene	SynGene, Cambridge, VB in SynGene, Frederick, MD, ZDA
hladilnik/zamrzovalnik	Gorenje, Velenje, SLO
inkubator	Heraus Holding GmbH, Hanau, Nemčija
invertni svetlobni mikroskop (Olympus CK40)	Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Nemčija
kadička za vertikalno elektroforezo	Bio-Rad, Richmond, CA, ZDA
komora z laminarnim pretokom zraka (LAF)	Waldner Electronics FAZ 3, Wangen, Nemčija
krioviale	TPP, Trasadingen, Švica
mikrocentrifugirke (0,5 mL in 1,5 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija
mikrotitrne ploščice za gojenje celičnih kultur (s 6, 12, 24 ali 96 vdolbinami)	TPP, Trasadingen, Švica
naprava iBlot® za prenos po Westernu in komplet za prenos po Westernu	Invitrogen, CA, ZDA
nastavki za pipete (do 10, 200, 300 ali 1000 µL)	Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija
pipete	Bio-Rad ali Eppendorf
precizna tehtnica	Europe60 Gibertini
pretočni citometer FACScalibur	BD Biosciences, SJ, CA

programska oprema za Tecan	Magellan V3.X IVD
serološke pipete	TPP, Trasadingen, Švica
spektrofotometer Tecan Safire2 TM Genios	Tecan, Genios, Zürich, Švica
stresalnik	Vibromix 314 EVT Tehnica
termični stresalnik Apollo HP50	CLP Tools, San Diego, ZDA
ultrasonični homogenizator 4710	Call-Rarner Instrument Co., IL, ZDA
vir napetosti za elektroforezne kadičke	Bio-Rad, Richmond, CA, ZDA
vodna kopel	Mikro+Polo, Maribor, SLO Memmert, Schwabach, Nemčija
vorteks (Vortex GENIE 2)	Scientific Industries, FL, ZDA
vsebniki za gojenje celičnih kultur (s 25, 75 in 150 cm <sup>2</sup> rastne površine)	TPP, Trasadingen, Švica
zamrzovalnik za temperaturo -80°C	Forma Scientific, ON, Kanada

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Gojenje celičnih kultur

Gojenje in večino testov na celicah smo izvajali v za to namenjenem celičnem laboratoriju, kjer velja poseben režim čistoče. Pri delu smo uporabljali zaščitno haljo in rokavice ter posebno obutev. Samo delo je potekalo v komori z laminarnim pretokom zraka (LAF), ki zagotavlja stalen pretok filtriranega zraka na delovno površino. S tem omejuje dostop zunanjemu zraku in posledično kontaminacijo celičnih kultur. Pred pričetkom dela smo komoro razkužili z 20 minutnim obsevanjem z ultravijolično svetlobo ter jo nato prebrsali s 70-odstotnim etanolom. Tudi roke z rokavicami smo ob vsakem vnosu v komoro razkuževali z etanolom.

V prvi fazi smo morali celice odmrzniti. Zamrznjene celice shranjujemo v kriovialah v mediju z 10 % DMSO pri -180°C (v tekočem dušiku). Ko celice vzamemo iz tekočega dušika, jih moramo hitro odtaliti. Odtalili smo jih v vodni kopeli, segreti na 37°C, z rahlim stresanjem. Odtaljeno suspenzijo smo nato prenesli v 15 mL centrifugirko, v katero smo predhodno odpipetirali 10 mL segretega medija. Suspenzijo smo centrifugirali 5 minut pri

hitrosti 1200 rpm. Po centrifugiranju smo supernatant odpipetirali in celice resuspendirali v svežem mediju.

Celice Ramos, Jurkat, U937 in PBMC smo gojili v mediju RPMI 1640 in jih hranili v posebnih vsebnikih (T-flask) v inkubatorju pri 37°C in v prisotnosti zraka s 5 % CO<sub>2</sub>.

- Celice Ramos so EBV negativne celice, ki izvirajo iz Burkittovega limfoma.
- Celice Jurkat so CD4+ limfociti T, ki izvirajo iz akutne T-celične levkemije.
- Celice U937 so monocitne celice, ki izvirajo iz difuznega histiocitnega limfoma.
- PBMC so zdrave periferne krvne mononuklearne celice (limfociti, monociti in makrofagi).

Vsak drugi dan smo celice redčili s svežim medijem, ki smo ga vedno predhodno segreti na 37°C. Celice smo redčili zato, da smo zagotovili optimalno koncentracijo za njihovo rast, t.j.  $1 \times 10^5$  celic/mL. Za ustrezno redčenje smo morali najprej celice prešteti. Štetje celic se izvaja s pomočjo hemocitometra, t.j. posebno objektno steklo z mrežo, imenovano tudi merilna komora. Mreža je razdeljena na štiri dele, znotraj katerih štejemo celice. 15 µL suspenzije celic smo zmešali s 15 µL barvila tripansko modro in to nanegli na hemocitometer. Pod mikroskopom smo prešteli žive celice v štirih kvadrantih in izračunali trenutno koncentracijo po naslednji enačbi:

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

Enačba 1: Računanje koncentracije celic. A, B, C, D - število živih celic v posameznem kvadrantu, f - faktor redčenja

### 3.2.2 Test MTS

Test MTS je kolorimetrična metoda za določanje števila živih celic. Uporablja se pri ugotavljanju celične proliferacije, citotoksičnosti ali kemosenzitivnosti. Temelji na reakciji pretvorbe tetrazolijeve soli do vijolično obarvanega formazana. Ta pretvorba poteka le v metabolično aktivnih celicah (živih celicah), ki imajo za to potrebne presnovne encime. Detekcija nastalega produkta, formazana, poteka z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 490 nm. Izmerjena absorbanca je direktno sorazmerna številu živih celic v kulturi (29).

Postopek: Pripravili smo ustrezen volumen suspenzij celičnih kultur Ramos, Jurkat in U937 s koncentracijo  $1 \times 10^5$  celic/mL ter PBMC s koncentracijo  $1 \times 10^6$  celic/mL v mediju za gojenje. Nato smo suspenzije alikvotirali na ustrezne mikrotitrne ploščice, tako da je



bilo v vsaki vdolbinici po 700  $\mu$ L. Ena vdolbinica je služila kot kontrola. V tej je bila samo suspenzija celic (netretirane celice). Ena vdolbinica pa je služila kot slepa vrednost, v kateri je bil samo medij. V ostalih vdolbinicah smo suspenziji celic dodali raztopino testne učinkovine v ustrezni koncentraciji (raztopili smo jo v DMSO). Nato smo celice (oz. medij) iz vsake vdolbinice v triplikatih po 100  $\mu$ L prenesli na mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinicami. Ploščice smo inkubirali 24 h pri 37°C in 5 % CO<sub>2</sub>. Po 24-ih urah smo v vsako vdolbinico dodali 10  $\mu$ L reagenta MTS in inkubirali še 3-4 h. Po tem času smo pomerili absorbanco vzorcev na ploščicah. Absorbanco smo merili s spektrofotometrom Tecan. Rezultate smo podali v odstotkih metabolične aktivnosti celic glede na kontrolo.

### 3.2.3 Analiza celičnega cikla

Celični cikel lahko analiziramo na pretočnem citometru preko določanja količine DNA v celicah. Določanje količine DNA omogočajo barvila, ki so se sposobna vezati na dvojno vijačnico. Barvila se vežejo z DNA v stehiometričnem razmerju, kar pomeni, da je količina barvila direktno sorazmerna s količino DNA v celici. Obstaja več vrst barvil. Eno takšnih je propidijev jodid (PI), ki se interkalira med bazne pare.

Citometer med analizo šteje celice, ki so v posameznih fazah celičnega cikla. V faze jih razvrsti glede na količino DNA v celici. Na začetku cikla, v fazi G<sub>1</sub>, so celice diploidne. To pomeni, da imajo v jedru dva kompleta kromosomov. Take celice označujemo z »2N«. V fazi S se DNA v celici podvojuje, zato so le-te nekje med diploidnimi in tetraploidnimi. V fazi G<sub>2</sub> je DNA že dokončno podvojena, zato so celice tetraploidne in jih označujemo s »4N« (30).

Postopek: Pripravili smo suspenzijo celične kulture Ramos s koncentracijo  $5 \times 10^5$  celic/mL ter po 1 mL suspenzije odpipetirali v dve vdolbinici na mikrotitrski ploščici. Ena vdolbinica je služila za kontrolo (netretirane celice), v drugi vdolbinici pa smo celicam dodali testno učinkovino v koncentraciji 25  $\mu$ M. Ploščico smo inkubirali 24 h, nato pa odvzeli vzorca. Vzorca celic smo najprej centrifugirali 5 min pri 1800 rpm, odpipetirali supernatant, resuspendirali v 1 mL PBS in ponovno centrifugirali pri enakih pogojih. Potem smo odpipetirali PBS, celice prenesli v nove vsebnike in jih fiksirali v 2 mL hladnega absolutnega etanola. Fiksacija je potekala 15 min pri -20°C. Sledilo je centrifugiranje na višjih obratih (2400 rpm), odstranitev etanola in rehidracija v 1,5 mL PBS. Celice smo pustili v PBS 15 min pri sobni temperaturi. V tem času smo pripravili pufer za barvanje, ki smo mu dodali PI in zaviralec RNaz. Po rehidraciji smo celice

ponovno centrifugirali, odstranili PBS ter jih resuspendirali v pufru s PI. S pipeto smo celice dobro premešali s pufrom ter pustili stati 15 min na sobni temperaturi, zaščitene pred svetlobo. Po inkubaciji z barvilom smo izvedli analizo na pretočnem citometru.

#### *3.2.4 Test barvanja s kombinacijo aneksin V-PE/PI*

Test z aneksinom uporabljamo za določanje mehanizma celične smrti. Omogoča nam ugotoviti, če gre za apoptozo. Ena izmed zgodnjih značilnosti apoptotičnih celic je eksternalizacija fosfatidilserina na zunanjo stran celične membrane. Aneksin je protein, ki se veže na fosfolipide. S posebej visoko afiniteto se veže na celice, ki na svoji površini izražajo fosfatidilserin, torej apoptotične celice. Za namene tega testa je aneksin označen s fluorokromom fikoeritinom (PE), kar omogoči njegovo detekcijo. Pogosto se celice hkrati barvajo še z barvilom, ki se veže na DNA, zato da lahko ločimo med živimi, apoptotičnimi in mrtvimi celicami. Žive in apoptotične celice imajo namreč ohranjeno integriteto membrane, zato tako barvilo ne more vstopiti v celico in v njeno jedro. Mrtve celice pa izgubijo membransko integriteto, zato barvilo lahko prodre v jedro. Uporabljali smo aneksin V-PE v kombinaciji s PI. Po barvanju z barviloma celice analiziramo na pretočnem citometru. Ta razvrsti celice v tri populacije. Žive celice so tiste, ki se ne obarvajo z nobenim od barvil, apoptotične celice se obarvajo z aneksinom V-PE ne pa s PI, mrtve celice pa se obarvajo z obema barviloma (31).

Postopek: Celice Ramos smo razredčili tako, da smo dobili potreben volumen suspenzije s koncentracijo  $4 \times 10^5$  celic/mL. Po 1 mL suspenzije smo odpipetirali v vdolbinice na mikrotitrski ploščici. V prvi vdolbinici so bile netretirane celice, v drugi vdolbinici pa celice, ki smo jih inkubirali s testno učinkovino v koncentraciji 25  $\mu$ M. Suspenzijo celic smo odpipetirali še v dve vdolbinici, kamor smo v eno dodali zVADfmk (50  $\mu$ M), v drugo pa zVADfmk in našo testno učinkovino. S pomočjo zVADfmk, ki je zaviralec kaspaz, smo lahko hkrati ugotavljali, ali je proces apoptoze kaspazno odvisen. Ploščico smo nato 24 h inkubirali pri 37°C in 5 % CO<sub>2</sub>. Po inkubaciji smo odvzeli vzorce in jih centrifugirali 5 min pri 1500 rpm. Odstranili smo supernatant ter celice dvakrat sprali z 1 mL PBS. Po spiranju smo celice resuspendirali v 500  $\mu$ L pufru za barvanje (priložen v kompletu, s katerim smo test izvajali). Določen volumen te suspenzije smo prenesli v nove vsebnike ter dodali aneksin V in PI v razmerju 1:2. Vzorce smo rahlo premešali na vorteksu, jih zaščitili pred svetlobo in inkubirali 15 min pri sobni temperaturi. Po

inkubaciji smo vsakemu vzorcu dodali še 400  $\mu\text{L}$  pufra za barvanje ter izvedli analizo na pretočnem citometru.

### *3.2.5. Izolacija in merjenje koncentracije proteinov*

Za izvedbo testa, pri katerem smo merili aktivnost kaspaz-3/-7 ter tudi nadalje pri preučevanju signalnih poti, smo morali najprej iz celic izolirati proteine. To smo naredili s pomočjo lizatnih pufrov (kaspazni lizatni pufer in RIPA lizatni pufer). Postopek je bil sledeč. Podobno kot pri vseh dozdajšnjih testih smo si pripravili suspenzijo celic z želeno koncentracijo. Po 5 mL pripravljene suspenzije smo odpipetirali v vdolbinice mikrotitrne ploščice. Ena ali več vdolbinic je predstavljalo kontrolo, v ostale pa smo dodajali testno učinkovino v različnih časovnih točkah. Po inkubaciji smo, ob ustrezni časovni točki, odvzeli vzorec. Vzorce smo centrifugirali 5 min pri 1600 rpm, jih sprali z 1 mL PBS, spet centrifugirali in resuspendirali v ustreznem lizatnem pufru. Na tem mestu smo po potrebi vzorce shranili pri  $-80^{\circ}\text{C}$ . Po odmrznitvi je sledilo še soniciranje in 30-minutno stresanje na stresalniku. Ves ta čas smo vzorce hranili na ledu. Po stresanju smo vzorce centrifugirali 15 min pri  $4^{\circ}\text{C}$  in 15000 rpm. Supernatant smo obdržali in dali nazaj na led, usedlino pa zavrgli.

Za merjenje koncentracije proteinov smo uporabili komplet, ki temelji na DC-metodi. To je posodobljena Lowryjeva metoda za določanje proteinov. Metoda temelji na uporabi treh reagentov, s katerimi izzovemo barvno reakcijo: reagent A je bazična raztopina bakrovega(II) tartrata, reagent S je površinsko aktivna snov (surfaktant) in reagent B, ki je 1,2-naftokinon-4-sulfonat oz. Folinov reagent. Surfaktant omogoči solubilizacijo proteinov, ki v bazičnem okolju reagirajo z raztopino bakrovega tartrata. Ta produkt v naslednji stopnji reducira Folinov reagent, čemur sledi značilno modro obarvanje z maksimumom absorbance pri 750 nm (32). Delo smo torej nadaljevali z ohranjenim supernatantom, v katerem se, po lizi celic, nahajajo proteini. Iz vsakega vzorca smo odpipetirali po 4  $\mu\text{L}$  supernatanta v nove epice ter jim dodali 8  $\mu\text{L}$  ustreznega lizatnega pufra. V duplikatih po 5  $\mu\text{L}$  smo tako pripravljene vzorce nanesti v vdolbinice na mikrotitrski ploščici. Potem smo nanesti še predhodno pripravljene standarde proteinov. Standarde smo pripravili iz BSA, ki smo ga razredčili z ustreznim lizatnim pufrom tako, da smo dobili koncentracije 0,2, 0,5, 0,8, 1,0 in 1,5 mg/mL. Nanesli smo jih v triplikatih po 5  $\mu\text{L}$ . Na koncu smo, v triplikatu po 5  $\mu\text{L}$ , nanesli še sam lizatni pufer, ki je služil kot slepa vrednost. Absorbance pufra smo pri računanju odšteli od absorbance standardov in vzorcev.

Po nanosu vzorcev in standardov na ploščico smo v vsako vdolbinico začeli dodajati reagente DC-metode. Najprej reagent A', ki smo ga tik pred nanosom pripravili iz reagentov A in S (na vsak mL reagenta A smo dodali 20  $\mu$ L reagenta S). Dodali smo po 25  $\mu$ L reagenta A' v vsako vdolbinico. Nato pa še po 200  $\mu$ L reagenta B (Folinovega reagenta). Ploščico smo pustili stati 15 min na sobni temperaturi, da je potekla reakcija. Nato smo pomerili absorbance na spektrofotometru Tecan pri valovni dolžini 750 nm. Iz absorbanc standardov smo, s pomočjo linearne regresije, dobili enačbo premice, iz katere smo izračunali koncentracije proteinov v naših vzorcih.

### 3.2.6 Merjenje aktivnosti kaspaz-3/-7

Kaspaze so encimi, ki cepijo peptidno vez za aminokislino aspartatom. Za merjenje njihove aktivnosti uporabljamo kemiluminiscenčno metodo, pri kateri vzorcem dodamo luminogeni substrat. Substrat vsebuje specifično peptidno zaporedje, ki ga prepoznajo kaspaze in ga na tem mestu razcepijo. Pri tem se sprosti spojina, ki fluorescira. Peptidno zaporedje, ki ga prepoznata kaspazi-3/-7, je DEVD, zato pri tej metodi uporabljamo peptidni substrat Ac-DEVD-AFC. Po reakciji se sprosti 7-amino-4-trifluorometil kumarin (AFC), ki po vzbujanju s svetlobo valovne dolžine 405 nm, oddaja svetlobo valovne dolžine 535 nm. Aktivnost kaspaz določimo z merjenjem fluorescence AFC.

Postopek: Celice Ramos smo inkubirali s testno učinkovino v koncentraciji 25  $\mu$ M za 2, 4, 8, 16 in 24 h. Za vsako časovno točko smo imeli tudi kontrolo (netretirane celice). Po preteku teh časov smo vzeli vzorce, jih sprali s PBS in resuspendirali v 80-90  $\mu$ L ledeno mrzlega kaspaznega lizatnega pufra. Celične lizate smo sonicirali z ultrazvokom, stresali in centrifugirali (podrobneje opisano v poglavju 3.2.5). Koncentracijo proteinov v supernatantu smo določili z DC-metodo. Vzorce smo nato redčili s kaspaznim lizatnim pufrom tako, da je bila v vseh enaka masa proteinov (20  $\mu$ g). Na mikrotitrsko ploščico za merjenje fluorescence smo v vsako vdolbinico nanесли 50  $\mu$ L kaspaznega reakcijskega pufra z 20 mM ditiotreitolum. Temu smo dodali normirane vzorce. Delali smo v dveh paralelah. Ploščico smo nato inkubirali 30 min pri 37°C. Tik pred začetkom merjenja s spektrofotometrom smo v vdolbinice dodali 10  $\mu$ L substrata Ac-DEVD-AFC (1 mM) in takoj začeli kontinuirano meriti fluorescenco pri vzbujevalni valovni dolžini 405 nm in emisijski valovni dolžini 535 nm. Merjenje je trajalo 40 min. Rezultate smo podali kot porast fluorescence na enoto časa (dF/dt) v primerjavi s kontrolo.

### 3.2.7 Prenos po Westernu

Prenos po Westernu (ang. Western blotting ali immunoblotting) je kvalitativna in semikvantitativna metoda za določanje proteinov. Postopek poteka v več korakih. Prvi korak je ločba proteinov v vzorcih s pomočjo gelske elektroforeze. Elektroforeza je separacijska tehnika, ki omogoča ločevanje makromolekul zaradi razlik v njihovih fizikalnih lastnostih, kot sta velikost in naboj. Za ločevanje proteinov se najpogosteje uporablja poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (SDS-PAGE). Gelski matriks je sestavljen iz akrilamida in bisakrilamida, ki ob dodatku katalizatorjev polimerizirata. Matriks pripravimo iz dveh gelov. Koncentracijski gel je manj zamrežen in služi temu, da se vsi proteini iz vzorcev skoncentrirajo na bazni liniji in istočasno vstopijo v ločevalni gel, ki je bolj zamrežen in na katerem poteka dejanska ločba proteinov po velikosti. Elektroforeza poteka v sistemu pod električno napetostjo. Zaradi vezave natrijevega dodecilsulfata, ki je negativno nabit, na proteine, le-ti v električnem polju potujejo proti pozitivno nabiti anodi. Naslednji korak je prenos proteinov iz gela na sekundarni matriks. To je pogosto nitrocelulozna membrana z visoko afiniteto za vezavo proteinov. Prenos lahko poteka na različne načine, pogosto pa se zaradi hitrosti uporablja kar elektroforetski pristop, kjer poliakrilamidni gel položimo na membrano, vse skupaj damo med anodo in katodo in priklopimo na napetost. Proteini potujejo iz gela na membrano. Po prenosu moramo blokirati preostala mesta na membrani, kamor se niso vezali proteini. To storimo z inkubacijo membrane v raztopini BSA ali raztopini 5 % mleka v prahu. Blokiranje prostih mest je pomembno, da preprečimo morebitno nespecifično vezavo protiteles, s katerimi v naslednjih korakih detektiramo proteine. Sledi vezava protiteles z vmesnim spiranjem. Uporabljamo specifična protitelesa, ki se vežejo na točno določen protein, detekcija pa največkrat poteka posredno, preko sekundarnih protiteles. Membrano najprej inkubiramo v razredčeni raztopini primarnih protiteles, ki se vežejo na želene proteine. Nato jo večkrat speremo in inkubiramo še v razredčeni raztopini sekundarnih protiteles, ki se vežejo na primarna. Sekundarna protitelesa so označena z encimom. Po dodatku kromogenega, fluorogenega ali kemiluminiscenčnega substrata poteče reakcija, katere produkt omogoča detekcijo. Najbolj občutljivo detekcijo omogočajo kemiluminiscenčni substrati, saj se med reakcijo z encimom sprošča svetloba, ki jo lahko merimo z uporabo posebne kamere (33,34). V našem primeru je detekcija potekala v napravi G-box, obdelava rezultatov pa s priloženo programsko opremo GeneSnap.

Postopek: Celice Ramos v koncentraciji  $8 \times 10^5$  celic/mL smo inkubirali s testno učinkovino v koncentraciji  $25 \mu\text{M}$  za določen čas. Časovne točke so bile: 15 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h in 24 h. Netretirane celice so služile za kontrolo. Po poteku opredeljenega časa smo odvzeli vzorce, iz katerih smo izolirali proteine in določili njihovo koncentracijo po postopku, opisanem v poglavju 3.2.5. Potem, ko smo sestavili aparaturo za SDS-PAGE, smo pripravili mešanici za oba gela (ločevalni in koncentracijski). Najprej smo vlili ločevalni gel in po vrhu nakapljali izopropanol, da smo dobili ravno bazno linijo, ko se je gel strdil. Nato smo izopropanol odlili, sprali z deionizirano vodo in vlili še koncentracijski gel, v katerega smo vstavili glavniček, da so se med strjevanjem gela naredili žepki za nanašanje vzorcev. Vzorce proteinov smo razredčili tako, da je bila masa proteinov povsod enaka  $40 \mu\text{g}$ . V vsak vzorec smo dodali še  $17,3 \mu\text{L}$  nanašalnega pufru, jih vorteksirali in centrifugirali ter kuhali 5 min v vreli vodi. Po segrevanju smo dali vzorce takoj na led. Ko so se ohladili, smo jih začeli nanašati na gel. V prvi žepki smo nanесли  $4 \mu\text{L}$  označevalca velikosti proteinov (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard), v ostale žepke pa po  $30 \mu\text{L}$  vzorcev. Elektroforeza je potekala v tris-glicinskem pufru pri napetosti 100 V in toku 400 mA približno dve uri oz. toliko časa, da so vzorci pripotovali skoraj do konca gela. Sledil je prenos na nitrocelulozno membrano v posebni napravi iBlot®, skladno z navodili proizvajalca. Po prenosu smo membrano sprali v TTBS pufru in jo na sobni temperaturi 1 h inkubirali v 5 % raztopini mleka ob rahlem stresanju. Nato smo membrano ponovno sprali s TTBS (3x po 5 min) in jo dali inkubirati čez noč na  $4^\circ\text{C}$  v raztopino primarnih protiteles. Raztopine primarnih protiteles smo pripravili skladno s proizvajalčevimi navodili. Naslednji dan smo delo nadaljevali s ponovnim spiranjem membrane v TTBS (3x po 5 min) in enourno inkubacijo v raztopini sekundarnih protiteles na sobni temperaturi in ob rahlem stresanju. Po inkubaciji s sekundarnimi protitelesi smo membrano sprali 6x po 5 min s TTBS, nato pa smo jo prenesli na parafilm s substratom (SuperSignal® West Femto chemiluminiscent Substrate). Uporabljeni sekundarni protitelesi so bila konjugirana z encimom hrenova peroksidaza. Po 5 min smo pomerili luminiscenco, ki se je razvila pri reakciji med encimom in substratom, v G-boxu. Shranili smo dobljene rezultate, membrano sprali s TTBS in jo dali v pufer za odstranjevanje vezanih protiteles. V tem pufru smo jo inkubirali 1 h pri  $60^\circ\text{C}$ . Tako smo membrano pripravili za ponovno označevanje z drugimi protitelesi.

### *3.2.8 Statistična analiza*

Vse teste smo izvajali v vsaj treh bioloških ponovitvah. 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 signifikantno smo vzeli vrednost  $p < 0,05$ .

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 Ireverzibilni $\alpha$ -adrenergični antagonist izkazuje selektivno toksičnost proti celični liniji Burkittovega limfoma

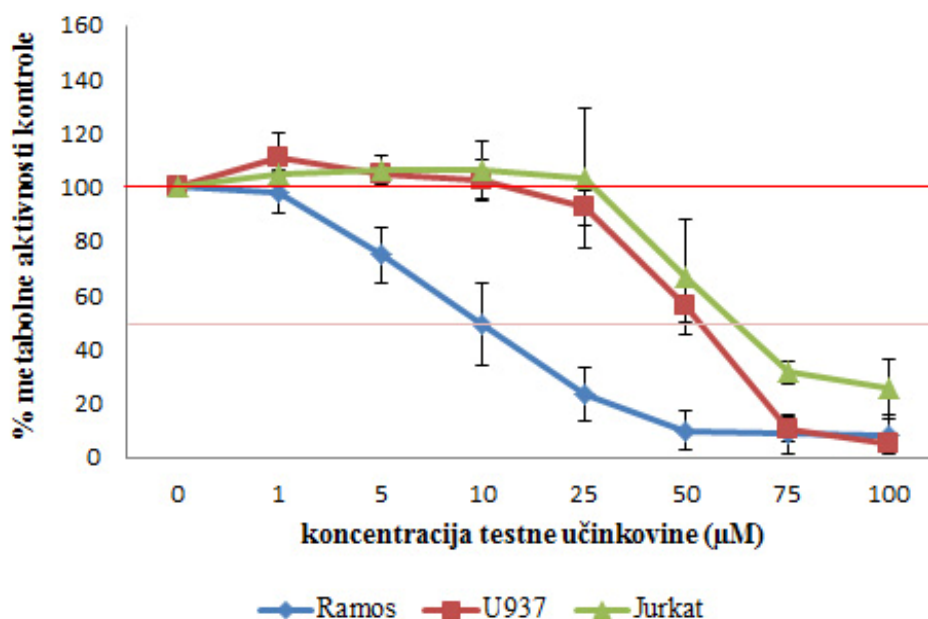
V predhodnih študijah so odkrili skupino zaviralcev serinskih proteaz z N-amidinopiperidinsko strukturo, ki so bili selektivno citotoksični za celice Ramos in so povzročili celično smrt z indukcijo od kaspaz odvisne apoptoze (35). S farmakogenetskim pristopom – primerjavo genskih ekspresijskih signatur – so se nadalje lotili iskanja majhnih aktivnih molekul z enakim učinkom. Pri tem so uporabili prosto dostopen program Connectivity map, ki omogoča iskanje povezav med boleznimi, geni in aktivnostjo učinkovin. Program deluje tako, da primerja genski profil, ki nas zanima, z referenčnimi genskimi profili v bazi podatkov in poišče podobnosti oz. t.i. »povezave« (36). Izsledki tega programa so privedli do naše testne učinkovine. Preverili smo, ali ima testna učinkovina zaradi podobne genske signature tudi podobne učinke kot omenjeni zaviralci serinskih proteaz.

Da bi ovrednotili (selektivno) citotoksičnost, smo izvedli test MTS na treh različnih vrstah levkemičnih celic, ki smo jih predhodno inkubirali s testno učinkovino. Uporabili smo celice Ramos (B limfociti Burkittovega limfoma), Jurkat (T limfociti akutne limfatične levkemije) in U937 (monociti difuznega histocitnega limfoma) v koncentraciji  $1 \times 10^5$  celic/mL, koncentracije testne učinkovine pa so segale od 1  $\mu$ M do 100  $\mu$ M. Rezultate smo podali v odstotkih metabolične aktivnosti relativno glede na kontrolo, ki jo predstavljajo netretirane celice (slika 5).

Kot je razvidno iz grafa na sliki 5, smo opazili močan citotoksičen učinek na celicah Ramos, saj se je njihova metabolična aktivnost zmanjšala za več kot 20 % že pri koncentraciji 5  $\mu$ M, pri 50  $\mu$ M pa je bila le še 10-odstotna. Na ostalih dveh celičnih linijah takega učinka nismo opazili. Pri koncentraciji 5  $\mu$ M so bile celice Jurkat in U937 enako metabolično aktivne kot kontrola, pri koncentraciji 50  $\mu$ M pa še vedno nad 50 %. Te ugotovitve kažejo na to, da je naša testna učinkovina selektivno toksična za celice Ramos. S pomočjo MTS testa smo tudi ocenili  $IC_{50}$  koncentracijo in delovno koncentracijo testne

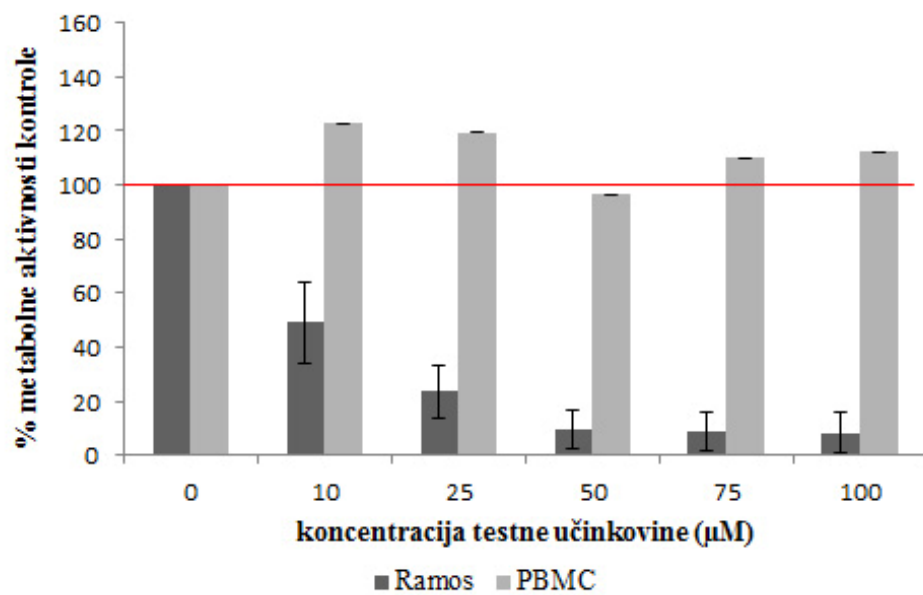


učinkovine, s katero smo izvajali nadaljnje teste.  $IC_{50}$  koncentracija za celično linijo Ramos znaša  $10 \mu\text{M}$ , delovna koncentracija pa  $25 \mu\text{M}$ .



**Slika 5: Selektivna citotoksičnost ireverzibilnega  $\alpha$ -adrenergičnega antagonista na pram tumorskim celicam.** Celice Ramos, Jurkat in U937 v koncentraciji  $1 \times 10^5$  celic/mL smo 24 h inkubirali v prisotnosti testne učinkovine in izvedli MTS test.

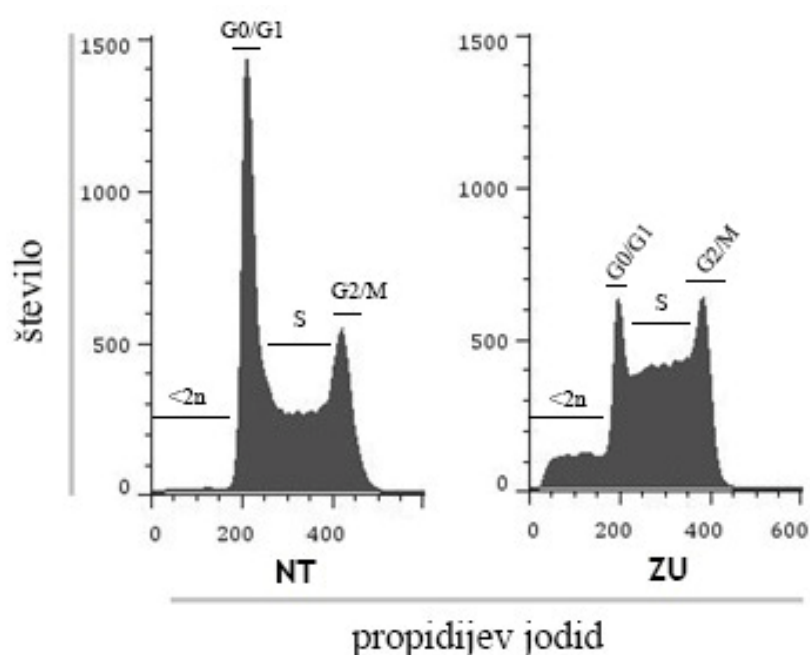
Pomemben podatek o citostatičnih zdravilih za zdravljenje raka je tudi, v kolikšni meri prizadenejo zdrave celice. Da bi ocenili toksičnost na zdravih celicah, smo inkubirali tudi periferne krvne mononuklearne celice (PBMC) z različnimi koncentracijami testne učinkovine in izvedli MTS test po enakem postopku kot pri tumorskih celicah. Ugotovili smo, da ireverzibilni  $\alpha$ -adrenergični antagonist ni toksičen za PBMC, saj se metabolna aktivnost celic ni zmanjšala v primerjavi s kontrolo (slika 6).



**Slika 6: Selektivna citotoksičnost ireverzibilnega  $\alpha$ -adrenergičnega antagonista.** Celice Ramos v koncentraciji  $1 \times 10^5$  celic/mL in PBMC v koncentraciji  $1 \times 10^6$  celic/mL smo 24 h inkubirali v prisotnosti testne učinkovine in izvedli MTS test.

## 4.2 Zastoj v S fazi celičnega cikla in povečana smrtnost celic Ramos po inkubaciji z ireverzibilnim $\alpha$ -adrenergičnim antagonistom

V naslednji stopnji smo ugotavljali, ali prisotnost testne učinkovine vpliva na potek celičnega cikla. Po 24-urni inkubaciji celic Ramos s testno učinkovino v koncentraciji 25  $\mu\text{M}$  smo odvzeli vzorce za analizo celičnega cikla. Rezultate smo podali v obliki histograma, ki prikazuje število celic z določeno količino DNA, ki je direktno sorazmerna količini interkaliranega PI (slika 7).



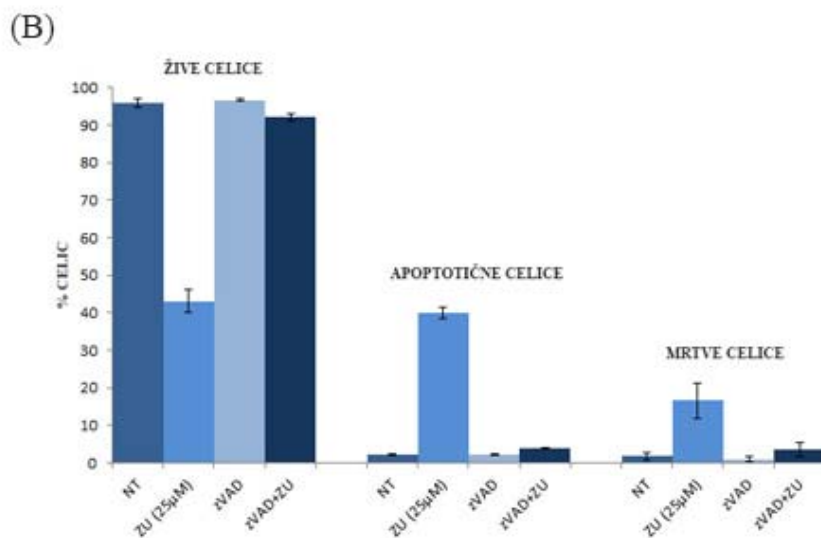
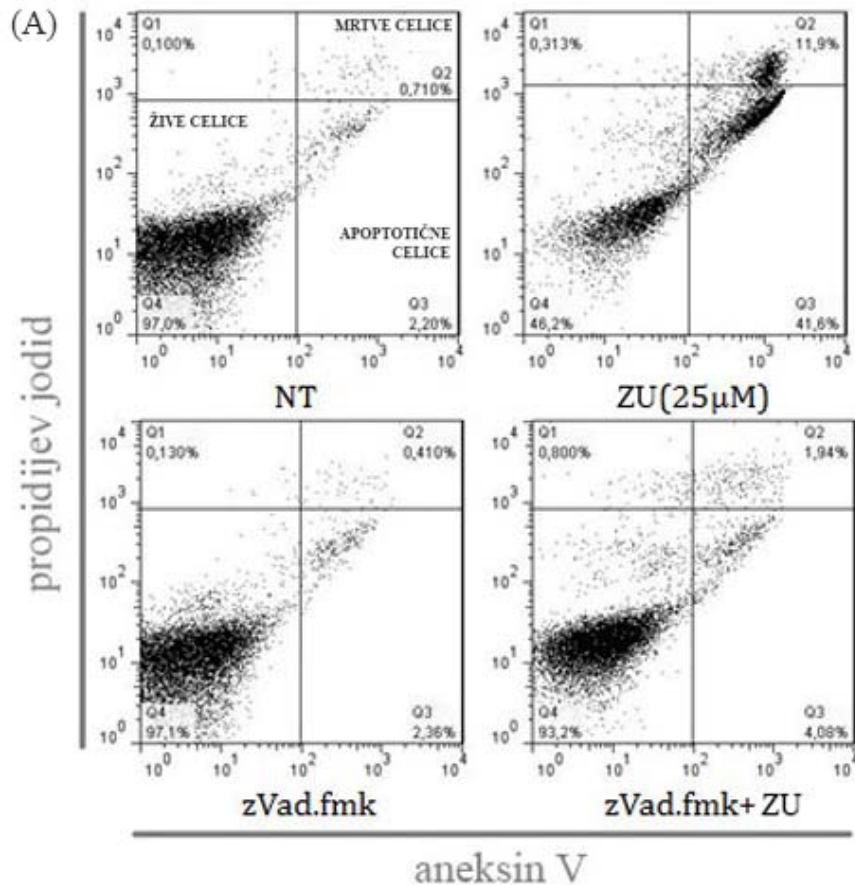
**Slika 7: Analiza celičnega cikla.** Celice Ramos v koncentraciji  $5 \times 10^5$  celic/mL smo inkubirali ali samo z medijem (NT) ali s testno učinkovino v koncentraciji 25  $\mu\text{M}$  (ZU). Po 24-ih urah smo celice označili s propidijevim jodidom in izvedli analizo celičnega cikla na pretočnem citometru.

Ugotovili smo, da inkubacija celic Ramos s testno učinkovino povzroči porušenje celičnega cikla. Povečalo se je število celic v S fazi in število mrtvih celic (hipodiploidne;  $<2n$ ), zmanjšalo pa se je število celic v fazi  $G_0/G_1$ . S testom MTS smo ugotovili, da se v prisotnosti testne učinkovine, zmanjša presnovna aktivnost celic Ramos, analiza celičnega cikla pa je pokazala povečano število mrtvih celic. Rezultati torej kažejo na to, da je zmanjšana presnovna aktivnost posledica povečane smrtnosti celic Ramos, če jih izpostavimo testni učinkovini. Ker se je povečalo število celic v fazi S, bi lahko sklepali tudi, da testna učinkovina negativno vpliva na proces podvojevanja DNA. Če bi želeli to

domnevo natančneje raziskati, bi bilo smiselno analizirati cikline, od ciklinov odvisne kinaze in druge regulatorne proteine celičnega cikla z metodo prenosa po Westernu. Glede na to, da so glavni regulatorji S faze celičnega cikla ciklini E, ciklini A in od ciklinov odvisne kinaze 2 (37), bi lahko ugotavljali, ali se pod vplivom testne učinkovine spremenita izražanje ali funkcija teh regulatornih proteinov.

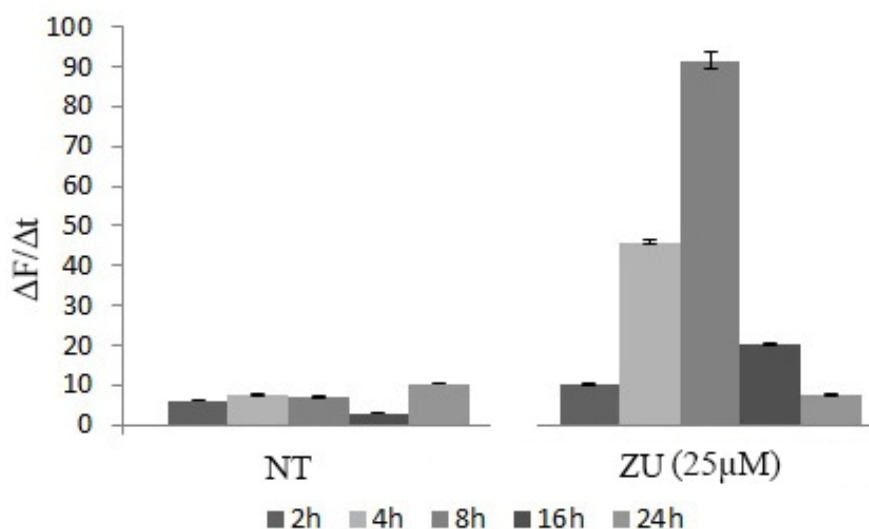
### 4.3 Ireverzibilni $\alpha$ -adrenergični antagonist v celicah Ramos inducira od kaspaz odvisno apoptozo

Da bi preverili mehanizem celične smrti, ki jo povzroči testna učinkovina, smo izvedli test barvanja s kombinacijo barvil aneksin V-PE/PI. Prva skupina celic Ramos je predstavljala kontrolo (NT), drugo skupino celic smo inkubirali s testno učinkovino v koncentraciji 25  $\mu$ M (ZU 25 $\mu$ M), tretjo skupino smo inkubirali z zaviralcem kaspaz (zVAD), četrto skupino celic pa s kombinacijo učinkovina/zVADfmk (zVAD+ZU). Celice smo nato označili z aneksinom V-PE in PI ter analizirali na pretočnem citometru. Rezultati so prikazani na sliki 8. Pri celicah, ki smo jih gojili v prisotnosti testne učinkovine, smo opazili občutno zmanjšanje odstotka živih celic ter povečanje odstotka apoptotičnih in mrtvih celic. V primerjavi s kontrolo, se je odstotek živih celic zmanjšal za 50 %, odstotek apoptotičnih celic povečal za 35 %, odstotek mrtvih celic pa za 20 %. Te ugotovitve potrjujejo, da ireverzibilni  $\alpha$ -adrenergični antagonist inducira celično smrt celic Ramos, hkrati pa kažejo na to, da je mehanizem celične smrti apoptotičen. S pomočjo pankaspaznega zaviralca, zVADfmk, smo ugotovili, da je povzročena apoptoza odvisna od kaspaz. Na to kaže podatek, da je bilo pri celicah, inkubiranih v prisotnosti zVADfmk, 10x manj apoptotičnih celic kot pri tistih, inkubiranih samo s testno učinkovino.



Slika 8: Apoptotični dogodki po inkubiranju celic Ramos z ireverzibilnim antagonistom na  $\alpha$ -adrenergičnih receptorjih v prisotnosti ali odsotnosti kaspaznega zaviralca. (A) Razporejenost posameznih populacij celic po 24-urni inkubaciji z medijem, s testno učinkovino v koncentraciji 25  $\mu$ M, z zaviralcem kaspaz (zVADfmk) ali s kombinacijo zaviralec kaspaz/testna učinkovina ter po označitvi s kombinacijo barvil aneksin V-PE/propidijev jodid. (B) Grafični prikaz odstotkov živih, mrtvih in apoptotičnih celic.

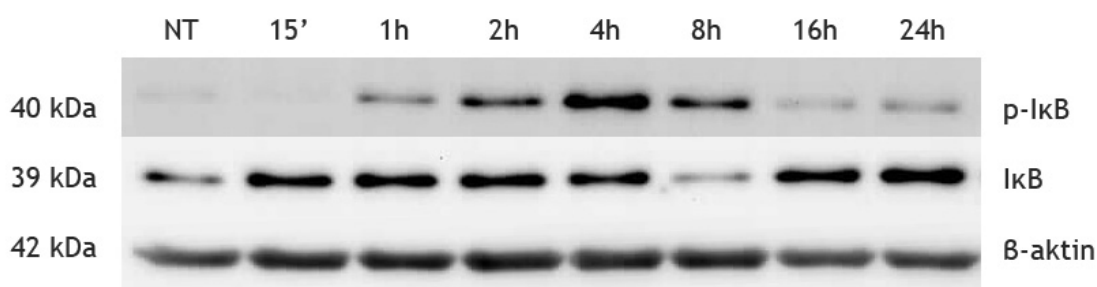
Ugotovitve smo želeli potrditi, zato smo naredili še test merjenja aktivnosti kaspaz-3/-7. Celice Ramos smo inkubirali s testno učinkovino v koncentraciji 25  $\mu\text{M}$  tekom različnih časovnih obdobj. Za vsako časovno točko smo si pripravili tudi kontrole (netretirane celice). Po 2, 4, 8, 16 in 24 h smo odvzeli vzorce in izmerili aktivnost kaspaz. Pri netretiranih celicah je ostala aktivnost kaspaz ves čas približno enaka, kar je bilo pričakovano. Pri celicah, ki smo jih izpostavili testni učinkovini, pa je aktivnost močno narasla. Porast smo opazili že po 4 h, vrh pa je dosegla po 8 h. Potem je začela padati, dokler ni bila po 24 h nazaj na začetni ravni (slika 9). Močan porast aktivnosti kaspaz-3/-7 pri celicah, inkubiranih z ireverzibilnim  $\alpha$ -adrenergičnim antagonistom, potrjuje, da učinkovina inducira od kaspaz odvisno apoptozo v celicah Ramos.



**Slika 9: Aktivnost kaspaz-3/-7 v celicah Ramos.** Celice Ramos smo tekom različnih časovnih obdobj (2, 4, 8, 16, 24 h) inkubirali z medijem (NT) ali s testno učinkovino v koncentraciji 25  $\mu\text{M}$  (ZU) ter v celičnih lizatih izmerili aktivnost kaspaz.

#### 4.4 Indukcija apoptotične smrti celic Ramos je povezana z modulacijo NFκB signalne poti

V zadnjem delu diplomske naloge smo želeli še natančneje pojasniti mehanizem celične smrti s proučevanjem signalnih poti, ki se v prisotnosti ireverzibilnega  $\alpha$ -adrenergičnega antagonista spremenijo. Tako kot za veliko tumorskih celic je tudi za celice Ramos značilna konstitutivna aktivacija NFκB (38). To je eden od mehanizmov, ki rakavo spremenjenim celicam omogoča, da se izognejo apoptozi. Ker smo doslej ugotovili, da testna učinkovina inducira apoptozo v celicah Ramos, smo se odločili preveriti, ali vpliva na NFκB aktivacijo. Celice smo inkubirali s testno učinkovino v koncentraciji 25  $\mu$ M tekom različnih časovnih obdobj: 15 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h in 24 h. Celične lizate smo v tem zaporedju nanesti na gel, v žepka pred vzorci tretiranih celic pa smo nanesti še označevalec velikosti in netretirane celice za kontrolo. S pomočjo metode prenos po Westernu smo analizirali zaviralne proteine NFκB transkripcijskega faktorja, in sicer fosforilirano (p-IκB) in nefosforilirano obliko IκB.



**Slika 10: Analiza zaviralnih regulatorjev aktivacije NFκB z metodo prenosa po Westernu.** Celice Ramos smo tekom različnih časovnih obdobj (15 min, 1, 2, 4, 8, 16, 24 h) inkubirali z medijem (NT) ali s testno učinkovino v koncentraciji 25  $\mu$ M ter v celičnih lizatih detektirali fosforilirano (p-IκB) in nefosforilirano obliko IκB. Detekcija je potekala s specifičnimi primarnimi kunčjimi oz. mišjimi protitelesi (anti-pIκB, anti-IκB, anti-βaktin) ter s sekundarnimi anti-kunčjimi oz. anti-mišjimi protitelesi, konjugiranimi z encimom hrenova peroksidaza. β-aktin je služil za kontrolo nanosa.

Kot prikazuje slika 10 je prišlo do določenih sprememb v izražanju IκB. Opazili smo, da se je pod vplivom testne učinkovine povečalo izražanje p-IκB, medtem ko je ekspresija IκB ostala nespremenjena (razen po 8 h). Količina fosforilirane oblike je, v odvisnosti od časa inkubacije s testno učinkovino, naraščala od 1 h do 4 h. V tem času se celokupna količina IκB ni spremenila, kar bi lahko pomenilo, da se p-IκB kljub fosforilaciji ni

razgradil v proteasomu in posledično, da se NFκB ni aktiviral. Po 8 h se je nato ekspresija obeh oblik IκB zmanjšala in kasneje normalizirala, saj ni bilo več videti razlik v primerjavi s kontrolo. Rezultati torej nakazujejo na modulacijo klasične signalne poti NFκB. Zmanjšana razgradnja p-IκB bi lahko bila posledica zaviranja proteasoma, vendar bi to bilo potrebno potrditi z dodatnimi metodami.



## 5 SKLEP

Burkittov limfom, kot ena najbolj agresivnih B-celičnih neoplazm, zahteva visokointenzivne kombinirane kemoterapevtske režime zdravljenja, ki jih spremljajo številni neželeni učinki. V želji po iskanju racionalnejših terapevtskih pristopov, ki bi bolj selektivno vplivali na molekularne spremembe Burkittovega limfoma, smo na podlagi izsledkov predhodne farmakogenetske študije, ovrednotili spojino iz skupine ireverzibilnih  $\alpha$ -adrenergičnih antagonistov kot potencialno novo učinkovino za zdravljenje te hude bolezni. S pomočjo testa MTS smo ugotovili, da je izbrana učinkovina (AAR) selektivno citotoksična za celice Burkittovega limfoma, saj se je metabolična aktivnost teh celic po inkubaciji z AAR močno zmanjšala, medtem ko pri drugih vrstah levkemičnih celic nismo opazili enakega učinka (slika 5). Prav tako AAR ni toksičen za zdrave periferne krvne celice, kar je izredno pomembno za manjšanje neželenih učinkov (slika 6). Izvedli smo tudi analizo celičnega cikla in ugotovili, da AAR povzroči zastoj rasti celic Ramos v S-fazi cikla (slika 7). Indukcija apoptoze v tumorskih celicah je ena od osnovnih strategij za zdravljenje rakavih obolenj. To sposobnost bi lahko izkoriščali pri AAR, saj smo preko testa z aneksinom V ter merjenja aktivnosti kaspaz ugotovili, da v celicah Ramos sproži od kaspaz odvisno apoptozo (sliki 8 in 9). Mehanizem indukcije apoptoze je vsaj delno povezan z modulacijo NF $\kappa$ B signalne poti, saj je analiza zaviralnih regulatorjev NF $\kappa$ B razkrila, da AAR spremeni raven fosforilirane oblike I $\kappa$ B (slika 10). Po štirih urah inkubacije z AAR smo opazili kopičenje p-I $\kappa$ B v celicah Ramos. Ker je raven celokupnega I $\kappa$ B v tem času ostala enaka, predvidevamo, da se p-I $\kappa$ B ne razgradi v proteasomu in posledično, da se NF $\kappa$ B ne aktivira.

Podobne raziskave so že bile narejene na skupini reverzibilnih selektivnih  $\alpha_1$ -adrenergičnih antagonistov in so pokazale močan apoptotičen učinek teh spojin, ki pa je deloma neodvisen od  $\alpha$ -adrenergičnih receptorjev (24-28). Ugotovitve našega raziskovalnega dela nakazujejo, da je tudi ireverzibilni neselektivni  $\alpha$ -adrenergični antagonist sposoben indukcije apoptoze in zaviranja rasti ter razmnoževanja tumorskih celic. Koncentracija učinkovine, s katero smo dosegali omenjene učinke v celicah Ramos, je najverjetneje neprimerna za aplikacijo oz. bi jo morali optimizirati tako, da zaradi nespecifične vezave učinkovine na druge vrste receptorjev, ne bi prišlo do neželenih

učinkov. Za ireverzibilne neselektivne  $\alpha$ -adrenergične antagoniste je namreč značilno, da se vežejo tudi na holinergične, histaminske in serotoninske receptorje. Testirani ireverzibilni  $\alpha$ -adrenergični antagonist bi tako lahko postal modelna učinkovina za razvoj farmakološko podobnih spojin, s katerimi bi dosegli želene učinke v nižjih koncentracijah oz. spojin, ki bi ohranile samo apoptotične učinke, brez delovanja na  $\alpha$ -adrenoceptorje.



## 6 LITERATURA

1. Glaser M: Kronične levkemije. *Med razgl* 2005; 44: 33-41
2. Andolšek D: Bolezni krvotvornih organov. *Interna medicina*, glavni uredniki: Kocjančič A, Mravlje F, Štajer D. *Littera picta*, 5. izdaja, Ljubljana, 2012: 1301-1308, 1321-1328, 1346-1347
3. Ferry JA: Burkitt's Lymphoma: Clinicopathologic Features and Differential Diagnosis. *The Oncologist* 2006; 11: 375-383
4. Blum KA, Lozanski G, Byrd JC: Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood* 2004; 104: 3009-3020
5. Scholtysik R et al: Detection of genomic aberrations in molecularly defined Burkitt's lymphoma by array-based, high resolution, single nucleotide polymorphism analysis. *Haematologica* 2010; 95(12): 2047-2055
6. Sander S et al: Synergy between PI3K Signaling and MYC in Burkitt Lymphomagenesis. *Cancer Cell* 2012; 22(2): 167-179
7. Rui L, Goodnow CC: Lymphoma and the control of B cell growth and differentiation. *Curr Mol Med* 2006; 6(3): 291-308
8. Ohnishi K: Clinicopathological characteristics of Burkitt lymphoma. *Nihon Rinsho* 2000; 58(3): 635-638
9. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: *Molecular Biology Of The Cell* 5<sup>th</sup> Edition. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, 2008; 1053-1114, 1115-1129
10. Hotchkiss RS et al: Cell Death. *N Engl J Med* 2009; 361: 1570-1583
11. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN: Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Annals of Hematology* 2005; 84(10): 627-639
12. Elmore S: Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 2007; 35(4): 495-516
13. Jezernik K: Apoptoza. *Med Razgl* 1999; 38: 69-81
14. Pižem J, Cör A: Kaspaze. *Med Razgl* 2001; 40: 283-291
15. MacFarlane M, Williams AC: Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO reports* 2004; 5: 674-678

16. Slee EA, Adrain C, Martin SJ: Executioner Caspase-3, -6, and -7 Perform Distinct, Non-redundant Roles during the Demolition Phase of Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*; 276: 7320-7326
17. Gewirtz DA, Holt SE, Grant S: Apoptosis, Senescence and Cancer. Humana Press Inc., New Jersey, 2007; 3-31
18. Jost PJ, Ruland J: Aberrant NF- $\kappa$ B signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood* 2007; 109: 2700-2707
19. Hayden MS, Ghosh S: Signaling to NF- $\kappa$ B. *Genes & Dev* 2004; 18: 2195-2224
20. Nishikori M: Classical and Alternative NF- $\kappa$ B Activation Pathways and Their Roles in Lymphoid Malignancies. *J Clin Exp Hematopathol* 2005; 45: 15-24
21. Luqman S, Pezzuto JM: NF $\kappa$ B: A Promising Target for Natural Products in Cancer Chemoprevention. *Phytother Res* 2010; 24: 949-963
22. Sethi G, Sung B, Aggarwal BB: Nuclear Factor-  $\kappa$ B Activation: From Bench to Bedside. *Exp Biol Med* 2008; 233: 21-31
23. Vidic I, Šuput D, Milislav I: Modulatorji apoptoze kot nova zdravila. *Farm vestn* 2006; 57: 150-154
24. Hui H, Fernando MA, Heaney AP: The  $\alpha_1$ -adrenergic receptor antagonist doxazosin inhibits EGFR and NF- $\kappa$ B signalling to induce breast cancer cell apoptosis. *European Journal of Cancer* 2008; 44: 160-166
25. Fernando MA, Heaney AP:  $\alpha_1$ -Adrenergic Receptor Antagonists: Novel Therapy for Pituitary Adenomas. *Molecular Endocrinology* 2005; 19(12): 3085-3096
26. Alberti C: Apoptosis induction by quinazoline-derived  $\alpha_1$ -blockers in prostate cancer cells: biomolecular implications and clinical relevance. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2007; 11: 59-64
27. Kyprianou N, Vaughan TB, Michel MC: Apoptosis induction by doxazosin and other quinazoline  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists: a new mechanism for cancer treatment? *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 2009; 380: 473-477
28. Liou SF et al: Inhibition of human prostate cancer cells proliferation by a selective alpha1-adrenoceptor antagonist labedipinedilol-A involves cell cycle arrest and apoptosis. *Toxicology* 2009; 256: 13-24
29. [http://www.promegea.com/products/cell-health-assays/cell-viability-assays/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-\\_mts\\_/](http://www.promegea.com/products/cell-health-assays/cell-viability-assays/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-_mts_/)
30. Rabinovitch P: Introduction to cell cycle analysis. Phoenix Flow Systems, Inc.

31. Technical Data Sheet: PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I. BD Pharmingen™ 559763 Rev. 8.
32. Protein Assay. Bio-Rad Laboratories SIG 120197, LIT 448 RevD.
33. <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=8259A7B6-7DA6-41CF-9D55-AA6C14F31193>
34. Kuhelj R: Biokemija v praksi: načela in tehnike, s prilogo: Renko M, Kuhelj R, Bevec T, et al: Navodila za eksperimentalno delo pri laboratorijskih vajah iz biokemije. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 2003; 68-71, 73-74
35. Gobec M, Obreza A, Prijatelj M, Mlinarič-Raščan I: Selective cytotoxicity of amidinopiperidine based compounds towards Burkitt's lymphoma cells involves proteasome inhibition. PLoS One 2012; 7(7)
36. Lamb J et al: The Connectivity Map: Using Gene-Expression Signatures to Connect Small Molecules, Genes, and Disease. Science 2006; 313: 1929-1935
37. Schafer KA: The Cell Cycle: A Review. Veterinary Pathology 1998; 35: 461-478
38. Nazari M, Ghorbani A, Hekmat-Doost A, Jeddi-Tehrani M, Zand H: Inactivation of nuclear factor- $\kappa$ B by citrus flavanone hesperidin contributes to apoptosis and chemosensitizing effect in Ramos cells. Eur J Pharmacol 2011; 650: 526-533