

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA MEVC

VREDNOTENJE AMFIFILNIH NITROKSIDNIH RADIKALOV KOT INDUKTORJEV
APOPTOZE

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA MEVC

VREDNOTENJE AMFIFILNIH NITROKSIDNIH RADIKALOV KOT INDUKTORJEV
APOPTOZE

EVALUATION OF AMPHIPHILIC NITROXIDE RADICALS AS INDUCERS OF
APOPTOSIS

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa, univ. dipl. kem. in somentorstvom asist. dr. Anje Pišlar, mag. farm. Eksperimentalno delo sem opravljala v laboratorijih na Katedri za farmacevtsko biologijo. Spojine za potrebe magistrskega dela sta sintetizirala doc. dr. Janez Mravljak, mag. farm. in Martina Hrast, mag. farm.

ZAHVALA

Prof. dr. Janku Kosu se zahvaljujem za možnost opravljanja magistrskega dela pod njegovim mentorstvom, za nasvete pri delu ter vso ostalo pomoč v zvezi z magistkim delom.

Doc. dr. Janezu Mravljaku, mag. farm. in Martini Hrast, mag farm. se zahvaljujem za hitro sintezo spojin za potrebe magistrskega dela.

Posebna zahvala pa gre somentorici asist. dr. Anji Pišlar, mag. farm., za izjemno potrpežljivost in pomoč tako pri delu v laboratoriju, kot tudi pri pisanju magistrske naloge. Zahvaljujem pa se tudi svoji družini, za podporo in motivacijo, ki so mi jo nudili skozi celotno obdobje študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa, univ. dipl. kem. in somentorstvom asist. dr. Anje Pišlar, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	II
KAZALO SLIK.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO ENAČB.....	VII
POVZETEK.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
KLJUČNE BESEDE.....	X
SEZNAM OKRAJŠAV.....	XI
UVOD.....	2
1.1 APOPTOZA.....	2
1.1.1 EKSTRINZIČNA POT APOPTOZE.....	4
1.1.2 INTRINZIČNA POT APOPTOZE.....	5
1.1.3 VLOGA TRANSKRIPCIJSKIH FAKTORJEV DRUŽINE NF- κ B PRI URAVNAVANJU APOPTOZE.....	6
1.2 SPINSKI OZNAČEVALCI.....	8
1.2.1 AMFIFILNI NITROKSIDNI RADIKALI.....	8
NAMEN DELA.....	10
MATERIALI IN METODE.....	11
3.1 MATERIALI.....	11
3.1.1 REAGENTI.....	11
3.1.2 PROTITELESA IN STANDARDI.....	12
3.1.3 LABORATORIJSKA OPREMA.....	13
3.1.4 GOJIŠČA.....	14
3.1.5 PUFRI IN RAZTOPINE.....	15
3.1.6 CELIČNE KULTURE.....	16
3.2 METODE.....	19

3.2.1	SPEKTROFOTOMETRIJA	19
3.2.1.1	Določanje deleža preživelih celic z MTS testom	19
3.2.1.2	Merjenje aktivnosti kaspaz	20
3.2.1.3	Določanje koncentracije proteinov po Bradfordu.....	21
3.2.2	PRETOČNA CITOMETRIJA	22
3.2.2.1	Analiza celičnega cikla	23
3.2.2.2	Določanje deleža apoptotičnih celic	23
3.2.2.3	Merjenje znotrajcelične količine reaktivnih kisikovih spojin (ROS)	24
3.2.2.4	Merjenje mitohondrijskega transmembranskega potenciala (MTP).....	25
3.2.3	POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA V PRISOTNOSTI NATRIJEVEGA DODECIL SULFATA (NaDS PAGE).....	26
3.2.4	PRENOS WESTERN	28
3.2.5	STATISTIČNO OVREDNOTENJE REZULTATOV	30
	REZULTATI	31
4.1	DOLOČANJE TOKSIČNOSTI ANR ZA CELICE	31
4.1.1	SELEKTIVNA TOKSIČNOST ANR IN NJIHOVIH AMINO-ALKOHOLNIH FRAGMENTOV	34
4.1.2	ANR POVZROČIJO POVEČANJE AKTIVNOSTI KASPAZE-3 PRI CELICAH JURKAT	35
4.1.3	TOKSIČNOST ANR ZA CELICE JURKAT V ODVISNOSTI OD DOLŽINE AMINO-ALKOHOLNEGA FRAGMENTA SPOJINE.....	37
4.1.4	PROUČEVANJE POTEKA CELIČNEGA CIKLA	38
4.1.5	KASPAZNI INHIBITOR z-VAD-fmk ZMANJŠA CELIČNO SMRT, POVZROČENO Z ANR.....	39
4.1.6	APOPTOZA CELIC JURKAT POVZROČENA S SPOJINAMA 4 IN 5	40
4.2	PROUČEVANJE MEHANIZMA APOPTOZE CELIC JURKAT PO TRETIRANJU Z ANR	42
4.2.1	PROUČEVANJE AKTIVNOSTI KASPAZ 3, 8 IN 9	42

4.2.2	PROTEINSKI NIVO KASPAZE-3.....	43
4.2.3	POVEČANO NASTAJANJE ROS V CELICAH, TRETIRANIH S SPOJINO 5..	44
4.2.4	PADEC MTP PO TRETIRANJU S SPOJINO 5	45
4.2.5	VPLIV SPOJINE 5 NA IZRAŽANJE SIGNALNIH MOLEKUL, UDELEŽENIH V PROCESU APOPTOZE	46
	RAZPRAVA.....	50
	SKLEP	55
	VIRI IN LITERATURA.....	56

KAZALO SLIK

Slika 1: Poti sproženja procesa apoptoze (5).....	3
Slika 2: Shema ekstrinzične poti apoptoze (6).....	4
Slika 3: Shema intrinzične poti apoptoze (6).....	5
Slika 4: Shema klasične in alternativne poti aktivacije NF- κ B (10).....	7
Slika 5: Shematski prikaz amfifilnih nitroksidnih radikalov (14).....	9
Slika 6: Shema pretočnega citometra (30).....	22
Slika 7: Shema sistema za izvedbo elektroforeze (37).....	26
Slika 8: Sestava aparature za prenos western.....	29
Slika 9: Toksičnost ANR za različne celične kulture po 24 urni inkubaciji.....	34
Slika 10: Toksičnost amino-alkoholnih fragmentov ANR (25 μ M) za celični kulturi Jurkat in MCF10A neoT po 24 urni inkubaciji.....	35
Slika 11: Relativna aktivnost kaspaze-3 v celicah po 12 urnem tretiranju s spojino 5 (10 μ M), glede na kontrolo (DMSO, 10 μ M).....	36
Slika 12: Relativna aktivnost kaspaze-3 v celicah Jurkat in MCF10A neoT, glede na kontrolo (DMSO), po 12 urni inkubaciji s spojinami 5 , 11 in 12	37
Slika 13: Vpliv spojin 1 - 9 na celično preživetje celic Jurkat po 24 urni inkubaciji.....	38
Slika 14: Delež celic Jurkat v posamezni fazi celičnega cikla po inkubaciji s 25 μ M spojino 5	39
Slika 15: Delež preživelih celic Jurkat po 24 urnem tretiranju z različnimi ANR ob prisotnosti inhibitorja ali brez prisotnosti inhibitorja.....	40
Slika 16: Apoptoza celic Jurkat po 16 urnem tretiranju s spojinama 4 in 5	41
Slika 17: Apoptoza celic Jurkat po 16 urni inkubaciji s spojino 5 ali 12	42
Slika 18: Relativna aktivnost kaspaz, glede na kontrolo (0h), po tretiranju celic Jurkat s spojino 5 (25 μ M).....	43
Slika 19: Proteinski nivo kaspaze-3 v celicah Jurkat po tretiranju s spojino 5	44
Slika 20: Časovna odvisnost nastajanja ROS v celicah Jurkat po inkubaciji s spojino 5 ... 45	45
Slika 21: Padec MTP po tretiranju celic Jurkat s spojino 5	46
Slika 22: Spreminjanje proteinskega nivoja izražanja proteinov Bcl-2 in Bax v celicah Jurkat po tretiranju s spojino 5	47
Slika 23: Spreminjanje proteinskega nivoja različnih oblik proteina I κ B α v celicah Jurkat.....	48

Slika 24: Zmanjševanje proteinskega nivoja izražanja fosforilirane oblike proteina p105 po 12 urni inkubaciji celic Jurkat s spojino **5** (10 μ M)..... 49

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Reagenti in topila, ki smo jih uporabljali pri magistrskem delu ter njihov proizvajalec.....	11
Preglednica II: Primarna in sekundarna protitelesa in standardi, ki smo jih uporabljali pri magistrskem delu ter njihov proizvajalec.....	12
Preglednica III: Laboratorijska oprema, ki smo jo uporabljali pri magistrskem delu in njen proizvajalec.....	13
Preglednica IV: Sestava gelov za izvedbo NaDS PAGE.....	27
Preglednica V: Amfifilni nitroksidni radikali, ki izhajajo iz Tempola in njihovi amino-alkoholni fragmenti.	31

KAZALO ENAČB

<i>enačba 1</i>	18
-----------------------	----

POVZETEK

Amfifilni nitroksidni radikali (ANR) so spinski označevalci. V svoji strukturi vsebujejo nitroksidno skupino z nesparjenim elektronom ter hidroksietilaminski (HEA) fragment, zaradi katerega so potencialni induktorji apoptoze.

V magistrski nalogi smo proučili delovanje ANR na različne celične kulture in ugotovili, da delujejo v visokih koncentracijah citotoksično na vse uporabljene celične kulture. V nižjih koncentracijah pa je bila citotoksičnost ANR selektivna za celično kulturo Jurkat. Pri raziskovanju odnosa strukture in delovanja smo ugotovili, da citotoksično delujejo spojine, ki vsebujejo v HEA fragmentu 11-14 metilenskih skupin. Tiste, s krajšim ali daljšim HEA fragmentom, pa ne izkazujejo citotoksičnosti. Poleg HEA fragmenta, sta za citotoksično delovanje potrebna tudi piperidinski oz. cikloheksanski obroč, saj sami amino-alkoholni fragmenti spojin ne izkazujejo citotoksičnega učinka na celicah Jurkat. Hkrati smo na celicah Jurkat pokazali, da ANR sprožijo apoptotično celično smrt, in sicer po intrinzični poti. V celicah Jurkat pride do povečanega nastajanja reaktivnih kisikovih spojin (ROS), do padca mitohondrijskega transmembranskega potenciala (MTP) in do aktivacije kaspaz. Poleg tega se spremeni tudi nivo izražanja proteinov, ki uravnavajo proces apoptoze (Bcl-2, Bax, I κ B α , NF- κ B) tako, da v celici prevladajo signalne poti, ki spodbujajo potek apoptoze.

Pokazali smo, da so ANR v nizkih koncentracijah potencialni induktorji intrinzične poti apoptoze, njihova selektivnost pa je omejena na celice Jurkat. Za spodbujeno apoptozo celic Jurkat so potrebni vsi strukturni fragmenti spojin, jakost učinka pa je koncentracijsko odvisna in povezana s številom metilenskih skupin v HEA fragmentu spojine. Potrdili smo, da lahko ANR uvrščamo ob bok dolgoverižnim amino-alkoholom, diaminom in drugim podobnim spojinam, ki predstavljajo pomembno vejo razvoja novih protitumornih zdravilnih učinkovin.

ABSTRACT

Amphiphilic nitroxide radicals (ANRs) are spin probes. They contain an NO functional group with an unpaired electron and a hydroxyethylamine (HEA) linker, known as a possible inducer of apoptosis.

In this study we evaluated the action of ANRs on different cell cultures. In high concentrations ANRs exhibited a cytotoxic effect on all cell cultures tested. At lower concentrations the cytotoxicity was specific for Jurkat cell line. Structure activity relationship showed that cytotoxicity of ANRs depends on the number of methylene groups within the HEA linker. For cytotoxic effect the HEA linker has to contain 11-14 methylene groups. In addition, for cytotoxic effect of ANRs the whole compound is required. HEA fragments of the compounds alone do not induce apoptosis of Jurkat cells.

In Jurkat cells ANRs induce the intrinsic pathway of apoptosis. It is reflected in caspases activation and expression of high levels of reactive oxygen species (ROS) resulting in a breakdown of a mitochondrial transmembrane potential (MTP). In addition, the protein levels of signaling molecules (Bcl-2, Bax, I κ B α , NF- κ B) change in a way to favour the process of apoptosis.

Within this research we showed that low levels of ANRs induce intrinsic pathway of apoptotic cell death specifically in Jurkat cell line. Cytotoxicity of ANRs is concentration dependant and the whole structure of the compounds is needed to trigger apoptotic cell death. The number of methylene groups within HEA linker plays a crucial role in this process. We have confirmed that ANRs can be put aside to long chain amino-alcohols, diamines and other similar compounds that represent an important pool of compounds for development of new anticancer drugs.

KLJUČNE BESEDE

Amfifilni nitroksidni radikali	»ang. amphiphilic nitroxide radicals«
Apoptoza	»ang. apoptosis«
Intrinzična pot apoptoze	»ang. intrinsic pathway of apoptosis«
Kaspaze	»ang. caspases«
Induktorji apoptoze	»ang. inducers of apoptosis«

SEZNAM OKRAJŠAV

Ac-DEVD-AFC	»ang. N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-trifluoromethylcoumarin«, N-acetil- Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-trifluorometilkumarin
Ac-DNLD-CHO	»ang. Ac-Asp-Asn-Leu-Asp-1-al«, acetil-Asp-Asn-Leu-Asp-1-al
Ac-LEHD-AFC	»ang. N-Acetyl-Leu-Glu-His-Asp-7-amido-4-trifluoromethylcoumarin«, N-acetil-Leu-Glu-His-Asp-7-amido-4-trifluorometilkumarin
Ac-LETD-AFC	»ang. N-Acetyl-Leu-Glu-Thr-Asp-7-amido-4-trifluoromethylcoumarin«, N-acetil-Leu-Glu-Thr-Asp-7-amido-4-trifluorometilkumarin
ANR	»ang. Amphiphilic nitroxide radicals«, amfifilni nitroksidni radikali
Bcl-2	»ang. B-cell lymphoma protein 2«, protein 2 B-celičnega limfoma
BSA	»ang. Bovine Serum Albumin«, goveji serumski albumin
DMEM	»ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium«, gojišče za celične kulture
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	deoksi-ribonukleinska kislina
DTT	ditiotretitol
EDTA	»Ethylenediaminetetraacetic acid«, etilendiaminotetraocetna kislina
EGF	»ang. Epidermal Growth Factor«, epidermalni rastni dejavnik
FBS	»ang. Fetal Bovine Serum«, fetalni goveji serum
H ₂ DCF-DA	»ang. 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate«, 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat

HRP	»ang. Horseradish peroxidase«, encim hrenova peroksidaza
MTP	mitohondrijski transmembranski potencial
MTS	»ang. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium«, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol
NaDS	natrijev dodecilsulfat
NF- κ B	»ang. Nuclear factor kappa B«, jedrni dejavnik kapa B
PAGE	»ang. Polyacrylamide gel electrophoresis«, poliakrilamidna gelska elektroforeza
PBS	»ang. Phosphate Buffered Saline«, fosfatni pufer z NaCl
PI	»ang. Propidium iodide«, propidijev jodid
RIPA pufer	»ang. Radio-Immunoprecipitation Assay Buffer«, pufer za radioimunoprecipitacijski test
RPMI	»ang. Roswell Park Memorial Institute medium«, gojišče za celične kulture
TBS	»ang. Tris-Buffered saline«, Tris pufer
TBS-T	Tris pufer z dodatnim Tween 20
TEMED	»ang. Tetramethylethylenediamine«, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
z-VAD-fmk	»ang. benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone«, karbobenzoksil-Val-Ala-Asp-(O-metil)-fluorometilketon

UVOD

1.1 APOPTOZA

Celična smrt je proces odmiranja celic. Poznamo več različnih tipov celične smrti, ki jih lahko določimo glede na morfologijo, encimološke kriterije, funkcionalne vidike ali imunološke kriterije. Glede na morfološke lastnosti delimo celično smrt na apoptozo, nekrozo, avtofagijo in z mitozo povezano celično smrt (1).

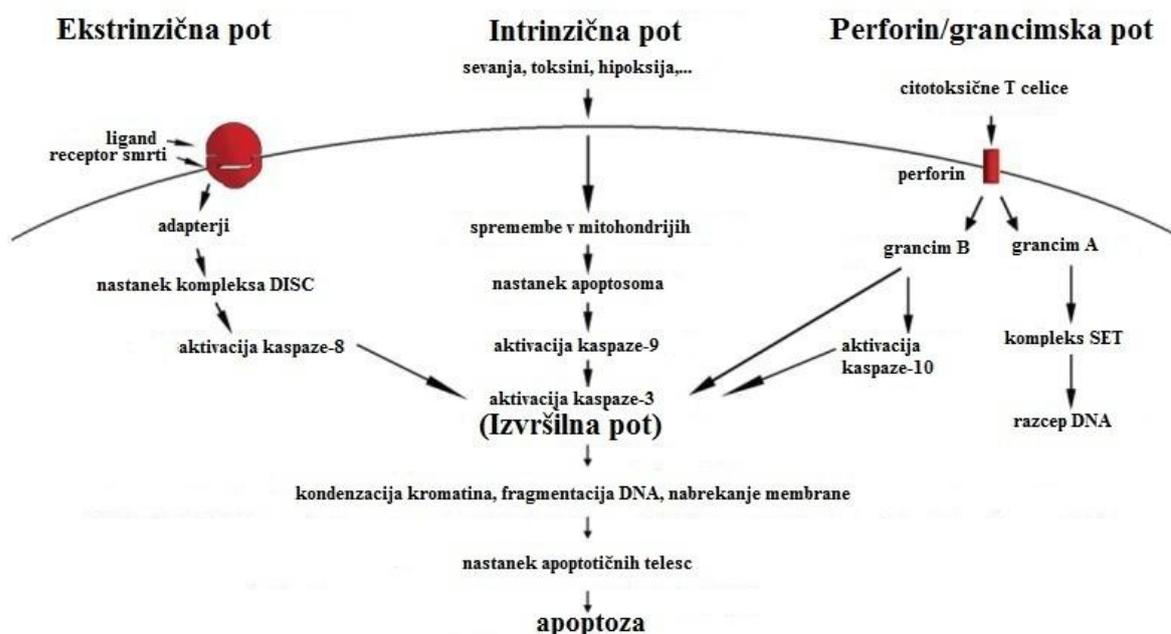
Apoptoza ali programirana celična smrt je normalen fiziološki proces, ki omogoča vzdrževanje homeostaze tkiv, uravnava imunski sistem in odstranjuje poškodovane celice (2). Apoptotične celice izkazujejo značilne morfološke spremembe, kot so krčenje volumna celice, izguba stika s sosednjimi celicami, nabrekanje membrane («ang. blebbing»), kondenzacija kromatina, fragmentacija jedra ter oblikovanje apoptotičnih teles (3).

Osrednjo vlogo pri uravnavanju apoptoze imajo od cisteina odvisne, aspartatno specifične proteaze - kaspaze, katerih aktivacija sproži potek kaskade proteoliznih reakcij. Poznamo dve vrsti kaspaz in sicer, kaspaze, ki procese apoptoze sprožijo (kaspaze 2, 8, 9 in 10) in kaspaze, ki procese apoptoze izvršijo (kaspaze 3, 6 in 7). Prve imajo zaradi afinitete do lastnega tetrapeptidnega zaporedja sposobnost samoaktivacije in hkrati aktivirajo kaspaze, ki procese izvršijo (4). Osrednjo vlogo pri apoptozi ima kaspaza-3, ki lahko aktivira druge kaspaze. Odgovorna je za značilne morfološke spremembe v celici, kot so kondenzacija kromatina, fragmentacija jedra in nabrekanje membrane (5).

Celična smrt lahko nastopi tudi brez predhodne aktivacije kaspaz. Od kaspaz neodvisne poti apoptoze so pomembne za obrambo organizma pred nezaželenimi in potencialno nevarnimi celicami, kadar od kaspaz odvisne poti odpovejo. Sprožijo pa se lahko tudi ob prisotnosti citotoksičnih dejavnikov ali signalov za celično smrt. V procesu apoptoze tako sodelujejo tudi nekatere druge proteaze, kot so od kalcija odvisna cisteinska proteaza kalpain, lizosomske cisteinske proteaze katapsini in serinske proteaze (3).

Mehanizem, po katerem bo potekla apoptoza, je odvisen od sprožilnih dejavnikov, vendar pa le-ta velikokrat ni točno definiran. Signalne molekule, kot so C-Jun N-terminalna kinaza

(JNK), z mitogenom aktivirana protein kinaza (MAPK) ali zunajcelična signalno-regulirana protein kinaza (ERK), jedrni dejavnik kapa B (NF- κ B) ali ceramid, v celicah povzročajo stres in tako omogočajo širjenje signala za potek apoptoze. Za samo izvršitev apoptoze so odgovorne kaspaze. Aktivacija slednjih lahko poteče po ekstrinzični poti preko t.i. receptorjev smrti («ang. death receptor«, DR) ali po intrinzični poti preko spremembe v mitohondrijih, kot je prikazano na sliki 1 (2). Poleg ekstrinzične in intrinzične poti apoptoze poznamo danes še perforin/grancimsko pot apoptoze. Slednjo povezujejo predvsem z imunskim odzivom organizma na tumorske celice ali z virusi okužene celice. Citotoksični T limfociti lahko te celice odstranijo z izločanjem perforina, ki se vgradi v membrano tarčne celice in v njej tvori poro. Skozi nastalo poro limfocit v tarčno celico sprosti granule z grancimoma A in B, ki sprožita apoptozo celice (5).

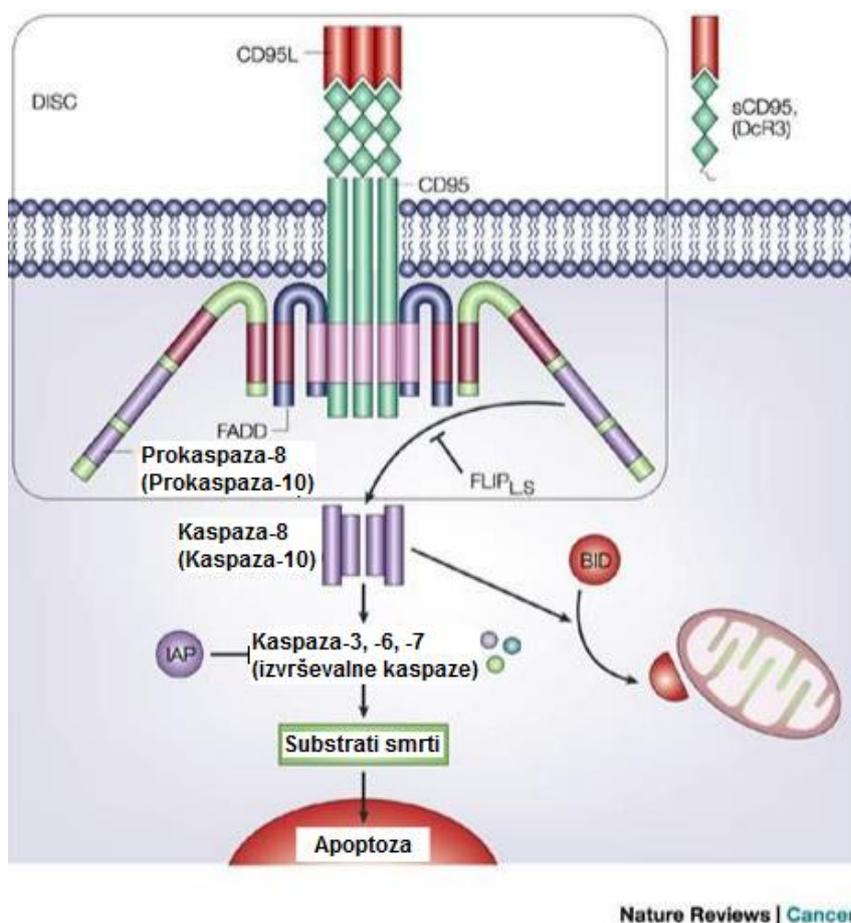


Slika 1: Poti sproženja procesa apoptoze (5).

Vsem trem zgoraj omenjenim potem, po katerih se lahko sproži proces apoptoze, je skupna aktivacija kaspaze-3. Slednja povzroči fragmentacijo DNK, degradacijo citoskeletnih in jedrnih proteinov, prečno povezovanje proteinov in tvorbo apoptotičnih teles, ki jih fagocitirajo makrofagi, tako da odmrle celice ne škodujejo sosednjim celicam (5).

1.1.1 EKSTRINZIČNA POT APOPTOZE

Proženje ekstrinzične poti apoptoze poteče preko aktivacije receptorjev smrti (DR). To je skupina več kot 20 proteinov, ki spadajo v naddružino receptorjev za dejavnik tumorske nekroze (TNF). Poleg regulacije procesa celične smrti sodelujejo tudi pri uravnavanju celičnega preživetja, diferenciacije celic ter pri uravnavanju imunskega odziva. Signal za apoptozo se s površine celice v notranjost prenaša preko t.i. domen smrti (»ang. death domain«, DD). Gre za citoplazemske domene, sestavljene iz približno 80 aminokislinskih ostankov (2). Te domene igrajo ključno vlogo pri prenašanju signala za smrt celice s površine celice do znotrajceličnih signalnih poti. Ob vezavi liganda na ustrezen receptor pride do prenosa citoplazemskih adapterskih proteinov do znotrajceličnih domen receptorja in dimerizacije efektorske domene smrti. Slednje vodi do sproženja signala za smrt celice, kar ima za posledico avtokatalitično aktivacijo prokaspaze-8. Aktivirana kaspaza-8 v nadaljevanju sproži aktivacijo kaspaze-3 in posledično proces apoptoze, kot prikazuje shema na sliki 2 (5).

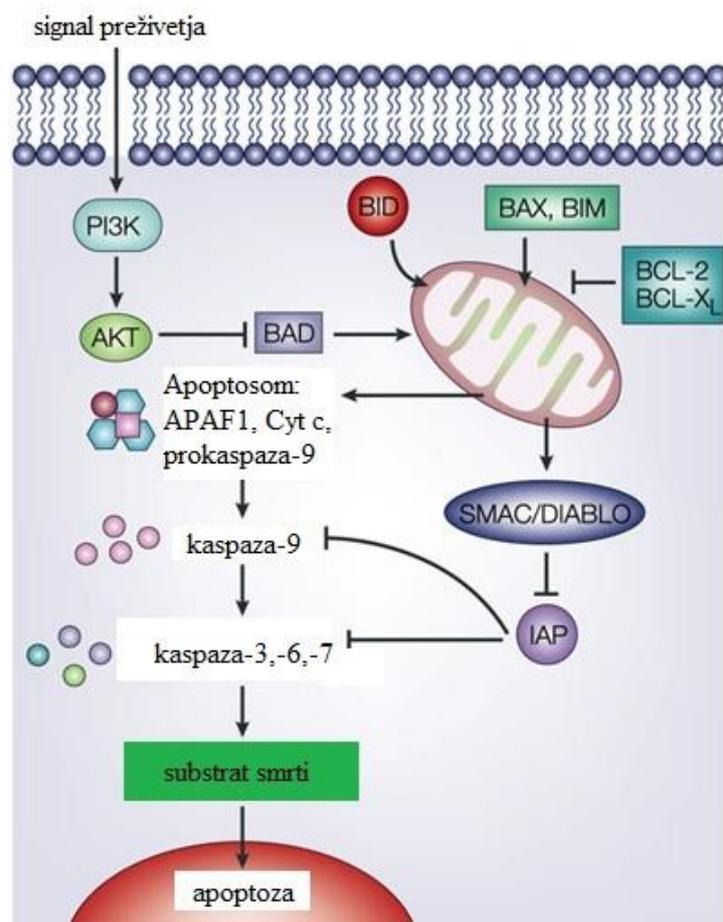


Slika 2: Shema ekstrinzične poti apoptoze (6).

1.1.2 INTRINZIČNA POT APOPTOZE

Dražljaji, ki prožijo intrinzično pot apoptoze, so vir znotrajceličnih signalov, ki jih glede na delovanje razdelimo v dve skupini. V prvo skupino spadajo signali, ki povzročijo npr. pomanjkanje določenih rastnih dejavnikov, hormonov in citokinov, kar lahko vodi do proženja apoptoze. V drugo skupino pa spadajo signali, ki jih sprožijo sevanja, toksini, hipoksija, hipertermija, virusne infekcije, radikali, kar vodi v apoptozo celic (5).

Znotrajcelični smrtni signali povzročijo spremembe v delovanju mitohondrijev. Pride do padca mitohondrijskega transmembranskega potenciala (MTP) in sprostitve dveh glavnih skupin pro-apoptotičnih proteinov iz medmembranskega prostora v citosol. V prvo skupino uvrščamo citokrom *c*, ki skupaj z apoptoznim proteazo aktivirajočim faktorjem 1 (Apaf-1) in prokaspazo-9 tvori apoptosom. Takšna vezava povzroči aktivacijo prokaspaze-9, ki vodi v aktivacijo kaspaz, ki izvršijo apoptotične procese, kot prikazuje slika 3 (5, 6).



Nature Reviews | Cancer

Slika 3: Shema intrinzične poti apoptoze (6).

Mitohondrijsko pot apoptoze regulirajo proteini iz družine proteinov 2 B-celičnega limfoma (Bcl-2), mitohondrijski lipidi, proteini, ki nadzorujejo pretok bioenergijskih metabolitov ter komponente mitohondrijske permeabilnostne pore (MPP). Tumor supresorski protein p53 ima ključno vlogo pri regulaciji delovanja proteinov družine Bcl-2. Ti proteini sodelujejo pri uravnavanju prepustnosti mitohondrijske membrane in tako uravnavajo sproščanje citokroma *c* iz mitohondrijev. Delujejo lahko pro- ali anti-apoptotično. Med pro-apoptotične proteine spadajo Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik in Blk, ki s spremembo konformacije prispevajo k večji prepustnosti mitohondrijske membrane. Anti-apoptotično aktivnost pa imajo proteini Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w in BAG, katerih glavna naloga je ohranjanje delovanja mitohondrijev in uravnavanje sproščanja mitohondrijskih proteinov v citoplazmo. Nivo izražanja proteinov družine Bcl-2 je pri apoptozi ključnega pomena, saj razmerje med pro-apoptotičnimi in anti-apoptotičnimi proteini odloča ali bo celica odmrla v procesu apoptoze ali pa se bo proces ustavil in bo celica preživel (5).

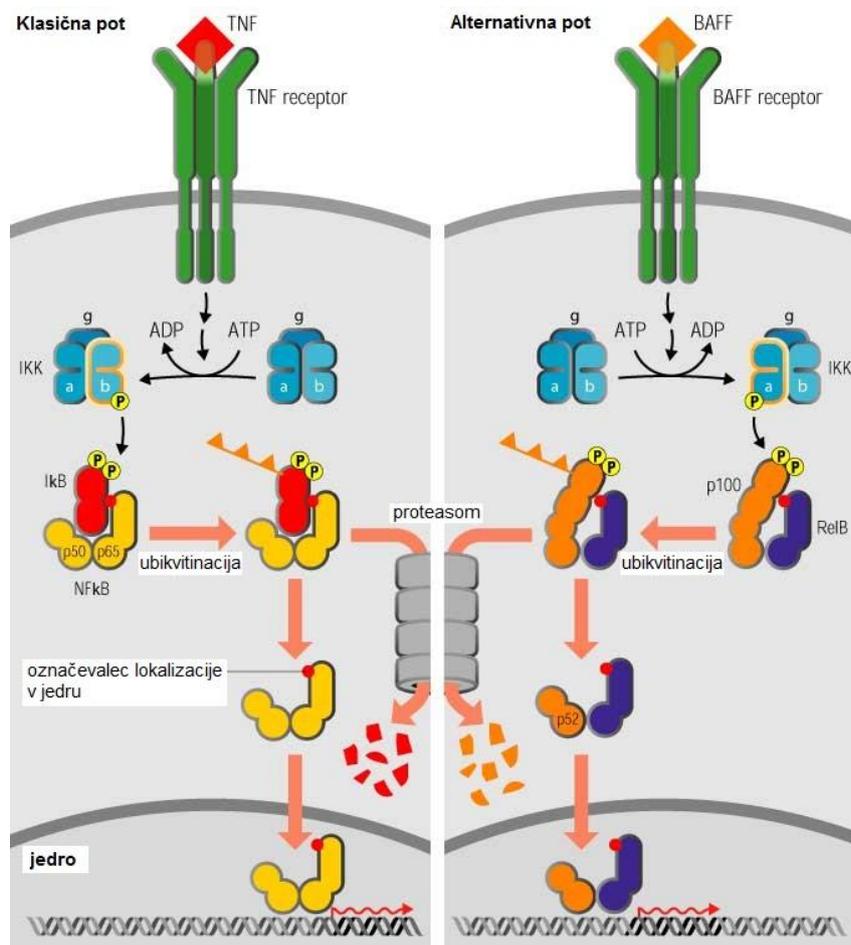
Funkcijo mitohondrija lahko poškoduje že sama aktivnost kaspaz, ki vpliva na aktivnost kompleksov I in II dihalne verige. Pri tem pride do izgube matriksnih metaloproteinaz in do nastanka reaktivnih kisikovih spojin (ROS) (2), kar pripomore k sproženju apoptoze preko intrinzične kot tudi ekstrinzične poti. Ključno vlogo pri tem ima superoksidni radikal, ki nastaja med procesom celičnega dihanja in povzroči povečano prepustnost mitohondrijske membrane in s tem sprostitvev citokroma *c* iz mitohondrijev, kar vodi v proces apoptoze (7).

1.1.3 VLOGA TRANSKRIPCISKIH FAKTORJEV DRUŽINE NF- κ B PRI URAVNAVANJU APOPTOZE

Družina transkripcijskih faktorjev jedrnega dejavnika kapa B (NF- κ B) igra pomembno vlogo pri procesih prirojene in pridobljene imunosti, razmnoževanju in razvoju celic kot tudi apoptozi (8). Družino sestavlja pet proteinov, ki lahko med sabo tvorijo različne homo- ali heterodimere (p50, p52, p65, c-Rel in RelB). NF- κ B se običajno v neaktivni obliki nahaja v citoplazmi celic, vezan v kompleks s proteini družine I κ B (I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl-3, p100 in p105), ki imajo vlogo inhibitorjev aktivacije NF- κ B. Da pride do aktivacije NF- κ B mora najprej poteči fosforilacija signalnih molekul I κ B, čemur sledi njihova razgradnja. Pri tem se sprostijo podenote NF- κ B. Pride do translokacije

heterodimera p50/p65 v jedro, čemur sledi začetek prepisovanja različnih genov za proteine, ki sodelujejo pri odzivu celice na dražljaje (9).

Poznani sta dve poti aktivacije NF- κ B in sicer klasična pot ter alternativna pot. Klasično pot aktivacije NF- κ B sproži vezava različnih mediatorjev prirojenega ali pridobljenega imunskega odziva na pripadajoče receptorje. Ob vezavi na receptorje pride do aktivacije I κ B-kinaznega kompleksa. Ta kompleks povzroči fosforilacijo I κ B α in omogoči sprostitvev podenot NF- κ B in njihovo translokacijo v jedro. Alternativna pot aktivacije NF- κ B je pomembna predvsem za razvoj in ohranjanje homeostaze sekundarnih limfoidnih organov ter pri pridobljeni imunosti. Sprožijo jo dejavniki kot so B-celice aktivirajoči dejavnik, limfotoksin β , človeška T-celična levkemija ter Epstein-Barr virus. Poveča se od NF- κ B inducirajoče kinaze in od IKK α (α podenota I κ B-kinaznega kompleksa) odvisno procesiranje proteinov p100 in p52. Ta dva proteina se v sodelovanju s še nekaterimi drugimi, kot npr. RelB, vežeta na DNK. Vsi zgoraj omenjeni dejavniki pa lahko sprožijo tudi aktivacijo NF- κ B preko klasične poti (8).



Slika 4: Shema klasične in alternativne poti aktivacije NF- κ B (10).

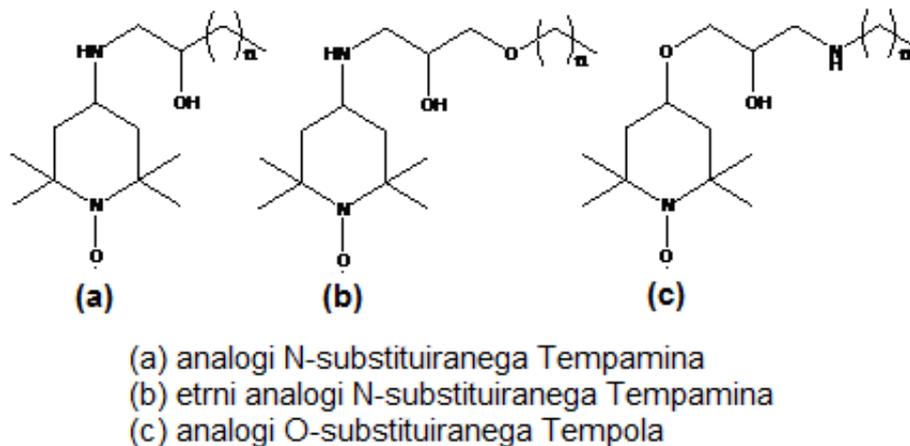
Dražljaji, ki preko zaviranja aktivacije NF- κ B preprečujejo njegovo translokacijo v jedro, posledično zavirajo uravnavanje izražanja genov za citokine, kemokine, adhezivne molekule in inhibitorje apoptoze. Razmerja med signalizacijskimi molekulami, ki sodelujejo pri uravnavanju celičnega preživetja, se lahko ob tem spremenijo do te mere, da pride do prevlade signalizacijskih poti, ki vodijo v apoptotično celično smrt (11, 12).

1.2 SPINSKI OZNAČEVALCI

Spinski označevalci so stabilni radikali, ki imajo v svoji strukturi nesparjen elektron oz. paramagnetni center. Uporabljamo jih za študij dinamičnih in strukturnih lastnosti makromolekul in bioloških membran. Kot spinske označevalce pogosto uporabljamo nitroksidne radikale, saj so zelo stabilni v prisotnosti kisika in pri povišanih temperaturah. Le-ti imajo nitroksidno skupino (NO) z nesparjenim elektronom pretežno v dušikovi π -orbitali, ki je kovalentno povezana preko dušika z vsaj dvema skupinama v štiri-, pet-, šest- ali sedemčlenski obroč. Če sta oba α -C atoma glede na N atom brez protonov, je takšen nitroksid stabilna spojina (13).

1.2.1 AMFIFILNI NITROKSIDNI RADIKALI

Amfifilni nitroksidni radikali (ANR) so spinski označevalci, ki v svoji strukturi vsebujejo NO skupino z nesparjenim elektronom in hidroksietilaminski (HEA) fragment. Na osnovna radikala, Tempamin (4-amino-2,2,6,6-tetrametil-1-oksilpiperidin) in Tempol (4-hidroksi-2,2,6,6-tetrametil-1-oksilpiperidin), so z reakcijo odpiranja epoksidnega obroča pripete različno dolge lipofilne verige. V primeru Tempamina so pripeti epoksidi z različno dolgo alkilno verigo, medtem ko so na Tempol pripeti primarni amini z različnim številom metilenskih skupin, kot je prikazano na sliki 5. Takšni dolgoverižni amino-alkoholni derivati so zaradi svoje amfifilne narave uporabno orodje za proučevanje strukturnih lastnosti membran, zaradi HEA fragmenta pa potencialni induktorji apoptoze (14).



Slika 5: Shematski prikaz amfifilnih nitroksidnih radikalov (14).

Spojine, ki povzročijo apoptozo rakavih celic, predstavljajo pomembno vejo razvoja novih protitumornih zdravilnih učinkovin. Primeri takšnih spojin so diamini in dolgoveržni amino-alkoholi, ki delujejo protivnetno, izkazujejo citotoksičnost do neoplazemskih celic in so, v določenem koncentracijskem območju, sposobni vezave na DNK (15). Spojin, ki v svoji strukturi vsebuje HEA fragment, sproži padec MTP in aktivacijo kaspaze-3, kar vodi v proces apoptoze (16).

NAMEN DELA

Amfifilni nitroksidni radikali (ANR) so analogi Tempamina in Tempola z različno dolgo lipofilno verigo. V svoji strukturi vsebujejo HEA fragment, ki je pri nekaterih rakavih celičnih kulturah odgovoren za sproženje apoptoze.

Namen magistrskega dela je proučiti delovanje ANR, dolgoverižnih amino-alkoholnih derivatov, na različne celične kulture, s pomočjo testov celičnega preživetja. Proučili bomo odnos med strukturo in delovanjem spojin ter selektivnost učinka ANR za posamezne celične kulture.

Hkrati želimo ugotoviti ali uporabljene spojine spodbudijo proces apoptoze celic in katera od kaspaz odvisna pot je vpletena v sproženje apoptoze ter pojasniti sam mehanizem procesa apoptoze.

MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 REAGENTI

Preglednica I: Reagenti in topila, ki smo jih uporabljali pri magistrskem delu ter njihov proizvajalec.

Reagent	Proizvajalec	Reagent	Proizvajalec
Advanced DMEM	Gibco	MitoTracker	Invitrogen
Ac-DEVD-AFC	Bachem	mleko	Pomurske mlekarne
Ac-DNLD-CHO	Bachem	MTS	Promega
akrilamid	Sigma	nigrozin	Sigma
amonijev persulfat	Sigma	PBS	Sigma
Bradfordov reagent	Pierce	penicilin/streptomycin	Euro Clone
bromfenol modro	Merck	propidijev jodid	Invitrogen
Coomassie Brilliant Blue	Fluka	RIPA pufer	pripravimo sami
DMEM	Invitrogen	RPMI	Gibco
DMSO	Gibco-BRL	NaDS	Fluka
DTT	Sigma	Ac-LETD-AFC	Bachem
EDTA	Serva	Ac-LEHD-AFC	Bachem
EDTA-Na ₂	Serva	substrat za HRP	Thermo Scientific
EGF	Sigma	TBS	pripravimo sami
F-12	Gibco	TEMED	Sigma
FBS	HyClone	trypsin	Sigma
glicerol	Fluka	Tris-HCl (pH=6,8)	Riedel-de Haën
H ₂ DCF-DA	Sigma	Tris-HCl (pH=8,8)	pripravimo sami
hidrokortizon	Sigma	Triton X-100	Serva
inzulin	Sigma	TBS-T	pripravimo sami
Komplet reagentov: AnnexinV-FITC/PI	Sigma	Tween 20	Fluka
L-glutamin	Sigma	z-VAD-fmk	Bachem

3.1.2 PROTITELESA IN STANDARDI

Preglednica II: Primarna in sekundarna protitelesa in standardi, ki smo jih uporabljali pri magistrskem delu ter njihov proizvajalec.

Protitelo	Proizvajalec
kozja protitelesa proti kunčjim, označena s HRP	Millipore
kozja protitelesa proti mišjim, označena s HRP	ZYMED [®] Laboratories
kunčja protitelesa specifična za Bcl-2	Cell Signaling
kunčja protitelesa specifična za kaspazo-3	Cell Signaling
kunčja protitelesa specifična za NF- κ B (p50/p105)	Cell Signaling
mišja protitelesa specifična za β -aktin	Sigma
kunčja protitelesa specifična za Bax	Cell Signaling
kunčja protitelesa specifična za fosforilirano I κ B α	Cell Signaling
kunčja protitelesa specifična za I κ B α	Cell Signaling

Standard	Proizvajalec
Albumin standard	Sigma
označevalec velikosti proteinov (See Blue [®] Plus 2 Pre-Stained Standard (1x))	Invitrogen

3.1.3 LABORATORIJSKA OPREMA

Preglednica III: Laboratorijska oprema, ki smo jo uporabljali pri magistrskem delu in njen proizvajalec.

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
aparatura za NaDS PAGE	Bio-Rad Laboratories, Inc.
aparatura za prenos western	Bio-Rad Laboratories
avtomatske pipete	Eppendorf
centrifuga	Eppendorf centrifuge 5804R
centrifuga (biotehnol. lab.)	Eppendorf
CO ₂ inkubator (celični inkubator)	CB 210 BINDER
čitalec mikrotitrskih plošč	Tecan
G-Box	Sygene
gojiščne plastenke	TPP
hladilnik (+ 4 °C)	LTH
inkubator	WTB BINDER
invertni mikroskop	Olympus
kamera z UV-svetilko za snemanje gelov	UVItec
komora z laminarnim pretokom zraka	PIO SMBC 183 AV
mikrotitrške plošče	Corning Costar
mikrotitrške plošče s 96 vdolbinicami	TTP
naprava za sonificiranje	Mikro+polo
plošče s 6 vdolbinicami	TTP
plošče z 12 vdolbinicami	TTP
pretočni citometer	BD Biosciences
PVDF membrana za prenos western	Roth
spektrofotometer	NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer
vibracijsko mešalo	VIBROMIX 104ev, Tehtnica
zamrzovalnik (-80 °C)	Gorenje

3.1.4 GOJIŠČA

Gojišče za celice MCF7, MCF10A in

MCF10A neoT:

- 47,0 mL aDMEM
- 47,0 mL F-12
- 5,0 mL FBS
- 1,0 mL penicilin/streptomicin
- 1,0 mL L-glutamin
- 100,0 µL inzulin
- 50,0 µL hidrokortizon
- 40,0 µL EGF

Gojišče za celice U87:

- 38,0 mL aDMEM
- 10,0 mL FBS
- 1,0 mL penicilin/streptomicin
- 1,0 mL L-glutamin

Gojišče za celice PC3:

- 44,0 mL aDMEM
- 44,0 mL F-12
- 10,0 mL FBS
- 1,0 mL penicilin/streptomicin
- 1,0 mL L-glutamin

Gojišče za celice Jurkat:

- 88,0 mL RPMI
- 10,0 mL FBS
- 1,0 mL penicilin/streptomicin
- 1,0 mL L-glutamin

3.1.5 PUFRI IN RAZTOPINE

Fosfatni pufer z dodatkom NaCl (PBS):

- 1,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
- 0,24 g KH_2PO_4
- 8,0 g NaCl
- 0,2 g KCl

Dopolnimo z dH_2O do 1,0 L in uravnamo pH na 7,4.

Lizirni pufer:

- 200,0 mL fosfatnega pufera (pH=6,0)
- 0,8775 g NaCl
- 500,0 μL Triton X-100
- 1600,0 μL EDTA- Na_2

Lizirni pufer za kaspaze:

- 0,1 % Triton X-100
- 100,0 mM fosfatni pufer (pH=6)
- 1,3 mM EDTA
- 100,0 mM NaCl

RIPA pufer:

- 20,0 mM Tris-HCl (pH=7,5)
- 150,0 mM NaCl
- 1,0 mM EDTA- Na_2
- 1,0 mM EGTA
- 1,0 % NP-40

Nanašalni pufer:

- 1,25 mL 0,5 M Tris-HCl (pH=6,8)
- 1,0 mL glicerol
- 0,2 mL 0,4 % (m/v) bromfenol
- 5,55 mL H_2O

TTBS:

- 250,0 mM Tris baza
- 1370,0 mM NaCl
- 30,0 mM KCl
- 0,1 % Tween 20

Aktivacijski pufer za kaspaze:

- 20,0 mM PIPES (pH=7,2)
- 10,0 % sukroze
- 0,1 % CHAPS
- 1,0 mM EDTA
- 100,0 mM NaCl

10-kratni elektroforezni pufer s pH 8,3:

- 29,0 g Tris baze
- 144,0 g glicina
- 10,0 g NaDS

Dopolnimo z dH_2O do 1,0 L. Pred uporabo pufer redčimo 10-krat z dH_2O .

Pufer za prenos:

- 2,93 g Tris baze
- 5,81 g glicina
- 3,75 mL 10 % (m/v) NaDS
- 200,0 mL metanola

Dopolnimo z dH_2O do 1,0 L.

3.1.6 CELIČNE KULTURE

Pri magistrskem delu smo za večino poskusov uporabili celično kulturo Jurkat. S pomočjo ostalih celičnih kultur, MCF7, MCF10A, MCF10A neoT, U87 in PC3 smo v začetnem delu magistrske naloge proučili selektivnost učinka preiskovanih spojin.

Celična kultura Jurkat:

Celično kulturo Jurkat sestavljajo nesmrtni T limfociti akutne T-celične levkemije. Celice so psevdodiploidne in imajo večinoma 46 kromosomov. Kromosoma X in Y najpogosteje nista poškodovana (17).

Celična kultura MCF7:

Celično kulturo MCF7 predstavljajo adherentne celice, ki izvirajo iz človeškega adenokarcinoma, metastatske oblike raka dojke, ki se lahko razvije po plevralnem izlivu. Celice te celične kulture so ohranile nekaj pomembnih lastnosti, značilnih za epiteljske celice mlečnih žlez, kot je npr. sposobnost predelave estrogena v estradiol preko estrogenskih receptorjev v citoplazmi celic (18).

Celična kultura MCF10A:

Celično kulturo MCF10A sestavljajo adherentne, nesmrtno, netumorigene, nespremenjene epiteljske celice, pridobljene iz človeškega fibrocističnega tkiva mlečnih žlez. Celice imajo diploiden kariotip in so okarakterizirane kot »normalne« epiteljske celice mlečnih žlez. Njihova rast in razmnoževanje sta odvisna od zunanjih ravnih dejavnikov, ki so jim celice izpostavljene (19).

Celična kultura MCF10A neoT:

Celična kultura MCF10A neoT je s c-Ha-ras onkogenom transformirana celična kultura MCF10A, ki kaže fenotipske lastnosti agresivnih rakavih celic dojke (20).

Celična kultura U87:

Celično kulturo U87 predstavljajo adherentne celice primarnega človeškega glioblastoma z epiteljsko morfologijo (21). Glioblastom je najbolj dediferencirana oblika astrocitnega možganskega tumorja, v večini primerov neodzivna na kemoterapijo (22).

Celična kultura PC3:

Gre za celice človeškega raka prostate, ki imajo visok metastatski potencial (23). Celično kulturo so izolirali iz adenokarcinoma prostate 4. stopnje. V celicah ne najdemo kromosoma Y, kar je posledica genetske nestabilnosti rakavih celic (24).

Odmrzovanje celične kulture:

Celice, ki so bile shranjene v tekočem dušiku (-196 °C), smo hitro odtalili na vodni kopeli pri temperaturi 37 °C. Odmrznjene celice smo resuspendirali v 8 mL ustreznega gojišča za posamezno celično kulturo, predhodno ogretega na 37 °C. Suspenzijo celic v gojišču smo centrifugirali 5 min pri 1200 obr/min. Po končanem centrifugiranju smo odlili supernatant in celice ponovno resuspendirali v ustreznem svežem gojišču, ter jih prenesli v gojiščno platenko.

Gojenje celične kulture:

Gojenje celičnih kultur vedno poteka v aseptičnih pogojih. Sterilni morajo biti tudi vsi reagenti ter ves pribor, ki ga uporabljamo pri delu. Plastenke, v katerih gojimo celice, shranjujemo v celičnem inkubatorju pri 37 °C. Atmosfera v inkubatorju mora biti nasičena z vlago in s 5 % CO₂. Da omogočimo vstop zraka v gojiščno platenko, zamaška ne smemo nikoli priviti do konca. Celice prerastejo 70 do 80 % gojiščne platenke v približno 3 do 4 dneh, odvisno od njihove hitrosti deljenja. V izrabljenem gojišču začne primanjkovati hranilnih snovi ter rastnih dejavnikov za celice in v njem se začnejo kopičiti razgradni produkti celic. Da se izognemo odmrtnosti celic, moramo gojišče dovolj pogosto zamenjati – adherentne celice moramo tripsinizirati.

Tripsinizacija:

To storimo tako, da iz gojiščne platenke najprej odstranimo izrabljeno gojišče in celično kulturo speremo z ustrežno količino PBS pufra, odvisno od velikosti gojiščne platenke. Nato na celično kulturo dodamo 0,02 % EDTA v PBS pufri in tripsin (0,05 %). Gojiščno platenko za približno 10 min postavimo v celični inkubator (37 °C), da se celice odlepijo s podlage. Ko se to zgodi, dodamo PBS puffer (količina je odvisna od velikosti gojiščne platenke), da zmanjšamo učinek tripsina. Suspenzijo celic prenesemo v centrifugirko in centrifugiramo 5 min pri 2000 obr/min. Na koncu supernatant zavržemo in celice resuspendiramo v svežem gojišču in jih vrnemo v gojiščno platenko. Ta postopek smo

uporabljali pri delu s celičnimi kulturami MCF7, MCF10A, MCF10A neoT, U87 ter PC3, saj se vse pritrldijo na podlago.

Celične kulture Jurkat ni potrebno tripsinizirati, saj so celice ves čas gojenja suspendirane v gojišču. Le tega zamenjamo tako, da celično suspenzijo prestavimo iz gojiščne platenke v centrifugirko, jo centrifugiramo 5 min pri 2000 obr/min, odlijemo izrabljeno gojišče s celic ter jih resuspendiramo v ustreznem volumnu svežega gojišča.

Štetje celic:

Kadar moramo za uspešno in pravilno izvedbo poskusa poznati število celic, ki jih uporabimo, moramo celice prešteti. To storimo tako, da celice, če je potrebno, po zgoraj opisanem postopku odlepimo od podlage gojiščne platenke in jih homogeno suspendiramo. 50,0 μL celične suspenzije dodamo 50,0 μL 0,2 % nigrozina in dobro premešamo. Nigrozin črno obarva le mrtve celice, ki jih pri štetju ne upoštevamo. Suspenzijo nanesimo na objektno stekelce s števno komoro, pod invertnim mikroskopom preštujemo žive celice in izračunamo število celic v celotnem volumnu celične suspenzije po naslednji enačbi:

$$N = 2 \times N' \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$$

enačba 1

N...število celic v celotnem volumnu celične suspenzije

N'...povprečno število pod mikroskopom prešteti celic

3.2 METODE

3.2.1 SPEKTROFOTOMETRIJA

Spektrofotometrične metode se pogosto uporabljajo za proučevanje parametrov, povezanih s celično smrtjo, kot so porušenje integritete plazemske membrane in aktivnost mitohondrijske dihalne verige. Slednja je dober pokazatelj števila živih celic v primerjavi s številom mrtvih celic. Uporaba kolorimetričnih metod je priporočljiva samo v začetnih fazah raziskovanja celične smrti in potrebna je uporaba ustreznih kontrol (25).

3.2.1.1 Določanje deleža preživelih celic z MTS testom

Delež preživelih celic lahko določamo z ugotavljanjem aktivnosti mitohondrijske dihalne verige. Najpogosteje se za oceno celičnega preživetja uporabljajo tetrazolijeve soli MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid), MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol) in WST-1 (4-[3-(4-jodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonat), ki prehajajo membrano. V celicah jih aktivni mitohondriji metabolizirajo do obarvanih produktov, ki absorbirajo pri določenih valovnih dolžinah (25).

V našem primeru smo za določanje deleža preživelih celic uporabili tetrazolijevo sol druge generacije, MTS. Celice MTS reagent metabolizirajo do netoksičnega, v vodi topnega produkta formazana, ki skozi membrane celic prosto prehaja v gojišče. Delež preživelih celic izračunamo iz absorbanca, ki jih izmerimo pri valovni dolžini 492 nm za vzorce in kontrole.

Izvedba:

Na mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami smo nanesti 100 μL celične suspenzije proučevane celične kulture ($1,5 - 2 \times 10^4/100 \mu\text{L}$) v ustreznem gojišču. Ploščo smo čez noč inkubirali v celičnem inkubatorju pri 37 °C, da so se celice pritrdile na dno vdolbinic.

V primeru suspenzijske celične kulture Jurkat inkubacija čez noč ni bila potrebna. Na ploščo smo nanesti 50 μL celične suspenzije ($4 \times 10^4/50 \mu\text{L}$). Nato smo v vsako vdolbinico dodali 50 μL v naprej pripravljene raztopine zelene spojine (ANR ali njihovih aminoalkoholnih fragmentov – glej preglednico V na strani 31) v koncentraciji, ki je bila 2-krat višja od končne.

Pri adherentnih celicah smo naslednji dan s celic previdno odstranili izrabljeno gojišče in nanje nanесли 100 μL /vdolbinico v naprej pripravljenih proučevanih ANR ali njihovih amino-alkoholnih fragmentov v svežem gojišču. Po 24 h inkubacije celične kulture z ANR ali njihovimi amino-alkoholnimi fragmenti različnih koncentracij, v prisotnosti ali brez prisotnosti inhibitorja kaspaz z-VAD-fmk (10 μM), smo dodali v vsako vdolbinico mikrotitrne plošče 10 μL MTS reagenta in po nadaljnjih 1-2 h inkubacije izmerili absorbance pri valovni dolžini 492 nm. Iz dobljenih rezultatov smo izračunali delež preživelih celic glede na kontrolne celice tretirane z DMSO.

3.2.1.2 Merjenje aktivnosti kaspaz

Aktivnost kaspaz smo merili s pomočjo spektrofotometrije. Metoda temelji na reakciji kaspaz s substratom, specifičnim za posamezno kaspazo. Specifični substrati za merjenje aktivnosti kaspaz so, za kaspazo-3 Ac-DEVD-AFC, za kaspazo-8 Ac-LETD-AFC in za kaspazo-9 Ac-LEHD-AFC. Znotraj aminokislinskega zaporedja vsebuje Ac-DEVD-AFC sekvenco DEVD (Asp-Glu-Val-Asp), Ac-LETD-AFC sekvenco LETD (Leu-Glu-Thr-Asp) in Ac-LEHD-AFC sekvenco LEHD (Leu-Glu-His-Asp). To so aminokislinska zaporedja, ki jih specifično prepoznajo kaspaza-3, kaspaza-8 in kaspaza-9 in substrat na tem mestu razcepijo. Pri tem se sprosti fluorogeni AFC, katerega fluorescenco merimo (26).

Kadar želimo primerjati stopnjo aktivnosti kaspaz med različnimi vzorci, moramo zagotoviti enako celokupno koncentracijo proteinov v vseh med seboj primerjanih vzorcih. V nasprotnem primeru rezultati med različnimi vzorci niso primerljivi, saj lahko pride do razlik na račun različne celokupne koncentracije proteinov v vzorcih. Koncentracijo proteinov v posameznem vzorcu smo izmerili s pomočjo metode po Bradfordu.

Izvedba priprave lizatov:

Suspenzijo celic (1×10^6 celic/2 mL gojišča), ki smo jih predhodno tretirali (12 h) z želeno spojino (z DMSO, s spojino **5**, **11** ali **12**) v različnih koncentracijah (5 μM , 10 μM ali 25 μM), smo prenesli v centrifugirko in jo centrifugirali 5 min pri 2000 obr/min. Nato smo celice sprali s PBS pufrom (1 mL), jih ponovno centrifugirali pri 2000 obr/min in resuspendirali v lizirnem pufu za kaspaze (100 - 150 μL) ter pustili vzorce na ledu 30 min. Da smo dodatno uničili celične membrane in omogočili sprostitvev celične vsebine v raztopino, smo celično suspenzijo sonicirali (2 x 8 s) in jo postavili na $-80\text{ }^\circ\text{C}$ za najmanj

60 min. Lizate celic smo nato centrifugirali 15 min pri 14000 g, pri 4 °C. Pelete celičnih ostankov smo po centrifugiranju zavrgli, supernatant pa obdržali in izmerili koncentracijo proteinov v posameznem vzorcu.

Izvedba aktivacije kaspaz:

Količino proteinov v vzorcih smo normalizirali z lizirnim pufrom za kaspaze tako, da je bila končna koncentracija proteinov v vzorcih 20 µg/50 µL. Na črno mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami smo nanesti 50 µL aktivacijskega pufrja za kaspaze z ditiotreitolum (DTT, 20 µL/mL) v vsako vdolbinico in temu dodali 50 µL vzorca proteinov znane koncentracije. Tako pripravljeno ploščo smo inkubirali 30 min pri 37 °C. Po končani inkubaciji smo nanesti v vsako vdolbinico 10 µL za posamezno kaspazo specifičnega substrata (za kaspazo-3 je to Ac-DEVD-AFC), s koncentracijo 1 mM in takoj začeli z merjenjem fluorescence pri valovnih dolžinah ekscitacije 405 nm in emisije 535 nm. Fluorescenco smo merili kontinuirano 30 min v intervalih dolgih 1 min. Pridobljene rezultate smo podali kot naklon linearnega dela krivulje (porast fluorescence) v odvisnosti od časa za vsak preiskovani vzorec.

3.2.1.3 Določanje koncentracije proteinov po Bradfordu

Temelj metode po Bradfordu je reakcija barvila Coomassie Brilliant Blue s proteini v vzorcu. Barvilo je v raztopini v anionski obliki in lahko s proteini tvori elektrostatske ali hidrofobne povezave. Nastane obarvan produkt, ki ima absorpcijski maksimum pri 595 nm. Ker je metoda relativna, potrebujemo umeritveno krivuljo, ki jo izdelamo na podlagi standardnih raztopin naraščajočih koncentracij. Za standard največkrat uporabimo goveji serumski albumin (BSA, »ang. bovine serum albumine«). Koncentracijo proteinov v vzorcu lahko odčitamo iz umeritvene krivulje, saj je absorbanca raztopine v območju nizkih koncentracij proteinov (2 - 120 µg/mL) linearno odvisna od koncentracije proteinov v vzorcu (27, 28).

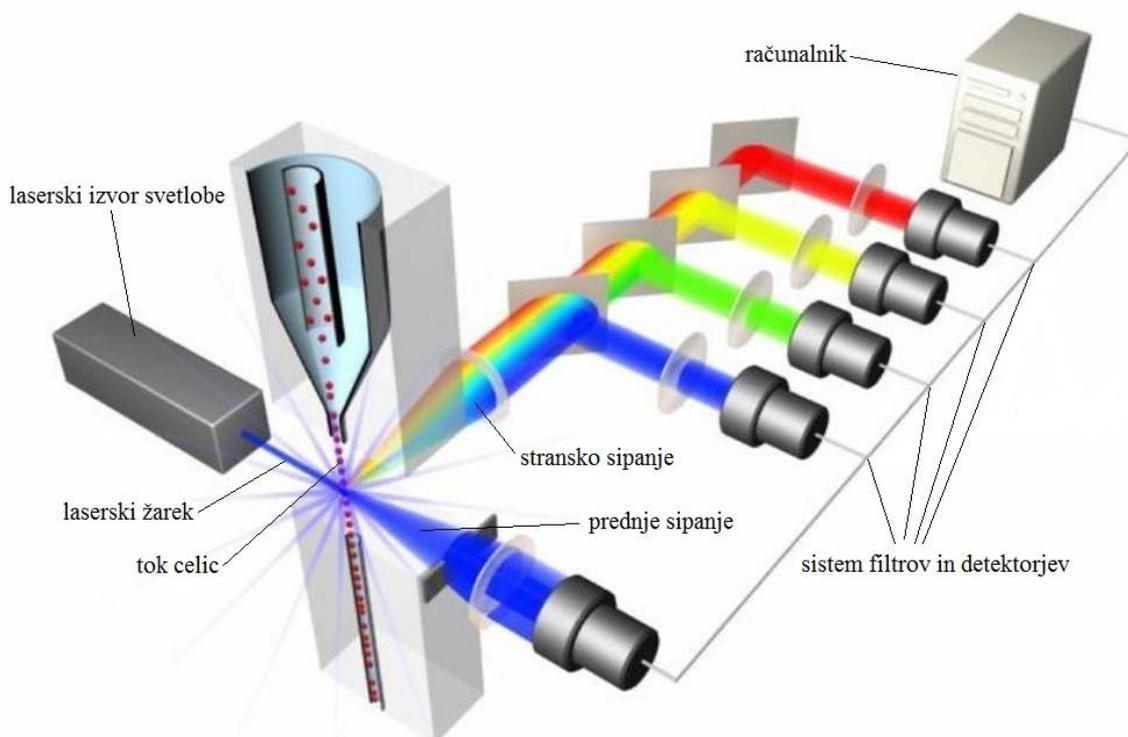
Izvedba:

Pred določanjem koncentracije proteinov v vzorcih smo morali vzorce lizirati po zgoraj opisanem postopku. Tako smo omogočili sprostitvev proteinov iz celic. Pripravili smo standardne raztopine BSA v koncentracijah od 0 do 1,5 mg/mL. V prve vdolbinice mikrotitrsko plošče smo nanesti po 5 µL standardnih raztopin, v naslednje vdolbinice pa po

5 μL vsakega vzorca. Nato smo v vsako vdolbinico mikrotitrne plošče odpipetirali po 200 μL Bradfordovega reagenta in ploščo inkubirali 10 min pri sobni temperaturi, zaščiteno pred svetlobo. S spektrofotometrom smo pomerili absorbance pri 595 nm. Vrednosti standardov so nam služile za izris umeritvene krivulje, s pomočjo katere smo kasneje izračunali koncentracije proteinov v posameznih vzorcih.

3.2.2 PRETOČNA CITOMETRIJA

Za izvedbo metode potrebujemo suspenzijo celic. Celice tečejo ena za drugo skozi kapilaro v pretočni citometer, pri čemer v določeni točki prečkajo laserski žarek. Metoda omogoča karakterizacijo in merjenje lastnosti celic in celičnih komponent. Poleg morfoloških karakteristik celic lahko analiziramo tudi njihove funkcionalne lastnosti. Informacijo o velikosti in granularnosti posamezne celice pridobimo z merjenjem sipanja svetlobe ob prehodu celice preko laserskega žarka. Kadar želimo pridobiti informacije o različnih celičnih označevalcih, merimo njihovo specifično fluorescenco. Ta je posledica na celične označevalce vezanih specifičnih protiteles, ki so označena z različnimi fluorokromi (29).



Slika 6: Shema pretočnega citometra (30).

3.2.2.1 Analiza celičnega cikla

Celični cikel predstavlja sosledje dogodkov, ki omogočijo razmnoževanje evkariontskih celic. Povezavo celičnega cikla s procesom apoptoze predstavlja podobnost morfoloških značilnosti delečih se celic in apoptotičnih celic. Tekom obeh procesov postanejo celice bolj okrogle, se skrčijo, pride do kondenzacije kromatina in do nabrekanja membran. Obstajajo pa tudi pomembne razlike, na podlagi katerih lahko razločujemo deleče se celice od apoptotičnih celic. Pri apoptozi celic pride do degradacije DNK v 180 baznih parov dolge fragmente, ki se oblikujejo v »nukleosomsko lestev«. Membranski proteini apoptotičnih celic se prečno povežejo in tako povečajo rigidnost membrane. Ostanke odmrlih celic fagocitirajo sosednje celice in makrofagi. Pri delečih se celicah pride do segregacije DNK in delitve celice na dve hčerinski celici (31).

Z metodo analize celičnega cikla s pretočno citometrijo si lahko pomagamo pri določanju prisotnosti apoptotičnih celic v preiskovanih vzorcih.

Izvedba:

Celice Jurkat ($1 - 2 \times 10^5$ celic/mL) smo tretirali s spojino **5** ($25 \mu\text{M}$) 0, 3, 6, 8 in 12 h. Po končani inkubaciji smo suspenzijo celic centrifugirali 5 min pri 1200 obr/min, odpipetirali supernatant in sprali s hladnim PBS pufrom. Celice smo po ponovnem centrifugiranju (1200 obr/min, 5 min) resuspendirali v $200 \mu\text{L}$ PBS pufru ter dobro premešali. Celično suspenzijo smo počasi dodali v 3 mL ledeno hladnega 80 % etanola in jo shranili na -20°C , čez noč. Po fiksaciji smo celice centrifugirali (1800 obr/min, 5 min), resuspendirali v $500 \mu\text{L}$ PBS pufru ter inkubirali z RNA-zo (1 mg/mL) in propidijevim jodidom (PI, $40 \mu\text{g/mL}$) 30 min pri 37°C , zaščiteno pred svetlobo. Intenziteto fluorescence PI smo ovrednotili s pretočnim citometrom FACS Calibur. Profil celičnega cikla smo analizirali s programsko opremo FlowJo.

3.2.2.2 Določanje deleža apoptotičnih celic

Delež apoptotičnih celic v vzorcih lahko določamo s pomočjo komercialno dostopnih kompletov reagentov. Primera reagentov, ki jih lahko uporabimo, sta Aneksin V-FITC (Aneksin V, konjugiran s fluorescenčnim barvilom fluorescein izotiocianatom (FITC)) in propidijev jodid (PI). Aneksin V-FITC se veže na molekule fosfatidilserina na površini membrane apoptotičnih celic. Na površini membrane celic, v katerih ne poteka mehanizem apoptoze, se molekule fosfatidilserina ne izrazijo, saj se le-te nahajajo na notranji površini

celične membrane. PI se vgradi samo v DNK mrtvih celic in tako omogoča določanje njihovega deleža. Uporaba obeh reagentov v kombinaciji nam omogoča določitev deleža živih celic, apoptotičnih celic in mrtvih celic (32, 33).

Izvedba:

Celice Jurkat ($1 - 2 \times 10^5$ celic/mL) smo inkubirali s spojino **4** (25 μ M), spojino **5** (25 μ M), Tempolom (25 μ M) in DMSO (25 μ M) v prisotnosti oz. odsotnosti 10 μ M inhibitorja kaspaz z-VAD-fmk (karbobenzoksil-valil-alanil-aspartil-(O-metil)-fluorometilketona). Po 16 h inkubacije, smo celice prešteli in jih približno 2×10^5 prenesli v centrifugirke za pretočno citometrijo. Nato smo celice sprali z 2 mL PBS pufru in jih centrifugirali 5 min pri 2000 obr/min. Ko smo odlili supernatant smo celice resuspendirali v 350 mL 1 x vezalnega pufru, dodali 3,5 μ L Aneksina V-FITC in 7,0 μ L PI. Vzorce smo nato inkubirali 10 min pri sobni temperaturi, zaščitene pred svetlobo. Fluorescenco smo pomerili s pretočnim citometrom in iz pridobljenih rezultatov izračunali delež apoptotičnih celic v posameznem vzorcu. Rezultate smo primerjali z rezultati vzorcev celic tretiranih z DMSO (25 μ M) in celic tretiranih s Tempolom (25 μ M).

Enak poskus smo z namenom razjasnitve razmerja med strukturo in delovanjem spojin izvedli še s spojino **5** (10 μ M) ter s spojino **12** (10 μ M), ki je amino-alkoholni fragment spojine **5**. Za kontrolni vzorec smo tudi v tem primeru imeli celice Jurkat inkubirane z DMSO (10 μ M).

3.2.2.3 Merjenje znotrajcelične količine reaktivnih kisikovih spojin (ROS)

Eden od procesov, ki kažejo na to, da se v celici odvija proces apoptoze, je tvorba ROS. Količino nastalih ROS lahko merimo s pretočnim citometrom ob uporabi sonde 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetata (H₂DCF-DA). V prisotnosti H₂O₂ sonda oksidira. H₂DCF-DA je nefluorescenčna spojina, ki prehaja celično membrano. Po vstopu v celico jo endogene esterase metabolizirajo do 2',7'-diklorodihidrofluoresceina, za katerega celična membrana ni prepustna. Pri oksidaciji nastane fluorescenčni produkt 2',7'-diklorofluorescein, ki prav tako ne prehaja skozi celično membrano. Celice, ki fluorescirajo, opazujemo z uporabo pretočnega citometra (34, 35).

Izvedba:

Celično kulturo Jurkat smo nagojili na ploščo z 12 vdolbinicami (4×10^5 /mL). Celice smo najprej predtretirali z inhibitorjem kaspaz z-VAD-fmk ($10 \mu\text{M}$) 30 min in nato inkubirali s spojino **5** ($25 \mu\text{M}$) 0, 3, 6 in 8 h. Po končani inkubaciji smo celice 2 x sprali z 1 mL PBS pufra. Po vsakem spiranju smo vzorce centrifugirali 5 min pri 2000 obr/min. Supernatant smo zavrgli in peletam celic dodali po 500 μL sonde $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ($10 \mu\text{M}$) v RPMI gojišču. Celice smo resuspendirali in inkubirali 30 min pri 37°C . Po končani inkubaciji smo celice ponovno dvakrat sprali z 1 mL PBS pufra in jih centrifugirali 5 min pri 2000 obr/min. Supernatant smo ponovno zavrgli in celice resuspendirali v PBS pufu. Fluorescenco smo izmerili s pomočjo pretočnega citometra.

3.2.2.4 Merjenje mitohondrijskega transmembranskega potenciala (MTP)

Spremenjena mitohondrijska funkcija je povezana z mehanizmom apoptoze. Zaradi okvarjenega delovanja mitohondrijev pride do padca MTP. Metoda merjenja MTP temelji na določanju deleža v celici aktivnih mitohondrijev. V celično suspenzijo predhodno tretiranih celic dodamo nefluorescenčno barvilo MitoTracker, ki z difuzijo prehaja celične membrane in se akumulira v mitohondrijih. Barvilo v aktivnih mitohondrijih oksidira do nefluorescenčnega kationskega produkta, ki s tiolnimi spojinami tvori fluorescenčni konjugat. Fluorescenco celic izmerimo s pretočnim citometrom (36).

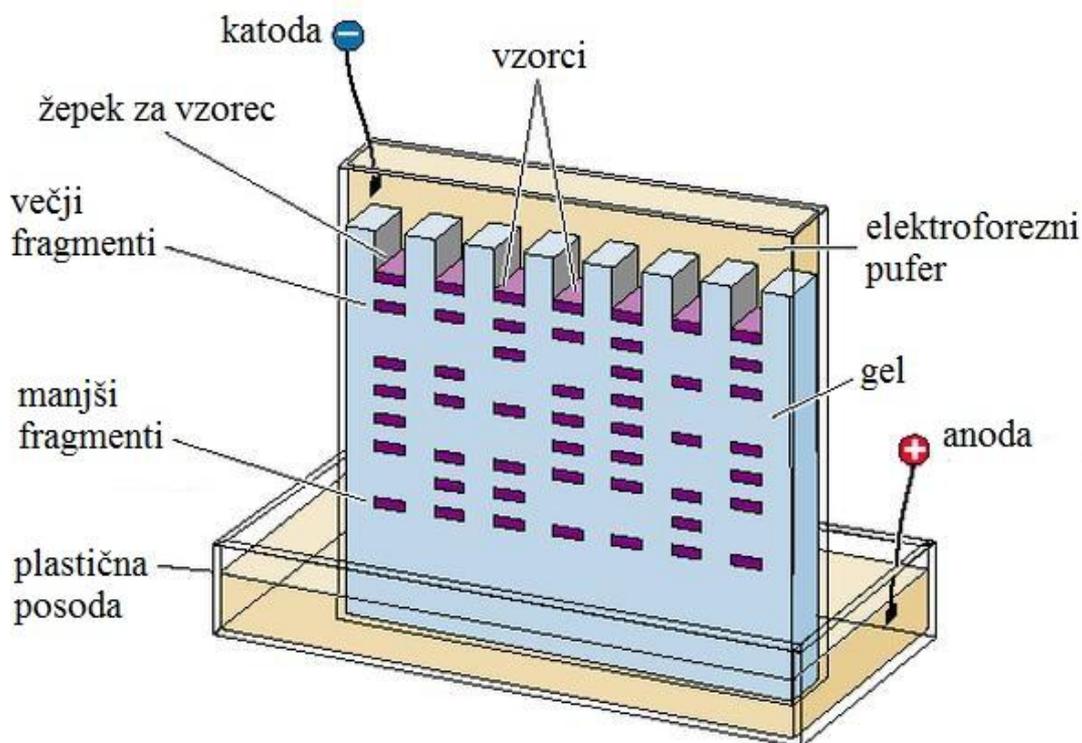
Izvedba:

Celice Jurkat smo nagojili na ploščo z 12 vdolbinicami (4×10^5 celic/mL). Celice smo 30 min predtretirali z inhibitorjem kaspaz z-VAD-fmk ($10 \mu\text{M}$) in nato inkubirali s spojino **5** ($25 \mu\text{M}$) 0, 1, 3 in 6 h. Po končani inkubaciji smo celice dvakrat sprali z 1 mL PBS pufra. Nato smo celice centrifugirali 5 min pri 2000 obr/min. Supernatant smo zavrgli in na pelete celic dodali po 500 μL barvila MitoTracker (300 nM) na centrifugirko. Celice smo resuspendirali in inkubirali 30 min pri 37°C . Po končani inkubaciji smo celice ponovno sprali z 2 mL PBS pufra in jih centrifugirali 5 min pri 2000 obr/min. Supernatant smo zavrgli in celice resuspendirali v PBS pufu. Intenziteto fluorescence smo izmerili s pomočjo pretočnega citometra.

3.2.3 POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA V PRISOTNOSTI NATRIJEVEGA DODECIL SULFATA (NaDS PAGE)

Elektroforeza spada med separacijske metode. Nabiti delci v električnem polju potujejo proti nasprotno nabiti elektrodi. Parametri, ki vplivajo na hitrost potovanja delcev, so velikost in oblika molekule ter celokupni naboj molekule (27).

NaDS PAGE se pogosto uporablja za analizo proteinov in peptidov. Natrijev dodecilsulfat (NaDS) je negativno nabita površinsko aktivna molekula, ki se nespecifično veže na vse proteine. Pri tem povzroči njihovo denaturacijo. Vsi kompleksi protein-NaDS imajo negativen naboj, zato v električnem polju potujejo proti pozitivno nabiti anodi. Hitrost potovanja takih kompleksov je odvisna izključno od velikosti proteinov. Večji kot je protein, počasneje bo potoval, saj je upor nosilca nanj velik (27).



Slika 7: Shema sistema za izvedbo elektroforeze (37).

Elektroforeza v prisotnosti NaDS poteka v gelu. Matriks gela nastane s polimerizacijo akrilamida in N,N'-metilenbisakrilamida v prisotnosti radikalov in stabilizatorja N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED-a). Kot vir radikalov se pogosto uporablja amonijev persulfat. NaDS PAGE poteka v vertikalnem diskontinuiranem sistemu, sestavljenem iz zgornjega koncentracijskega ter spodnjega separacijskega gela. Koncentracijski gel je manj

zamrežen od separacijskega in molekul ne ovira pri potovanju. Tako omogoča, da se proteini pred začetkom potovanja po separacijskem gelu skoncentrirajo v čim ožjo črto. Preprečuje nastanek razpotegnjenih in nejasno ločenih lis. Separacijski gel je bolj zamrežen od koncentracijskega in omogoča ločevanje molekul glede na velikost (27).

Vzorcem, ki jih bomo analizirali, dodamo glicerol (za lepše usedanje), barvilo bromfenol modro (za sledenje elektroforezne fronte) ter DTT (reducent, ki prekine disulfidne vezi v vzorcu). Sledi nanos vzorcev v žepke na vrhu gela in priključitev sistema na ustrezno napetost, da začne potekati elektroforezna ločba (27).

Detekcijo proteinov po elektroforezni ločbi lahko izvedemo na več načinov. V našem primeru smo za detekcijo ločenih proteinov izbrali prenos western.

Izvedba:

Priprava gelov:

Preden smo začeli s samo pripravo gelov, smo sestavili aparaturo za vlivanje gelov. V okvir smo vstavili stekelci, med kateri bomo vlili gela in vse skupaj postavili v stojalo za polimerizacijo. Aparaturo smo postavili na ravno površino. Nato smo pripravili 12 % separacijski gel kot je naveden v preglednici IV in ga takoj po dodatku 10 % amonijevega persulfata in TEMED-a 3,3 mL vlili med stekelca. Na separacijski gel smo, preden se je začel strjevati, nalili še 1 mL z vodo nasičenega butanola, da smo izravnali gladino gela. Ko se je gel strdil, smo butanol odlili, gel sprali z vodo in previdno popivnali s filter papirjem.

Preglednica IV: Sestava gelov za izvedbo NaDS PAGE

12 % SEPARACIJSKI GEL (4,0 mL)		5 % KONCENTRACIJSKI GEL (1,5 mL)	
40,0 % akrilamid	1,2 mL	40,0 % akrilamid	188 µL
1,5 M Tris-HCl (pH=8,8)	1,0 mL	1,5 M Tris-HCl (pH=6,8)	195 µL
H ₂ O	1,7 mL	H ₂ O	1,0 mL
10,0 % NaDS	50,0 µL	10,0 % NaDS	15,0 µL
10,0 % amonijev persulfat*	50,0 µL	10,0 % amonijev persulfat*	15,0 µL
TEMED*	1,7 µL	TEMED*	1,5 µL

*.....dodamo tik pred vlivanjem gela

Postopek smo nadaljevali s pripravo 5 % koncentracijskega gela kot je navedeno v preglednici IV. Tudi slednjega smo takoj po dodatku 10 % amonijevega persulfata in TEMED-a vlili med stekelca na vrh separacijskega gela. Takoj smo vstavili glavniček, ki omogoči oblikovanje žepkov za vzorce in gel pustili, da se strdi.

Priprava vzorcev:

Celice Jurkat (1×10^6 celic/mL) smo tretirali s spojino **5** (25 μ M ali 10 μ M) in s spojino **5** (25 μ M) ob prisotnosti inhibitorjev z-VAD-fmk (10 μ M) in Ac-DNLD-CHO (acetil-L-aspartil-L-asparaginil-L-leucil-L-aspart-1-ala, 10 μ M). Lizate smo pripravili po 0, 1, 3, 6 in 12 h. Z metodo po Bradfordu smo izmerili koncentracijo proteinov v vsakem vzorcu. Vzorce smo nato redčili s pufrom za radio-imunoprecipitacijski test (RIPA pufrom) tako, da je bila koncentracija proteinov po redčenju 1 μ g/mL. Po 20 μ L vsakega od vzorcev smo odpipetirali v nove epice in v vsako epico dodali še 16 μ L 2 x nanašalnega puфра in 8 μ L 1 M DTT. Sledila je 5 min inkubacija vzorcev na vodni kopeli pri 100 °C.

Elektroforeza:

Pripravljen gel smo prenesli v aparaturo za elektroforezo (gel smo pustili med stekelcema). Aparaturo smo napolnili z elektroforeznim pufrom (pH=8,3). V prvi žepk gela smo nanegli 10 μ L označevalca velikosti proteinov, v ostale pa po 25 μ L vzorcev. Gel smo razvijali približno 2 h pri konstantni napetosti 100 V. Po končani ločbi smo aparaturo razdrli in gel prenesli v predhodno pripravljeno aparaturo za prenos western.

3.2.4 PRENOS WESTERN

Prenos western je metoda za specifično detekcijo proteinov. Za določevanje posameznih proteinov uporabljamo specifična protitelesa. Velike molekule, kot so protitelesa, težko potujejo skozi gel. V ta namen moramo proteine iz gela prenesti na nitrocelulozno ali najlonsko membrano. Prenos western je lahko kapilaren ali elektroforezen. Navadno za detekcijo proteina na membrani uporabljamo primarna protitelesa, ki so specifično usmerjena proti proteinu. Na primarna protitelesa pa vežemo sekundarna protitelesa, specifična proti primarnim protitelesom, označena s kromogenom ali encimom (27).

Izvedba:

Po končani elektroforezi smo si najprej pripravili aparaturo za izvedbo prenosa western, kot kaže slika 8. Aparaturo smo sestavili tako, da smo na plastičen nosilec, pomočen v pufer za prenos, namestili gobico. Gobico smo predhodno dobro prepojili s pufrom za prenos, da smo izgnali iz nje zračne mehurčke, ki bi motili potek prenosa proteinov. Izrezali smo filter papir in nitrocelulozno membrano v velikosti gela za elektroforezo. Filter papir smo namočili v pufer za prenos in ga namestili na gobico. Nanj smo položili nitrocelulozno membrano, ki smo jo predhodno 5 min aktivirali v metanolu. Z glajenjem smo odstranili zračne mehurčke, ki so nastali med filter papirjem in membrano. Gel z ločenimi proteini smo omočili s pufrom za prenos in ga položili na nitrocelulozno membrano. Nato smo na gel namestili še eno plast filter papirja in omočeno gobico. Na koncu smo namestili še drugi del plastičnega nosilca in aparaturo priključili na napetost. Prenos je potekal 1,5 h pri konstantni napetosti 100 V.



Slika 8: Sestava aparature za prenos western.

Po končanem prenosu smo membrano spirali s pufrom 1 x TBS z dodatkom 0,1 % Tween 20 (TBS-T) in zatem 1 h blokirali v 5 % mleku ob rahlem mešanju. Po končanem blokiranju smo membrano spirali 3 x po 5 min s pufrom TBS-T. Sledila je inkubacija membrane v raztopini primarnih kunčjih protiteles specifičnih za kaspazo-3 (1000-kratno redčenje v 5 % mleku v TBS-T), fosforilirano obliko p105 (2000-kratno redčenje v 53 % BSA v TBS-T), p50/p105 (1000-kratno redčenje v 3 % BSA v TBS-T), Bax (1000-kratno redčenje v 3 % BSA v TBS-T), Bcl-2 (1000-kratno redčenje v 3 % BSA v TBS-T), I κ B α (1000-kratno redčenje v 3 % BSA v TBS-T) in fosforilirani obliki I κ B α (1000-kratno redčenje v 3 % BSA v TBS-T). Inkubacija je potekala čez noč pri 4 °C ob rahlem stresanju. Naslednji dan smo membrano spirali 6 x po 10 min s pufrom TBS-T in jo nato inkubirali 1 h pri sobni temperaturi ob rahlem stresanju v raztopini sekundarnih protikunčjih protiteles označenih s hrenovo peroksidazo (HRP). Sledilo je spiranje membrane 5

x po 5 min s pufrom TBS-T. Po končanem spiranju smo membrano inkubirali s substratom za HRP 5 min pri sobni temperaturi, zaščiteno pred svetlobo. Odziv na membrani smo posneli z uporabo aparature G-Box. Po končani meritvi smo membrano najprej 30 min spirali s pufrom TBS-T in nato 1 h inkubirali v pufu za »stripping«, s katerim odcepimo protitelesa s proteinov na membrani, pri 60 °C. Po končani inkubaciji je sledilo 2 x po 20 min spiranja membrane s pufrom TBS-T. Nato smo membrano ob rahlem stresanju zopet 30 min blokirali v 5 % mleku v TBS-T in nato spirali 3 x po 5 min s pufrom TBS-T. Enakomernost nanosa vzorcev na gel smo preverili tako, da smo membrano čez noč inkubirali v raztopini primarnih mišjih protiteles specifičnih za β -aktin (500-kratno redčenje v 3 % BSA v TBS-T) pri 4 °C ob rahlem stresanju. Naslednji dan smo membrano spirali 6 x po 10 min s pufrom TBS-T. Sledila je 1 h inkubacija s sekundarnimi kozjimi proti-mišjimi protitelesi označenimi s HRP (2500-krat redčenih v 5 % mleku v TBS-T) pri sobni temperaturi ob rahlem stresanju. Sekundarna protitelesa smo z membrane spirali 5 x po 5 min s pufrom TBS-T in zatem membrano inkubirali s substratom za HRP, 5 min pri sobni temperaturi, zaščiteno pred svetlobo. Nato smo posneli odziv na membrani z uporabo aparature G-Box.

3.2.5 STATISTIČNO OVREDNOTENJE REZULTATOV

Rezultati, ki smo jih statistično ovrednotili, so prikazani kot povprečna vrednost več (n) neodvisnih meritev \pm standardna deviacija. Razlike med vzorci smo analizirali z uporabo t-testa dveh neodvisnih vzorcev ob upoštevanju predpostavke o enakosti varianc. Izračunali smo p vrednosti in razliko med vzorci označili kot statistično značilno (označeno z zvezdico), če je bila vrednost $p < 0,05$. Analiza je bila izvedena s pomočjo programske opreme Microsoft Excell 2007.

REZULTATI

4.1 DOLOČANJE TOKSIČNOSTI ANR ZA CELICE

Učinek ANR na celično preživetje smo opazovali na različnih celičnih kulturah in sicer na celicah Jurkat, U87, PC3, MCF7, MCF10A in MCF10A neoT in pri tem uporabili MTS reagent. Celice smo nagajili na mikrotitrski plošče s 96 vdolbinicami in jih tretirali z izhodnima spojinama (Tempolom in Tempaminom) ter naborom spojin ANR (spojine **1** – **9**) in njihovih amino-alkoholnih fragmentov (spojine **10** – **17**), ki so predstavljene v preglednici V. Vpliv spojin **1** - **17** na celično preživetje smo proučevali v odvisnosti od koncentracije spojin in časa tretiranja.

Preglednica V: Amfifilni nitroksidni radikali, ki izhajajo iz Tempola in njihovi amino-alkoholni fragmenti.

Oznaka spojine	Število metilenskih skupin [n]	Struktura spojine
Tempamin	n = 0	
Tempol	n = 0	
Spojina 1	n = 7	
Spojina 2	n = 9	
Spojina 3	n = 11	

Nadaljevanje preglednice V: Amfifilni nitroksidni radikali, ki izhajajo iz Tempola in njihovi amino-alkoholni fragmenti.

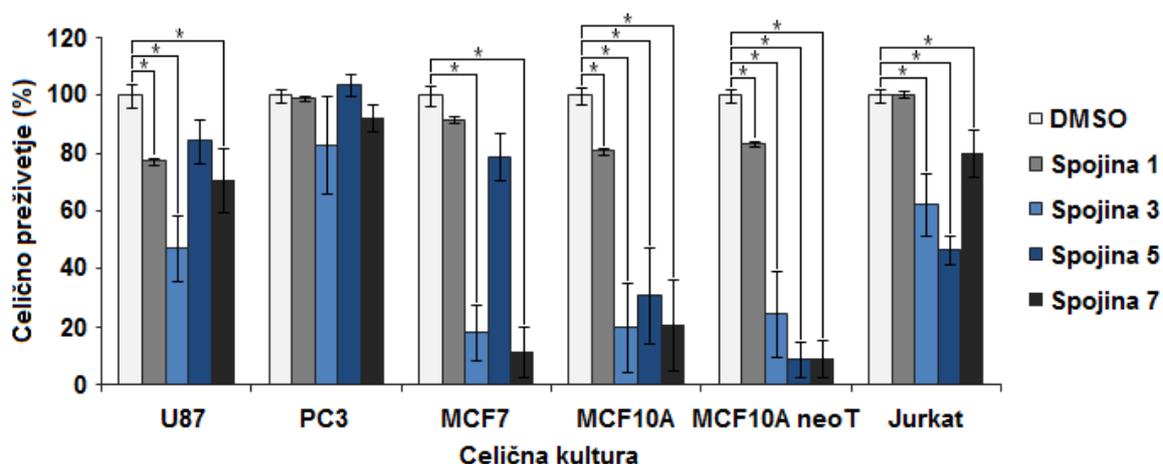
Spojina <u>4</u>	n = 12	
Spojina <u>5</u>	n = 13	
Spojina <u>6</u>	n = 14	
Spojina <u>7</u>	n = 15	
Spojina <u>8</u>	n = 17	
Spojina <u>9</u>	n = 2 x 7	
Spojina <u>10</u>	n = 11	
Spojina <u>11</u>	n = 12	
Spojina <u>12</u>	n = 13	
Spojina <u>13</u>	n = 7	

Nadaljevanje preglednice V: Amfifilni nitroksidni radikali, ki izhajajo iz Tempola in njihovi amino-alkoholni fragmenti.

Spojina <u>14</u>	n = 9	
Spojina <u>15</u>	n = 14	
Spojina <u>16</u>	n = 15	
Spojina <u>17</u>	n = 17	

4.1.1 SELEKTIVNA TOKSIČNOST ANR IN NJIHOVIH AMINO-ALKOHOLNIH FRAGMENTOV

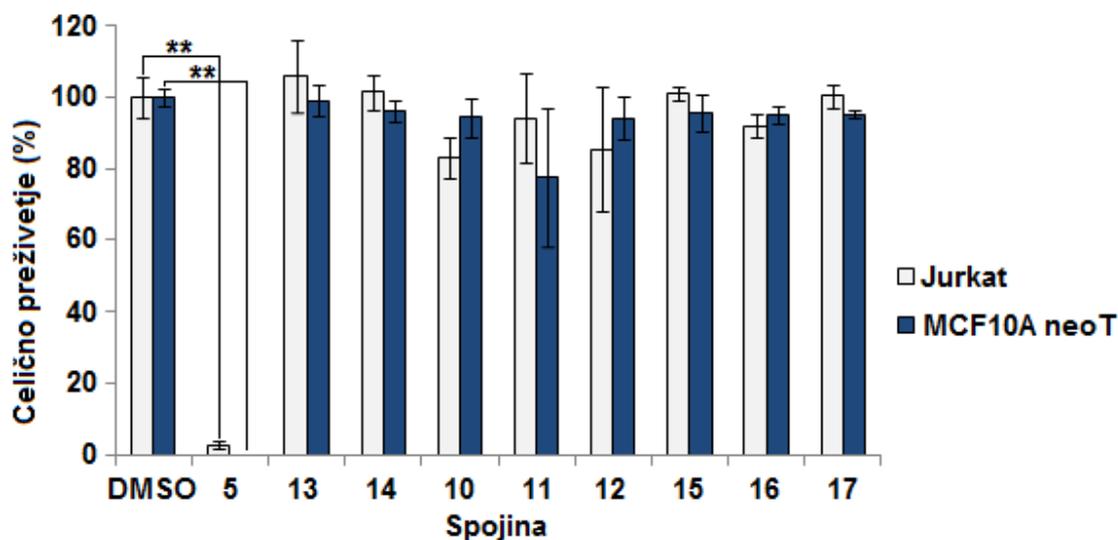
Toksičnost ANR smo sprva preverili na celičnih kulturah z različnimi lastnostmi in izvorom. Celične kulture U87, PC3, MCF7, MCF10A, MCF10A neoT in Jurkat, smo tretirali s spojinami **1**, **3**, **5** in **7** pri 50 μ M koncentraciji. Po 24 h smo preverili celično preživetje s pomočjo MTS reagenta. Absorbance vzorcev smo izmerili s pomočjo čitalca mikrotitrskih plošč in izračunali deleže preživelih celic v posameznih vzorcih. Kontrolo so predstavljale celice, tretirane z DMSO (50 μ M). Izvedli smo tri neodvisne poskuse v štirih paralelkah in rezultati, ki jih prikazuje slika 9, so podani kot povprečje \pm standardna deviacija .



Slika 9: Toksičnost ANR za različne celične kulture po 24 urni inkubaciji. Rezultat je predstavljen kot povprečje \pm standardna deviacija (n=12). *p<0,05

Uporabljene spojine izkazujejo največjo toksičnost za celične kulture MCF7, MCF10A in MCF10A neoT ter nekoliko manjšo za kulturi U87 in Jurkat, medtem ko citotoksični učinek spojin ni bil opazen na celični kulturi PC3. Sklepali smo, da so različne stopnje citotoksičnosti spojin za različne celične kulture posledica razlik v mehanizmu citotoksičnega delovanja spojin na posamezno celično kulturo. Da smo prilagodili obseg poskusov smo v naslednji fazi poskuse izvajali samo na celičnih kulturah Jurkat in MCF10A neoT. Na teh dveh celičnih kulturah smo preizkušali toksičnost amino-alkoholnih fragmentov, in sicer spojini **10** – **17**, v primerjavi s spojino **5** v 25 μ M koncentraciji po 24 h inkubaciji. Kot kontrolo smo uporabili 25 μ M DMSO. Kot prikazuje

slika 10 je spojina **5**, ki ima HEA fragment pripet na spinski označevalec, statistično značilno toksična za celice obeh celičnih kultur v primerjavi z DMSO kontrolo.



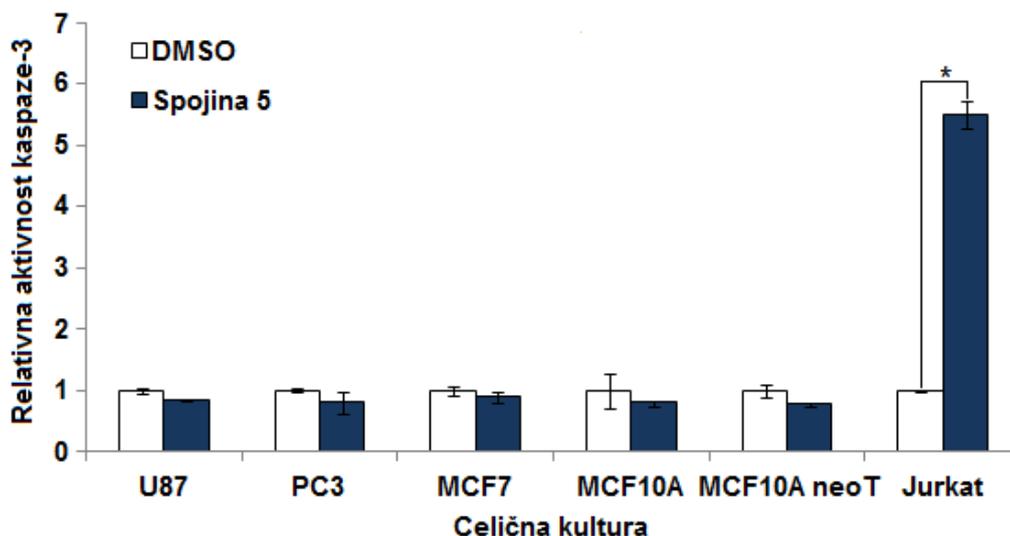
Slika 10: Toksičnost amino-alkoholnih fragmentov ANR (25 µM) za celični kulturi Jurkat in MCF10A neoT po 24 urni inkubaciji. Rezultat je predstavljen kot povprečje ± standardna deviacija (n=12). *p<0,05, **p<0,005

Razlika v jakosti citotoksičnega delovanja je lahko posledica razlike v mehanizmu delovanja samega HEA fragmenta v primerjavi z mehanizmom delovanja spojine s pripetim spinskim označevalcem. Znano je, da so spojine, ki v strukturi vsebujejo HEA fragment, induktorji apoptoze. Tekom nadaljnjega magistrskega dela smo raziskali ali gre pri celičnih kulturah Jurkat in MCF10A neoT, inkubiranih z ANR ali njihovimi amino-alkoholnimi fragmenti, za sproženje procesa apoptotične celične smrti.

4.1.2 ANR POVZROČIJO POVEČANJE AKTIVNOSTI KASPAZE-3 PRI CELICAH JURKAT

Amino-alkoholni derivati povzročijo aktivacijo kaspaze-3 in sproženje apoptoze pri celicah Jurkat. Največje zmanjšanje celičnega preživetja na celicah Jurkat je povzročila spojina **5**, zato smo v nadaljevanju preverili aktivnost kaspaze-3 v vseh celičnih kulturah po tretiranju s spojino **5** (10 µM). Kot kontrolo smo uporabili DMSO (10 µM). Po 12 h inkubaciji smo pripravili lizate in iz lizatov vzorce z enakimi koncentracijami proteinov. Le-te smo inkubirali v aktivacijskem pufru z DTT. Po dodatku substrata Ac-DEVD-AFC (100 µM),

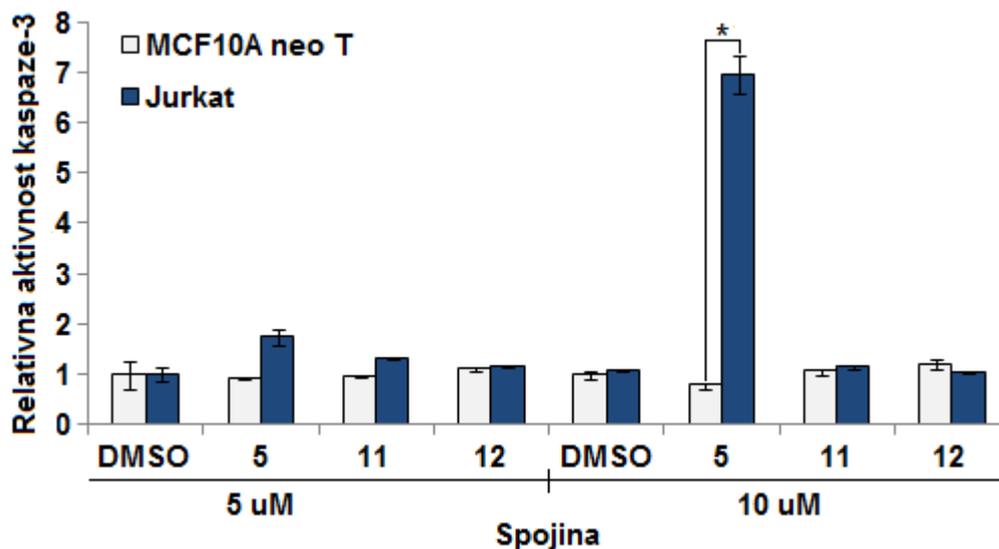
specifičnega za kaspazo-3, smo takoj pričeli s spektrofotometričnim merjenjem aktivnosti kaspaze-3 v vzorcih. Rezultate meritev prikazuje slika 11.



Slika 11: Relativna aktivnost kaspaze-3 v celicah po 12 urnem tretiranju s spojino **5** (10 μ M), glede na kontrolo (DMSO, 10 μ M). Rezultat je predstavljen kot povprečje \pm standardna deviacija (n=2). *p<0,05

Aktivnost kaspaze-3 se je po tretiranju s spojino **5**, v primerjavi s kontrolo, statistično značilno povečala le v primeru celične kulture Jurkat, kar nakazuje na apoptozo celic Jurkat, povzročeno z ANR.

Z namenom raziskovanja odnosa med strukturo in delovanjem ANR smo podoben poskus izvedli še s spojinama **11** in **12** (5 μ M ali 10 μ M) v primerjavi s spojino **5** (5 μ M ali 10 μ M). Z navedenimi spojinami smo 12 h tretirali celice Jurkat in MCF10A neoT. Analiza aktivacije kaspaze-3 je pokazala, kot je prikazano na sliki 12, da se aktivnost kaspaze-3 statistično značilno poveča le pri inkubaciji celic Jurkat v 10 μ M raztopini spojine **5**.



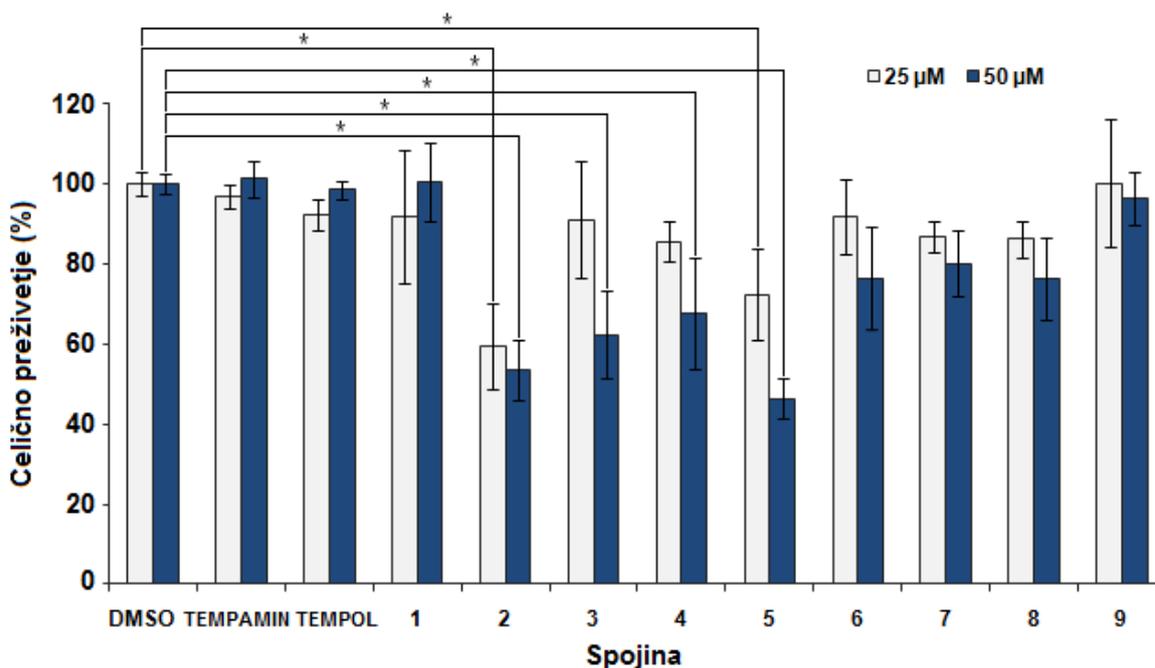
Slika 12: Relativna aktivnost kaspaze-3 v celicah Jurkat in MCF10A neoT, glede na kontrolo (DMSO), po 12 urni inkubaciji s spojinami 5, 11 in 12. Rezultat je predstavljen kot povprečje ± standardna deviacija (n=2). *p<0,05

Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da spojina 5 povzroči apoptozo celic Jurkat, amino-alkoholna fragmenta (spojini 11 in 12) pa v uporabljenih koncentracijah apoptoze ne povzročita pri nobeni od proučevanih celičnih kultur.

4.1.3 TOKSIČNOST ANR ZA CELICE JURKAT V ODVISNOSTI OD DOLŽINE AMINO-ALKOHOLNEGA FRAGMENTA SPOJINE

Zaradi sprememb aktivnosti kaspaze-3 le v celicah Jurkat, po inkubaciji s spojino 5, smo v nadaljevanju proučevali vpliv toksičnosti ANR v odvisnosti od števila metilenskih skupin v amino-alkoholnem fragmentu le na celični kulturi Jurkat. Celice smo tretirali 24 h s spojinami 1 - 9 in izhodnima spojinama Tempaminom in Tempolom pri koncentracijah 25 µM in 50 µM. Kot kontrolo smo uporabili DMSO (25 in 50 µM). Celice smo tretirali v treh paralelkah in po dodatku MTS reagenta in merjenju absorbance smo dobili rezultate, ki jih prikazuje slika 13. Rezultati so predstavljeni kot povprečje ± standardna deviacija. Iz slike 13 je razvidno, da je toksičnost spojin odvisna od dolžine amino-alkoholnega fragmenta. Spojine s krajšim amino-alkoholnim fragmentom (n=7) kot tudi spojine z daljšim amino-alkoholnim fragmentom (n=14, 15, 17) ne vplivajo na preživetje celic Jurkat, hkrati tudi izhodni spojinami Tempol in Tempamin nista izkazovali sprememb v preživetju celic Jurkat. Spojine 2 - 5 (s številom metilenskih skupin 9, 11, 12 in 13) pa pri višji koncentraciji statistično značilno zmanjšajo celično preživetje celic Jurkat v primerjavi z DMSO

kontrolno. Učinek ANR na preživetje celic je torej odvisen od števila metilenskih skupin in je izrazitejši pri višji koncentraciji (50 μ M).

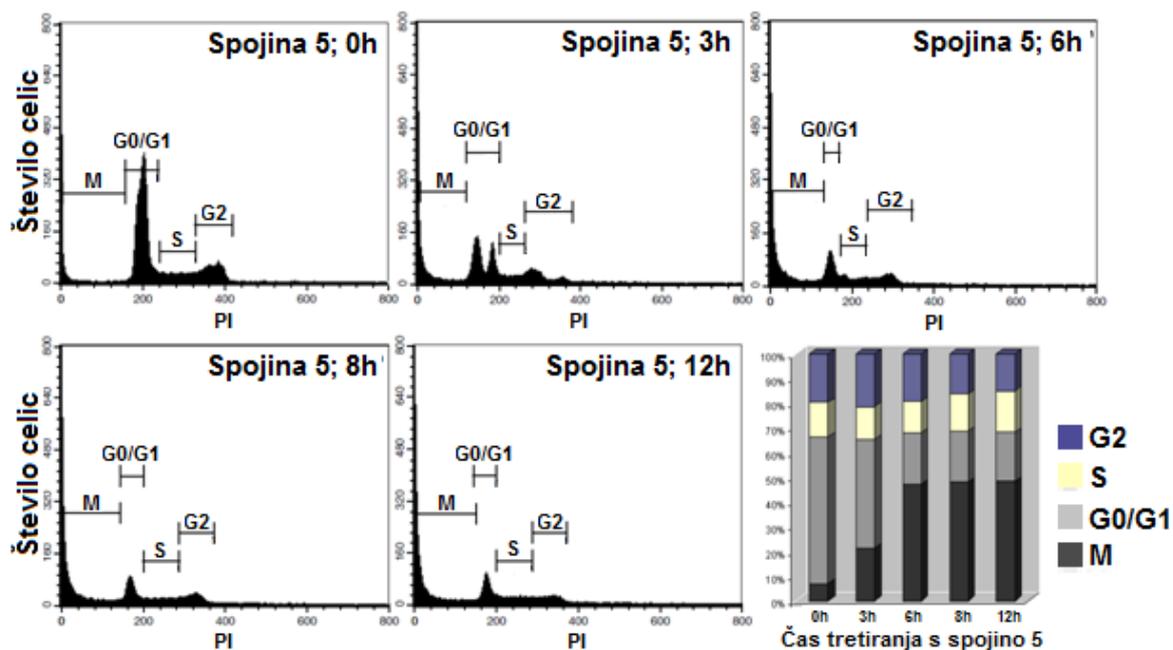


Slika 13: Vpliv spojin 1 - 9 na celično preživetje celic Jurkat po 24 urni inkubaciji. Rezultat je predstavljen kot povprečje \pm standardna deviacija (n=12). *p<0,05

4.1.4 PROUČEVANJE POTEKA CELIČNEGA CIKLA

S proučevanjem poteka celičnega cikla smo želeli preveriti kolikšen delež celic je v posamezni fazi celičnega cikla. Za netretirane zdrave celice je značilno, da jih je največ v G0/G1 fazi (mirujoča faza/faza rasti celice) celičnega cikla. Kadar začnejo v celicah potekati procesi, ki vodijo v smrt celice, se poveča delež celic v M fazi (celična rast se ustavi, energija se preusmeri v delitev celice) celičnega cikla, pri čemer se ustrezno zmanjša delež celic v G0/G1 fazi celičnega cikla.

Celice Jurkat smo tretirali s spojino 5 (25 μ M) različno dolgo. Tretirane celice smo sprali s PBS pufrom in jih čez noč fiksirali v ledeno hladnem 80 % etanolu. Fiksirane celice smo resuspendirali v PBS pufru in jih inkubirali z RNA-zo in PI. Analizo celičnega cikla smo izvedli z merjenjem fluorescence PI s pomočjo pretočnega citometra. Profil celičnega cikla prikazuje slika 14.

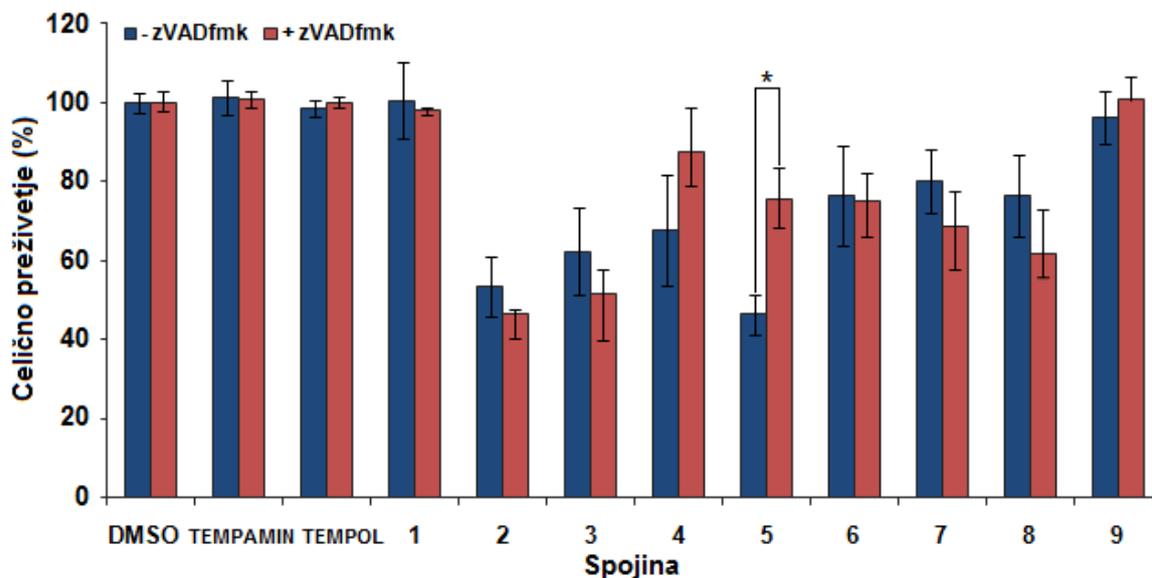


Slika 14: Delež celic Jurkat v posamezni fazi celičnega cikla po inkubaciji s 25 μ M spojino 5.

Rezultati analize celičnega cikla so pokazali, da se z daljšim časom inkubacije celic s spojino 5 povečuje delež celic, ki so v M fazi celičnega cikla. Na račun povečevanja deleža celic v M fazi celičnega cikla, se zmanjšuje delež celic v G0/G1 fazi celičnega cikla. To pomeni, da se z daljšim časom inkubacije celic Jurkat s spojino 5 v celicah sprožijo procesi, ki vodijo v smrt celice.

4.1.5 KASPAZNI INHIBITOR z-VAD-fmk ZMANJŠA CELIČNO SMRT, POVZROČENO Z ANR

Z MTS testom smo želeli proučiti delovanje spojin 1 - 9 ter izhodnih spojin (Tempamin, Tempol) na celicah Jurkat ob 30 minutni predinkubaciji celic s splošnim inhibitorjem kaspaz z-VAD-fmk. Celice smo tretirali 24 h v prisotnosti spojin v 50 μ M koncentraciji. Kot kontrolo smo uporabili DMSO (50 μ M). Vzorcem smo po 24 h dodali MTS reagent in izmerili absorbanco. Rezultati meritev so nam služili za izračun deležev preživelih celic v vzorcih, prikazanih na sliki 15.

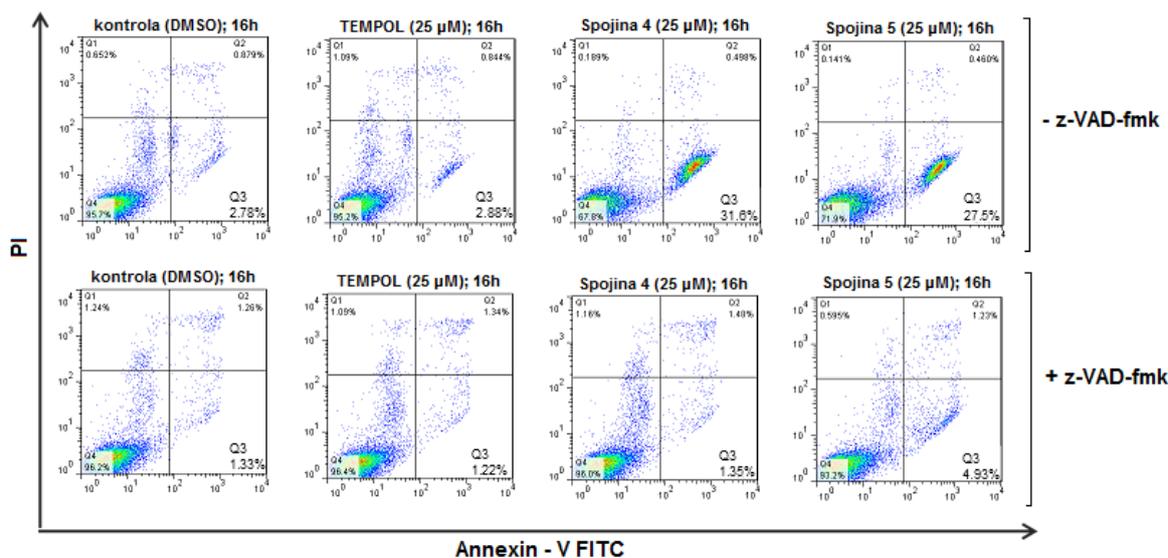


Slika 15: Delež preživelih celic Jurkat po 24 urnem tretiranju z različnimi ANR ob prisotnosti inhibitorja ali brez prisotnosti inhibitorja. Rezultat je predstavljen kot povprečje \pm standardna deviacija (n=12). *p<0,05

Inhibitor kaspaz preprečuje smrt celic Jurkat. Preživetje celic Jurkat ob predinkubaciji z inhibitorjem se je povečalo v primerih tretiranja celic s spojinama **4** in **5** (statistično značilno le v primeru tretiranja s spojino **5**). Predinkubacija z inhibitorjem v primeru ostalih spojin ni bistveno vplivala na preživetje celic, iz česar lahko sklepamo, da apoptozo celic Jurkat pri 50 μ M koncentraciji povzročita samo spojini **4** in **5**, kar smo poskušali na več načinov potrditi tekom nadaljnega magistrskega dela.

4.1.6 APOPTOZA CELIC JURKAT POVZROČENA S SPOJINAMA **4** IN **5**

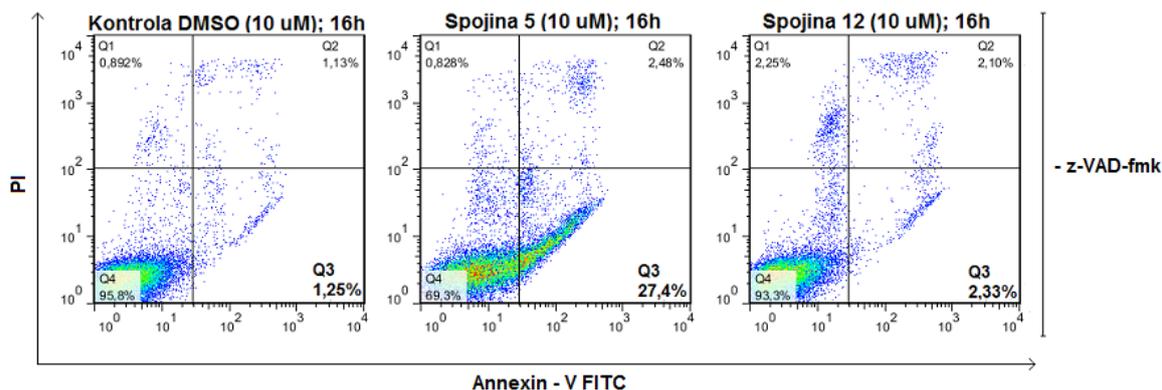
Z namenom potrditve, da sta spojini **4** in **5** odgovorni za sproženje apoptoze celic Jurkat, smo izvedli poskus določanja apoptotičnih celic s pomočjo pretočnega citometra. Celice Jurkat smo 16 h inkubirali v prisotnosti spojin **4**, **5**, Tempola in DMSO v prisotnosti in odsotnosti splošnega inhibitorja kaspaz z-VAD-fmk. Vzorce za pretočno citometrijo smo pripravili tako, da so vsi vsebovali enako število celic, resuspendiranih v vezalnem pufru. Celice smo označili z Aneksinom V-FITC in PI ter po inkubaciji izvedli meritev na pretočnem citometru. Določili smo delež apoptotičnih celic v vzorcih tretiranih s spojinama **4** in **5**. Rezultati analize so prikazani na sliki 16.



Slika 16: Apoptoza celic Jurkat po 16 urnem tretiranju s spojina 4 in 5.

Na sliki 16 je vidno povečanje deleža apoptotičnih celic po tretiranju celic Jurkat s spojina 4 in 5 (kvadrant Q3 na diagramih). Po tretiranju s spojino 4 znaša delež apoptotičnih celic v vzorcu 31,5 %, po tretiranju s spojino 5 pa 27,5 %, medtem ko po tretiranju s Tempolom in DMSO delež apoptotičnih celic znaša le 2,88 % in 2,78 %. Predinkubacija celic v raztopini inhibitorja prepreči apoptozo, saj inhibitor zavre aktivacijo kaspaz, ki so ključnega pomena za potek apoptoze. Deleži apoptotičnih celic v vzorcih ob predinkubaciji z inhibitorjem znašajo po tretiranju s spojina 4 in 5 le še 1,35 % in 4,93 %, po tretiranju s Tempolom in DMSO pa 1,22 % in 1,33 %. Rezultati so potrdili našo domnevo, da spojini 4 in 5 povzročata apoptozo celic Jurkat.

Enako zastavljen poskus smo z namenom potrditve domneve, da sami amino-alkoholni fragmenti ne povzročajo apoptoze celic Jurkat, izvedli še s spojina 5 (10 μM) in 12 (10 μM). Kot kontrolo smo uporabili DMSO (10 μM). Po 16 h inkubacije s spojino 5 je delež apoptotičnih celic (kvadrant Q3 na diagramih) znašal 27,4 %, delež nekrotičnih/mrtvih celic pa 2,48 %. Inkubacija s spojino 12 (10 μM) je povzročila apoptozo 2,33 % celic Jurkat in nekrozo/smrt 2,10 % celic, kot prikazuje diagram na sliki 17.

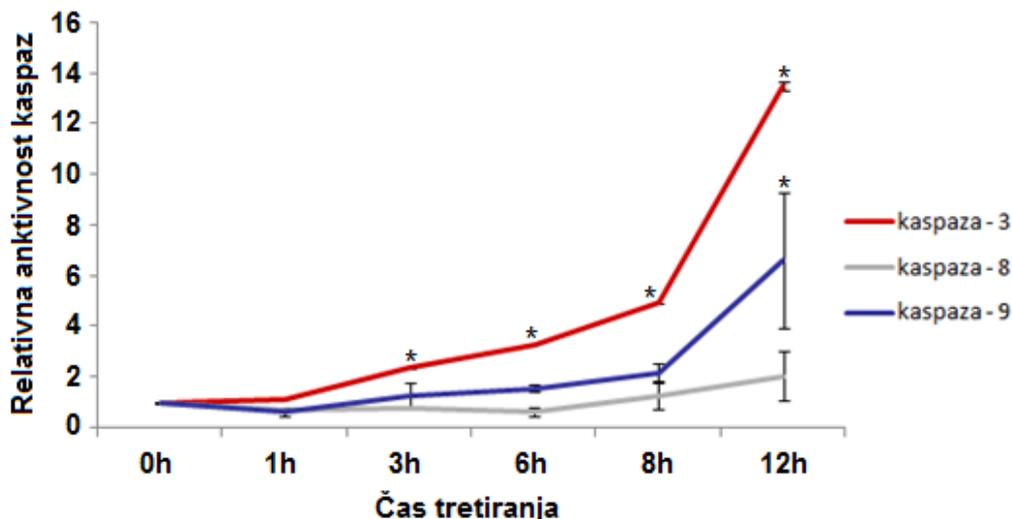


Slika 17: Apoptoza celic Jurkat po 16 urni inkubaciji s spojino 5 ali 12.

4.2 PROUČEVANJE MEHANIZMA APOPTOZE CELIC JURKAT PO TRETIRANJU Z ANR

4.2.1 PROUČEVANJE AKTIVNOSTI KASPAZ 3, 8 IN 9

V prvem delu magistrske naloge smo dokazali, da spojini 4 in 5 povzročata apoptozo celic Jurkat. V nadaljevanju smo proučili aktivnost kaspaz 3, 8 in 9, po tretiranju s spojino 5, z namenom določitve mehanizma, po katerem poteče apoptoza celic. Iz celic Jurkat, tretiranih s spojino 5 (25 μ M), smo pripravili lizate. Koncentracijo proteinov v lizatih smo izmerili s pomočjo metode po Bradfordu. Iz lizatov smo pripravili vzorce s koncentracijo proteinov 20 μ g/50 μ L tako, da smo jih redčili z lizirnim pufrom. Na črno mikrotitrsko ploščo smo nanесли raztopine vzorcev in dodali v vsako vdolbinico še aktivacijski puffer z DTT. Pred začetkom merjenja aktivnosti kaspaz smo v vsako vdolbinico nanесли raztopino substrata (100 μ M), specifičnega za kaspazo, katere aktivnost smo želeli spremljati v posameznem vzorcu. Po koncu merjenja smo izračunali relativno aktivnost kaspaz v vzorcih glede na aktivnost kaspaze v kontrolnem vzorcu in podali aktivnost posamezne kaspaze v odvisnosti od časa, kot je prikazano na sliki 18.

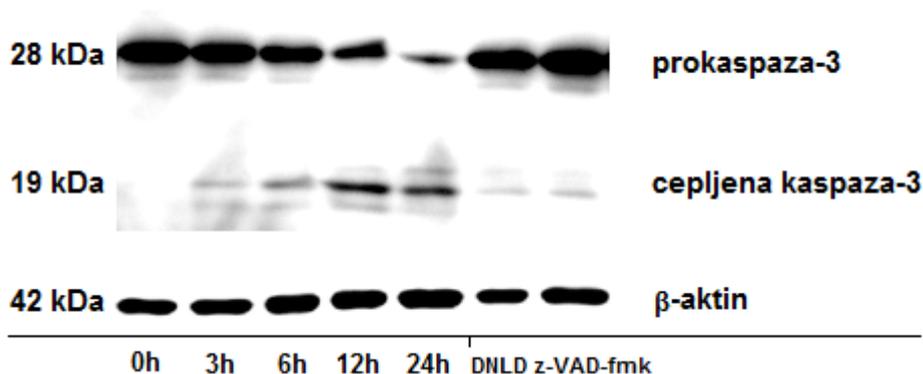


Slika 18: Relativna aktivnost kaspaz, glede na kontrolo (0h), po tretiranju celic Jurkat s spojino **5** (25 μ M). Rezultat je predstavljen kot povprečje \pm standardna deviacija (n=2). *p<0,05

Aktivnost kaspaz narašča s podaljševanjem časa tretiranja celic Jurkat s spojino **5**. Največji porast aktivnosti (statistično značilen že po 3 h inkubacije) smo opazili pri kaspazi-3. Spojina **5** hkrati statistično značilno aktivira kaspazo-9 po 12 h tretiranja, medtem ko porast aktivnosti pri kaspazi-8 ni statistično značilen, kar nakazuje na intrinzično pot apoptoze.

4.2.2 PROTEINSKI NIVO KASPAZE-3

Proteinski nivo izražanja kaspaze-3 smo proučili s pomočjo NaDS PAGE. Po prenosu proteinov iz gela na nitrocelulozno membrano (prenos western) in zapolnitvi nespecifičnih vezavnih mest z raztopino mleka, smo membrano inkubirali v raztopini primarnih kunčjih protiteles specifičnih za kaspazo-3, ki prepoznajo pro-obliko kot tudi zrelo obliko kaspaze-3. Na primarna protitelesa smo za potrebe detekcije vezali še sekundarna proti-kunčja protitelesa označena s HRP, usmerjena proti primarnim protitelesom. Nazadnje smo membrano inkubirali še v raztopini substrata za HRP in posneli odziv na membrani, kot je prikazano na sliki 19, z aparaturo G-Box. Enakomernost nanosa vzorcev na gel smo preverjali z merjenjem proteinskega nivoja β -aktina.

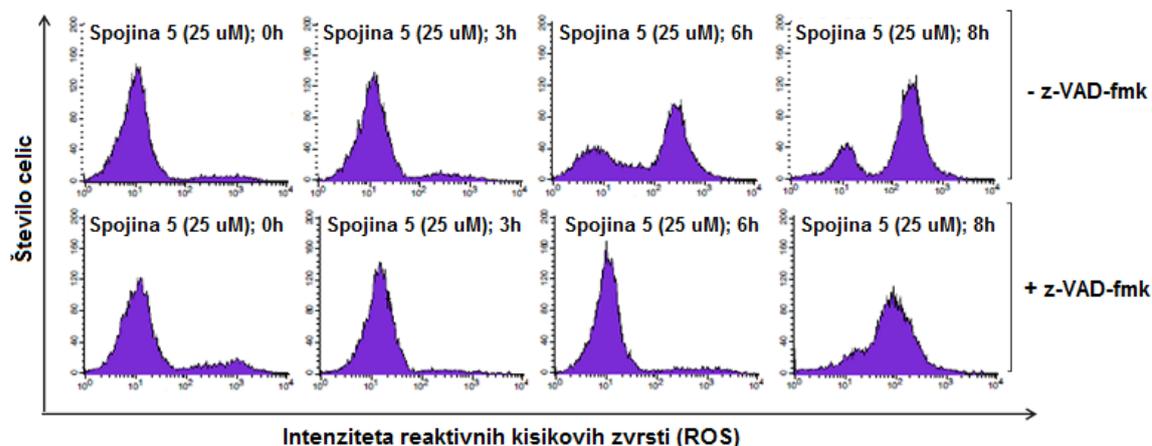


Slika 19: Proteinski nivo kaspaze-3 v celicah Jurkat po tretiranju s spojino 5.

Aktivnost kaspaze-3 v celicah Jurkat se z daljšanjem časa inkubacije s spojino 5 (25 μ M) povečuje, kar potrjuje povečan proteinski nivo cepljene kaspaze-3, ki predstavlja aktivno obliko encima. Ob predinkubaciji z inhibitorjem kaspaze-3 Ac-DNLD-CHO in splošnim inhibitorjem kaspaz z-VAD-fmk se proteinski nivo cepljene kaspaze-3 ne poveča, kar pomeni, da inhibitorja v celicah Jurkat uspešno zavreta proces apoptoze, povzroččen s spojino 5.

4.2.3 POVEČANO NASTAJANJE ROS V CELICAH, TRETIRANIH S SPOJINO 5

Pri proučevanju aktivnosti kaspaz smo ugotovili, da spojina 5, glede na značilno aktivacijo kaspaz 3 in 9 in ne kaspaze-8, v večji meri sproži apoptozo celic Jurkat po intrinzični poti. Da bi dodatno potrdili to domnevo, smo izmerili nastanek ROS v celicah Jurkat po tretiranju s spojino 5. S pomočjo pretočne citometrije smo izmerili nivo ROS v celicah, ki smo jih predhodno tretirali s spojino 5 ali s spojino 5 ob predinkubaciji z inhibitorjem kaspaz z-VAD-fmk. Po določenem času inkubacije s spojino 5 smo celicam dodali sondo $H_2DCF-DA$, ki je indikator količine ROS, ki pospešeno nastajajo v celicah ob stresnih procesih, kot je apoptoza. Sonda v prisotnosti ROS oksidira do fluorescenčnega produkta, katerega količino v celicah smo izmerili s pomočjo pretočne citometrije. Rezultate meritev prikazuje slika 20.

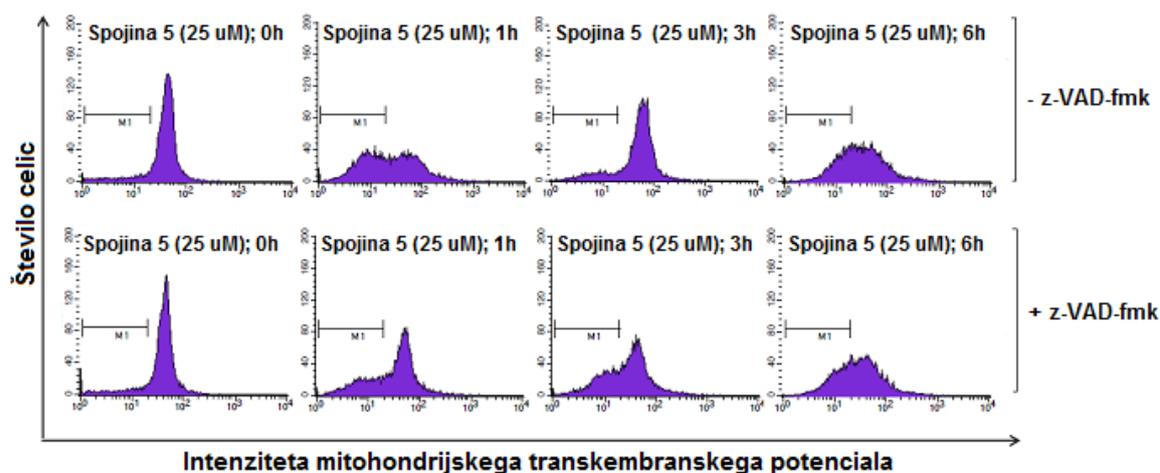


Slika 20: Časovna odvisnost nastajanja ROS v celicah Jurkat po inkubaciji s spojino 5.

Spojina 5 je povzročila nastanek znotrajceličnih ROS, ki pa je bil opazen šele po 6 h in 8 h inkubacije. Predinkubacija s splošnim inhibitorjem kaspaz z-VAD-fmk zmanjša nastajanje ROS po tretiranju s spojino 5, kar dodatno nakazuje na apoptozo, povzročeno preko intrinzične poti.

4.2.4 PADEC MTP PO TRETIRANJU S SPOJINO 5

Padec MTP v celicah nakazuje na potek intrinzične poti apoptoze. Za merjenje MTP v celicah Jurkat, tretiranih s spojino 5 in spojino 5 ob predinkubaciji s splošnim inhibitorjem kaspaz z-VAD-fmk, smo uporabili metodo pretočne citometrije. Vzorcem smo po končanem tretiranju dodali barvilo MitoTracker, s pomočjo katerega smo določili delež aktivnih mitohondrijev v celicah. Na podlagi izmerjene fluorescence za vsak vzorec smo opazovali padec MTP glede na čas tretiranja s spojino 5 in glede na prisotnost ali odsotnost splošnega inhibitorja kaspaz. Rezultati meritev so prikazani na sliki 21.



Slika 21: Padec MTP po tretiranju celic Jurkat s spojino 5.

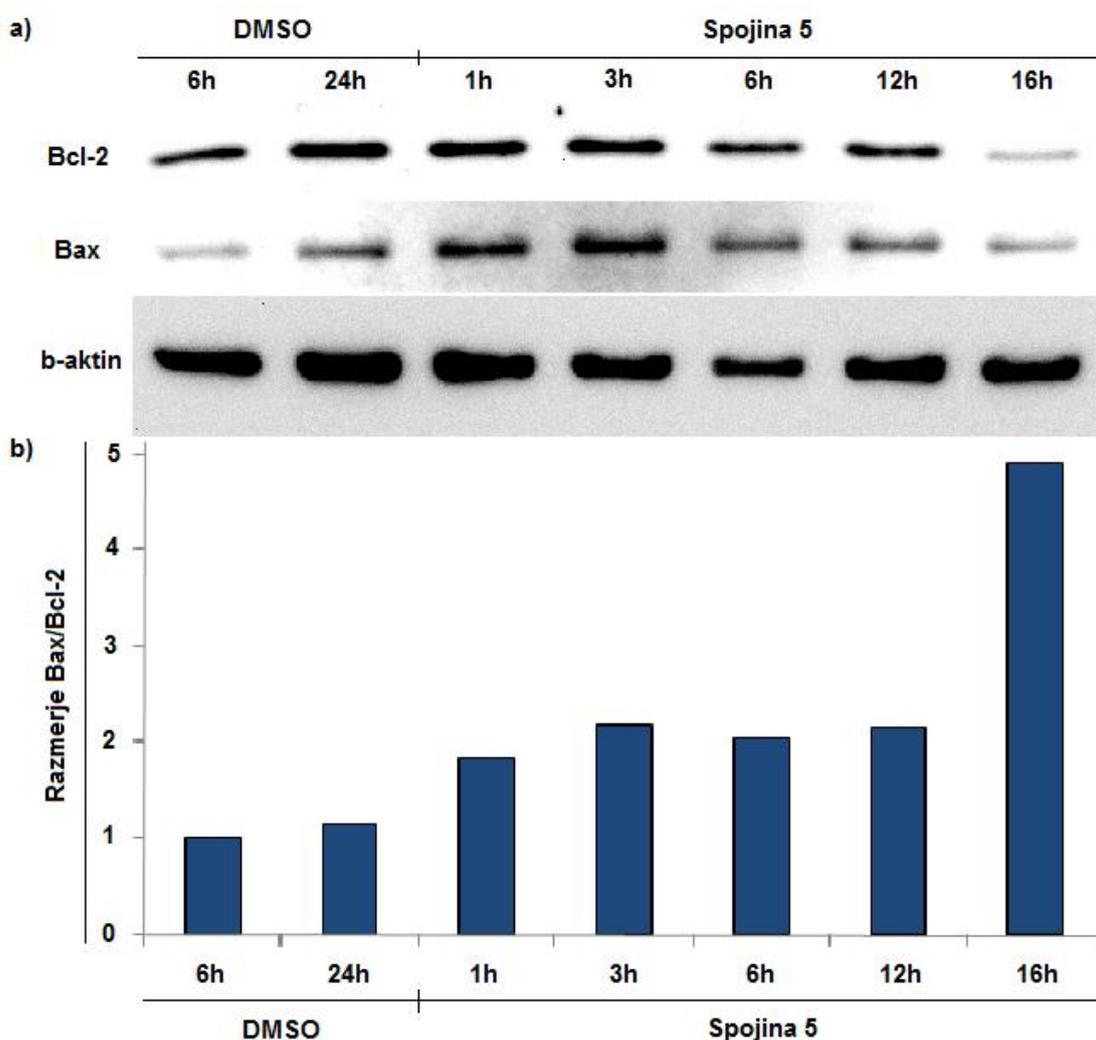
Po 1 h tretiranja s spojino 5 (25 μ M) pride do padca MTP v celicah Jurkat, kar nakazuje na intrinzično pot apoptoze. Ob predinkubaciji celic s splošnim inhibitorjem kaspaz z-VAD-fmk, padec MTP ni tako izrazit, saj inhibitor zavira delovanje kaspaz, ki so ključnega pomena za potek apoptoze.

4.2.5 VPLIV SPOJINE 5 NA IZRAŽANJE SIGNALNIH MOLEKUL, UDELEŽENIH V PROCESU APOPTOZE

Proteinski nivo signalnih proteinov Bax, Bcl-2 in I κ B α , p50 in p105 smo proučevali s pomočjo NaDS PAGE in prenosa western. Celice Jurkat smo inkubirali v prisotnosti spojine 5 in pripravili celične lizate. Po merjenju koncentracije proteinov v lizatih z metodo po Bradfordu smo vzorce za elektroforezo pripravili tako, da so vsi vsebovali enako količino proteinov. Po končani elektroforezi smo proteine iz gela prenesli na nitrocelulozno membrano s pomočjo prenosa western. Proteine smo za namen detekcije označili s specifičnimi primarnimi kunčjimi protitelesi ter specifičnimi sekundarnimi protikunčjimi protitelesi označenimi s HRP, kot je opisano v metodah. Nato smo membrano inkubirali še v raztopini substrata za HRP in posneli odziv na membrani s pomočjo aparature G-Box. Enakomernost nanosa vzorcev na gel smo preverjali z merjenjem proteinskega nivoja β -aktina. Pri podajanju rezultatov za proteinske nivoje ostalih proteinov smo upoštevali normalizacijo glede na β -aktin.

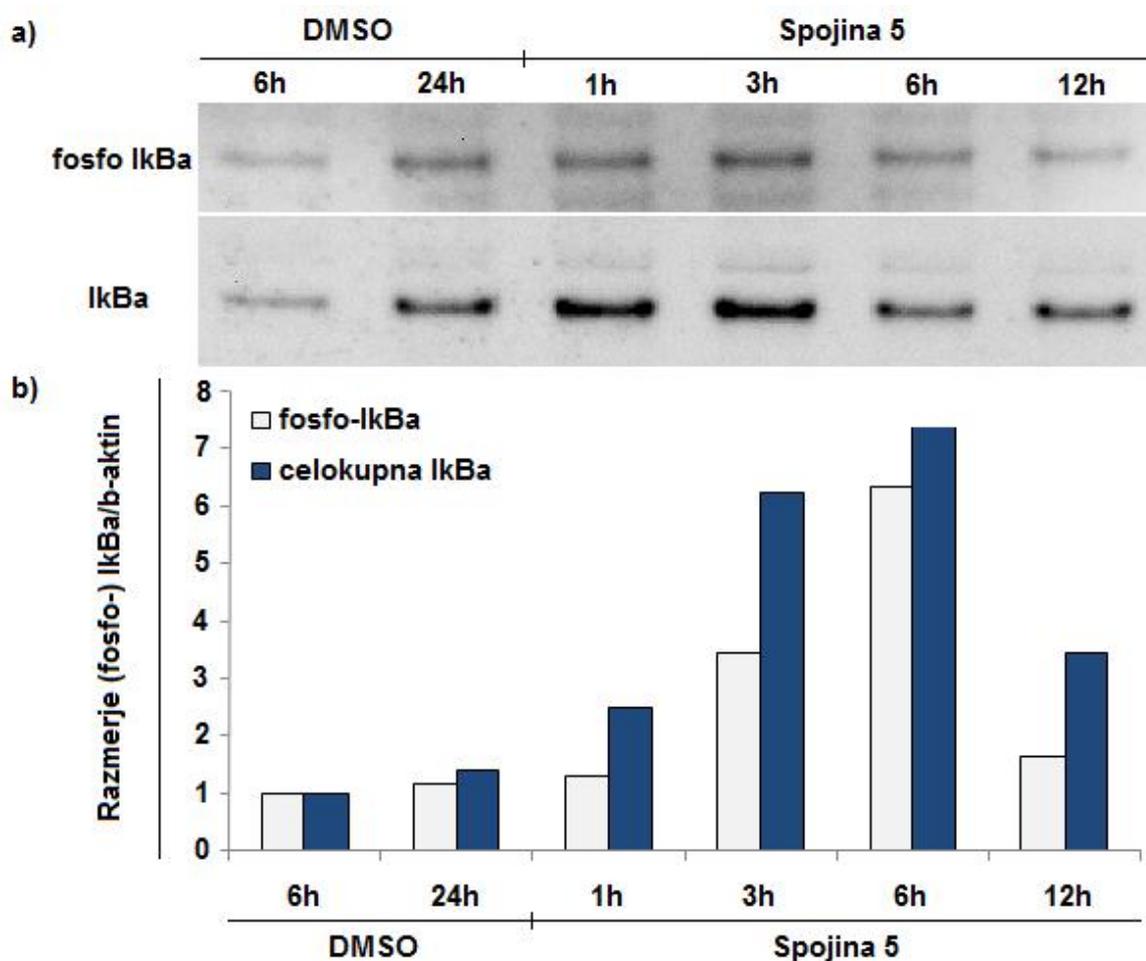
Proteinski nivo izražanja signalnega proteina Bcl-2 se z daljšanjem časa tretiranja celic Jurkat s spojino 5 (10 μ M) znižuje. Znano je, da spada Bcl-2 v skupino anti-apoptotičnih

proteinov, ki v celicah zavirajo proces apoptotične celične smrti. Zmanjševanje izražanja tega proteina v celicah Jurkat po inkubaciji s spojino 5 nakazuje na možnost poteka procesa apoptotične celične smrti. Obratno se s podaljševanjem časa inkubacije povečuje proteinski nivo izražanja proteina Bax. Le ta spada v skupino pro-apoptotičnih proteinov, ki v celicah spodbujajo proces apoptotične celične smrti. Kot prikazuje slika 22, se razmerje med proteinoma povečuje v prid pro-apoptotičnega proteina Bax, kar potrjuje našo domnevo o apoptozi celic Jurkat sproženi s spojino 5.



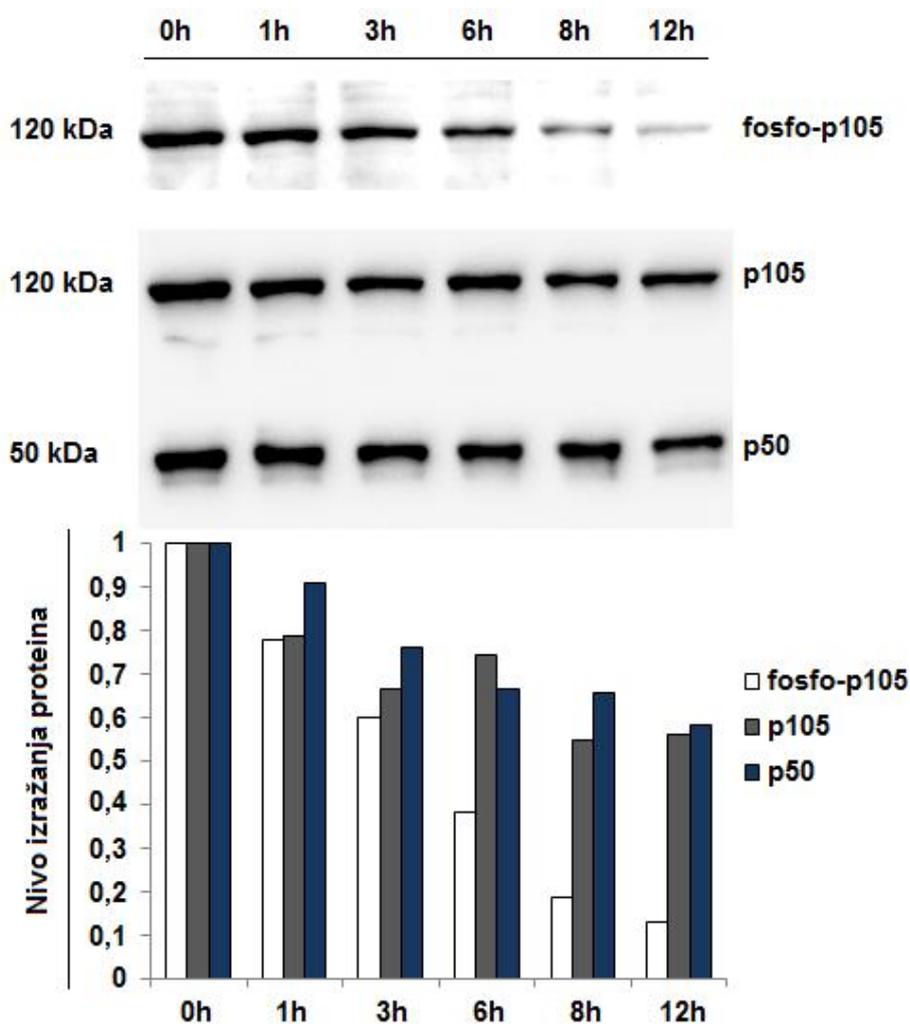
Slika 22: Spreminjanje proteinskega nivoja izražanja proteinov Bcl-2 in Bax v celicah Jurkat po tretiranju s spojino 5. **a)** Proteinski nivo izražanja Bax in Bcl-2 v celicah Jurkat po tretiranju s spojino 5 (10 μ M). **b)** Razmerje proteinskih nivojev izražanja proteinov Bax in Bcl-2 po inkubaciji s spojino 5 (10 μ M) se poveča v prid pro-apoptotičnega proteina Bax.

Slika 23 prikazuje povečevanje proteinskih nivojev izražanja proteinov I κ B α in njegovega razgradnega produkta, fosforilirane oblike I κ B α , po tretiranju celic Jurkat s spojino 5 (10 μ M). Protein I κ B α v celici deluje kot inhibitor aktivacije transkripcijskega dejavnika NF- κ B. NF- κ B v jedru uravnava nivo izražanja različnih genov. Med drugim tudi genov za inhibitorje apoptoze, preko katerih sodeluje pri uravnavanju procesa apoptotične celične smrti. Zaradi povečevanja proteinskega nivoja I κ B α v celicah Jurkat po inkubaciji s spojino 5 pride do zmanjšanja aktivacije NF- κ B in posledično do zmanjšane izražanja genov za inhibitorje apoptoze. Sklepamo lahko, da inkubacija celic Jurkat s spojino 5 sproži proces apoptotične celične smrti.



Slika 23: Spreminjanje proteinskega nivoja različnih oblik proteina I κ B α v celicah Jurkat. a) Proteinski nivo I κ B α in fosfo-I κ B α po inkubaciji celic Jurkat s spojino 5 (10 μ M). b) Razmerje fosfo-I κ B α / β -aktin in celokupne I κ B α / β -aktin po inkubaciji celic Jurkat s spojino 5 (10 μ M).

Po tretiranju celic Jurkat s spojino 5 pride tudi do zmanjšanega izražanja fosforilirane oblike proteina p105, kar prikazuje slika 24. Protein p105, podobno kot I κ B α , zavira aktivacijo NF- κ B. Fosforilacija proteina pa vodi v njegovo razgradnjo. Ob inkubaciji celic Jurkat s spojino 5 pride do zmanjševanja proteinskega nivoja fosforilirane oblike proteina p105. To pomeni, da je zmanjšana razgradnja proteina p105. Ker je p105 inhibitor aktivacije NF κ B je posledično zmanjšana aktivacija tega jedrnega dejavnika. Rezultat je zmanjšanje izražanja inhibitornih genov apoptoze in potek apoptotične celične smrti celic Jurkat.



Slika 24: Zmanjševanje proteinskega nivoja izražanja fosforilirane oblike proteina p105 po 12 urni inkubaciji celic Jurkat s spojino 5 (10 μ M).

RAZPRAVA

Številni znanstveniki v zadnjem času preiskujejo delovanje dolgoverižnih amino-alkoholov in diaminov ter njihovih alkilnih, acilnih in karbamoilnih derivatov na celičnih kulturah. Gre za spojine, ki predstavljajo možnost za razvoj novih protirakavih zdravilnih učinkovin. Dolgoverižni amino-alkoholi in diamini so sposobni proženja številnih bioloških učinkov v celicah, ki so jim izpostavljene. Delujejo lahko protivnetno, so citotoksični za neoplastične celice in sposobni vezave na DNK. Posledica izpostavljenosti celic tem spojinam je lahko odmrtnje celic po mehanizmu apoptoze (15).

Dolgoverižnim amino-alkoholom in diaminom podobne spojine so tudi ANR, delovanje katerih smo proučevali v magistrski nalogi. Gre za spojine, ki jih v literaturi opisujejo kot možne induktorje apoptoze, ker v svoji strukturi vsebujejo HEA fragment, ki je odgovoren za sproženje apoptoze (14). Pri magistrskem delu smo zato na izbranih tumorskih celicah želeli preveriti vpliv ANR na proženje apoptoze in hkrati raziskati mehanizem, po katerem ta proces poteče ter določiti odnos med strukturo in delovanjem spojin.

V prvem delu magistrske naloge smo z določevanjem celičnega preživetja pokazali, da ANR delujejo toksično na različne celične kulture, in sicer smo njihovo delovanje preverili na celičnih kulturah U87, PC3, MCF7, MCF10A, MCF10A neoT in Jurkat. Citotoksičnost ANR za omenjene celične kulture smo proučili s pomočjo spektrofotometrije. Tretirane celice smo inkubirali z MTS reagentom, ki ga žive celice pretvorijo do obarvanega produkta in na podlagi izmerjenih absorbanč izračunali deleže preživelih celic v posameznih vzorcih. ANR izkazujejo največjo toksičnost za celične kulture MCF7, MCF10A in MCF10A neoT ter nekoliko manjšo za kulturi U87 in Jurkat. Na celično kulturo PC3 uporabljene spojine niso imele opaznega citotoksičnega učinka. Sklepali smo, da so različne stopnje citotoksičnosti spojin za različne celične kulture posledica razlik v mehanizmu citotoksičnega delovanja spojin na posamezno celično kulturo. V nadaljevanju smo preizkušali toksičnost amino-alkoholnih fragmentov ANR (spojine **10** – **17**) v primerjavi s spojino **5** za celični kulturi Jurkat in MCF10A neoT, da bi razjasnili vpliv posameznih strukturnih fragmentov ANR na učinek spojin. Spojina **5**, ki ima HEA fragment pripet na spinski označevalec, je v primerjavi z amino-alkoholnimi fragmenti izkazovala veliko večjo toksičnost za celice obeh celičnih kultur. Vzrok za razliko v jakosti

citotoksičnega delovanja je lahko posledica razlike v mehanizmu delovanja samega HEA fragmenta brez pripetega spinskega označevalca na celice, v primerjavi z mehanizmom delovanja spojine s pripetim spinskim označevalcem. Ena od možnosti je, da so ANR sposobni sprožiti proces apoptotične celične smrti, sam amino-alkoholni fragment pa tega učinka nima.

Pri nadaljnjem delu smo s pomočjo substrata Ac-DEVD-AFC, specifičnega za kaspazo-3, določili aktivnost le-te v vseh preiskovanih celičnih kulturah, ob prisotnosti ANR, natančneje spojine **5**. Na celičnih kulturah Jurkat in MCF-10A neoT smo enak poskus izvedli še z amino-alkoholnima fragmentoma **11** in **12**. Povišan odziv smo zaznali le pri celicah Jurkat ob inkubaciji s spojino **5** in ugotovili, da amino-alkoholna fragmenta **11** in **12** sama po sebi ne povzročita aktivacije kaspaze-3. Aktivacija kaspaze-3 po tretiranju celic Jurkat s spojino **5** nakazuje na proces apoptotične celične smrti. Hkrati ugotovitev nakazuje tudi na to, da sta za učinek ANR potrebna tako HEA fragment, kot tudi spinski označevalec. Skladno z ugotovitvijo, da pride do povišanja aktivnosti kaspaze-3 in potencialno do procesa apoptotične celične smrti ob inkubaciji s spojino **5** samo v primeru celic Jurkat, smo pri nadaljnjem magistrskem delu proučevali mehanizem apoptoze le na tej celični kulturi.

Dokazali smo, da je citotoksičen učinek ANR na celicah Jurkat odvisen od dolžine alkilne verige spojin. Celice smo tretirali z ANR, ki imajo v alkilni verigi naraščajoče število metilenskih skupin in ugotovili, da ANR s krajšo alkilno verigo ($n=7$) in ANR z daljšo alkilno verigo ($n=14, 15, 17$) pri $50 \mu\text{M}$ koncentraciji ne delujejo citotoksično. Tiste spojine, katerih alkilna veriga obsega 9-13 metilenskih skupin, pa povzročijo smrt celic Jurkat. Hkrati smo pri proučevanju citotoksičnosti ANR za celice Jurkat v prisotnosti inhibitorja kaspaz z-VAD-fmk posredno ugotovili, da spojini **4** in **5** povzročita apoptozo celic Jurkat, saj so kaspaze ključne pri procesu proženja apoptoze. Celično preživetje se je v primeru tretiranja s tema dvema spojinama ob predinkubaciji celic z inhibitorjem specifično povečalo, kar kaže na spodbujeno apoptozo celic Jurkat v prisotnosti ANR.

Ugotovitev, da inkubacija v prisotnosti spojine **4** ali **5** povzroči apoptozo celic Jurkat, smo potrdili še z drugimi metodami. Z uporabo pretočne citometrije smo določili povečan delež apoptotičnih celic po tretiranju s spojinama **4** in **5** v primerjavi z izhodno spojino (Tempolom) ter DMSO. Delež apoptotičnih celic v vzorcih, ki smo jih pred tretiranjem s

spojinama **4** in **5** inkubirali s splošnim inhibitorjem kaspaz z-VAD-fmk, je bil značilno manjši od deleža apoptotičnih celic v vzorcih, tretiranih samo s spojina **4** in **5** brez prisotnosti inhibitorja. Pri tretiranju s Tempolom in DMSO razlike v deležu apoptotičnih celic ob predinkubaciji z inhibitorjem in brez njega niso značilne, kar ponovno nakazuje na apoptozo celic Jurkat, sproženo s spojina **4** in **5**. Hkrati smo v tem delu magistrske naloge dodatno potrdili, da so za indukcijo apoptoze celic Jurkat ključnega pomena vsi strukturni fragmenti spojin. Po inkubaciji celic s spojino **12** pri analizi ni bilo opaznega povečanega deleža apoptotičnih celic v primerjavi s kontrolnim vzorcem celic, tretiranih z DMSO. Analiza celičnega cikla po inkubaciji s spojino **5** je pokazala, da se s podaljševanjem časa inkubacije zmanjšuje delež celic, ki so v G0/G1 fazi celičnega cikla in povečuje delež celic v M fazi celičnega cikla, kar pomeni, da se povečuje delež apoptotičnih celic. Nadalje smo z uporabo NaDS PAGE in prenosa western proučili proteinski nivo izražanja kaspaze-3 v celicah, ki so bile različno dolgo izpostavljene spojini **5**. Proteinski nivo izražanja kaspaze-3 smo izmerili tako, da smo membrano z ločenimi proteini najprej inkubirali v raztopini specifičnih primarnih kunčjih protiteles proti pro-obliki kaspaze-3 in cepljeni obliki kaspaze-3, ki predstavlja aktivno obliko encima. Nato smo na primarna protitelesa vezali sekundarna proti-kunčja protitelesa označena z encimom HRP. Sledila je inkubacija membrane v raztopini substrata za HRP in snemanje odziva na membrani. Ugotovili smo, da se z daljšanjem časa izpostavljenosti celic Jurkat spojini **5** povečuje delež aktivne oblike kaspaze-3 v celicah, kar nakazuje na apoptozo. Pri vzorcih, ki smo jih predinkubirali s specifičnim inhibitorjem kaspaze-3 Ac-DNLD-CHO in splošnim inhibitorjem kaspaz z-VAD-fmk, pa se delež aktivne oblike kaspaze-3 tudi po daljši izpostavljenosti spojini **5** ni bistveno povečal, kar pomeni, da sta inhibitorja uspešno zavrla aktivacijo kaspaze-3 in s tem nadaljnji proces apoptoze celic Jurkat. S pomočjo spektrofotometrije smo izmerili aktivnost kaspaz 3, 8 in 9 in tako poskušali ugotoviti ali povzroči spojina **5** od kaspaz odvisno apoptozo celic Jurkat po ekstrinzični ali po intrinzični poti. Ugotovili smo, da se je po tretiranju celic s spojino **5** najbolj povečala aktivnost kaspaze-3. Nekoliko manj se je povečala aktivnost kaspaze-9 in najmanj aktivnost kaspaze-8. Večje povečanje aktivnosti kaspaze-9 v primerjavi s povečanjem aktivnosti kaspaze-8 bi lahko pomenilo, da spojina **5** sproži apoptozo celic Jurkat po intrinzični poti. Za proces apoptoze, ki poteka po intrinzični poti, so značilne spremembe v strukturi notranje mitohondrijske membrane, odprtje mitohondrijske permeabilnostne pore, padec MTP in posledično sproščanje pro-apoptotičnih proteinov v

citofil. Ti proteini lahko aktivirajo od kaspaz odvisno mitohondrijsko pot apoptoze. Pride do cepitve prokaspaze-9 in nastanka aktivne oblike tega proteina. Kaspaza-9 spada med proteine, ki proces apoptoze sprožijo, saj aktivira kaspazo-3 iz družine proteinov, ki proces apoptoze izvršijo (5).

V nadaljevanju smo poskušali dodatno potrditi, da ANR povzročijo potek apoptoze celic Jurkat po intrinzični poti. S pomočjo pretočne citometrije smo izmerili nivo nastajanja ROS v celicah Jurkat po različno dolgi izpostavljenosti spojini **5**. Za detekcijo nastale količine ROS v celicah smo uporabili sondo H₂DCF-DA. Ugotovili smo, da se po tretiranju celic Jurkat s spojino **5** nivo ROS v celicah značilno poveča, kar pomembno prispeva k razvoju sprememb na ravni mitohondrijev, ki so značilne za proces apoptotične celične smrti, ki poteka po intrinzični poti. Ob predinkubaciji celic s splošnim inhibitorjem kaspaz z-VAD-fmk se nivo ROS po tretiranju s spojino **5** ne poveča, kar še dodatno potrjuje domnevo, da je povišano nastajanje ROS v celicah povezano s procesom apoptoze. V nadaljevanju smo dokazali padec MTP v celicah Jurkat, izpostavljenih spojini **5**, z uporabo barvila MitoTracker. Padec MTP je posledica povečanja prepustnosti mitohondrijske permeabilnostne pore zaradi sprememb v notranji membrani mitohondrijev. Tvrstne spremembe na ravni mitohondrijev so značilne za proces apoptotične celične smrti, ki poteka po intrinzični poti. Ugotovitev potrjujejo tudi rezultati enakega poskusa s celicami Jurkat, ki smo jih predhodno inkubirali v raztopini splošnega inhibitorja kaspaz z-VAD-fmk. Enournna izpostavljenost teh celic spojini **5** povzroči le manjšo spremembo MTP, saj inhibitor zavre delovanje kaspaz, katerih aktivnost je ključnega pomena za potek apoptoze.

V zadnjem delu magistrske naloge smo želeli dodatno potrditi domnevni mehanizem apoptotičnega delovanja spojin ANR in opredeliti signalne molekule, ki so pri tem udeležene. S pomočjo NaDS PAGE in prenosa western smo proučili proteinske nivoje signalnih molekul Bcl-2, Bax, IκBα, p50 in p105. Pokazalo se je, da se z daljšanjem časa inkubacije s spojino **5** proteinski nivo signalne molekule Bcl-2 v primerjavi s proteinskim nivojem signalne molekule Bax znižuje. Bcl-2 spada v družino anti-apoptotičnih signalnih proteinov, medtem ko je Bax signalni protein, ki spodbuja proces apoptoze celic. Premik razmerja proteinskih nivojev teh dveh signalnih molekul v prid signalne molekule Bax dodatno potrjuje, da spojina **5** spodbudi proces apoptoze v celicah Jurkat preko spremembe v delovanju mitohondrijev, torej spodbudi intrinzično pot apoptoze (5).

Pomembno vlogo v procesu apoptoze ima tudi signalna molekula NF- κ B, katere inhibicija splošno spodbudi proces apoptoze. Inhibitorni protein I κ B α preprečuje aktivacijo transkripcijskih dejavnikov družine NF κ B (38). V magistrski nalogi smo pokazali, da se z daljšanjem časa inkubacije celic Jurkat s spojino **5** povišuje proteinski nivo I κ B α , kar pomeni, da spojina **5** posredno povzroči zmanjšanje aktivacije transkripcijskih dejavnikov družine NF κ B. V to družino spadata tudi signalni molekuli p50 in p105, ki sodelujeta pri uravnavanju celičnega preživetja. V jedru sprožita prepisovanje genov za proteine, ki poskrbijo, da celica preživi (38). Kadar je prepisovanje genov za tovrstne »preživetvene« proteine preprečeno, je to za celico signal za pričetek procesa apoptoze (39). Ob inkubaciji celic Jurkat s spojino **5** pride do zmanjševanja proteinskega nivoja fosforilirane oblike proteina p105, kar pomeni, da je v celicah zmanjšana razgradnja p105 in posledično povečano zaviranje prepisovanja genov za »preživetvene« proteine. S proučevanjem signalizacijskih poti, ki se aktivirajo ob inkubaciji celic Jurkat z ANR smo potrdili domnevo, da ANR sprožijo proces apoptoze, ki poteka po intrinzični poti. Udeleženos znotrajceličnih signalnih poti v procesu apoptoze je značilna za proces, ki poteka po intrinzični poti, in je posledica dražljajev, ki niso odvisni od vezave na receptorje smrti (5).

Rezultati, ki smo jih pridobili tekom magistrskega dela kažejo, da so ANR induktorji apoptoze, specifični za celično kulturo Jurkat. K učinkovitosti spojin prispevata oba strukturna fragmenta, tako HEA fragment, kot tudi spinski označevalec. Jakost citotoksičnega delovanja spojin je odvisna od koncentracije in pa od dolžine HEA fragmenta, ki mora vsebovati 9-13 metilenskih skupin. ANR sprožijo mehanizem apoptotične celične smrti po intrinzični poti preko sprememb v delovanju mitohondrijev in preko vpliva na izražanje nekaterih signalnih molekul, ki sodelujejo pri uravnavanju celičnega preživetja. Potrdili smo, da so ANR celično specifični induktorji apoptoze in jih lahko uvrstimo v skupino spojin, ki predstavljajo pomembno vejo razvoja novih protitumornih zdravilnih učinkovin.

SKLEP

- ANR delujejo toksično na različne celične kulture, U87, MCF7, MCF10A, MCF10A neoT in Jurkat, medtem ko je aktivacija kaspaze-3 z ANR omejena le na celice Jurkat.
- Za citotoksično delovanje ANR sta potrebna oba strukturna fragmenta, tako spinski označevalec kot tudi HEA fragment. Jakost toksičnega delovanja na celicah Jurkat je odvisna od dolžine aminoalkoholnega fragmenta spojine, ki mora vsebovati 9-13 metilenskih skupin.
- Spojini 4 in 5 povzročita apoptozo celic Jurkat, kar dokazuje povečan delež apoptotičnih celic, ki se zmanjša ob prisotnosti kaspaznega inhibitorja. Spojina 5 povzroči aktivacijo kaspaz 3 in 9, ne pa kaspaze-8, kar nakazuje na intrinzično pot apoptoze.
- Apoptoza celic Jurkat po izpostavljenosti ANR poteka po intrinzični poti, kar dodatno potrjuje povečano nastajanje ROS in padec MTP po tretiranju s spojino 5. Proženje intrinzične poti apoptoze hkrati potrjuje povišano razmerje med pro-apoptotično signalno molekulo Bax in anti-apoptotično signalno molekulo Bcl-2 po tretiranju celic Jurkat s spojino 5.
- Ob inkubaciji celic Jurkat s spojino 5 pride do povečanega izražanja signalne molekule I κ B α in do zmanjšanega izražanja fosforilirane oblike proteina p105, kar posledično pomeni zmanjšanje aktivacije jedrnega dejavnika NF- κ B in tako zaviranje prepisovanja genov za tvorbo proteinov, ki spodbujajo celično preživetje, kar vodi v proces apoptoze.

VIRI IN LITERATURA

1. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS: Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation* 2009; 16: 3-11.
2. Fulda S, Debatin K-M: Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006; 25: 4798-4811.
3. Celhar T, Batista Napotnik T, Obreza A, Zega A, Stefanic Anderluh P, Kikelj D, Mlinaric-Rascan I: Azaphenylalanine-based serine protease inhibitors induce caspase-mediated apoptosis. *European Journal of Pharmacology* 2009; 602: 15-22.
4. Murn J, Urleb U, Mlinaric-Rascan I: Internucleosomal DNA cleavage in apoptotic WEHI 231 cells is mediated by chymotrypsin-like protease. *Genes to Cells* 2004; 9: 1103-1111.
5. Elmore S: Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4): 495-516.
6. Igney F H, Krammer P H: Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2: 277-288.
7. Liu Y, Borchert GL, Surazynski A, Hu C-A, Phang JM: Proline oxidase activates both intrinsic and extrinsic pathways for apoptosis: the role of ROS/superoxides, NFAT and MEK/ERK signaling. *Oncogene* 2006; 25: 5640-5647.
8. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J: NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochemical Pharmacology* 2006; 72(11):1493-1505.
9. Chenguang F, Yang J, Engelhardt JF: Temporal pattern of NFkB activation influences apoptotic cell fate in a stimuli-dependent fashion. *Journal of Cell Science* 2002; 115: 4843 - 4853.
10. <http://www.stat.rice.edu/~siefert/Research/NfKB.html>, povzeto 22. maja 2014.
11. Arenzana-Seisdedos F, Turpin P, Rodriguez M, Thomas D, Hay R T, Virelizier J L, Dargemont C: Nuclear localization of Ikb α promotes active transport of NF-kB from the nucleus to the cytoplasm. *Journal of Cell Science* 1997; 110: 369 - 378.
12. Martindale J L, Holbrook N J; Cellular Response to Oxidative Stress: Signaling for Suicide and Survival. *Journal of cellular physiology* 2002; 192: 1-15.

13. Gaffney BJ: The chemistry of Spin Labels. In Spin Labeling I, Theory and Applications; Berliner L. J., Eds.; Academic Press Inc.: New York, 1976.
14. Hafner A, Hrast M: Amfifilni nitroksidni radikali: sinteza s pomočjo mikrovalov. Raziskovalna naloga; Ljubljana, 2007.
15. del Olmo E, Macho A, Alves M, López JL, el Banoua F, Muñoz E, San Feliciano A: Long-Chain Aminoalcohol and Diamine Derivates Induce Apoptosis through a Caspase-3 Dependant Pathway. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2002; 12: 2621-2626.
16. Hafner A, Hrast M, Pečar S, Mravljak J: Microwave-assisted synthesis of amphiphilic spin probes. *Tetrahedron Letters* 2009; 50: 564-566.
17. <http://www.lgcstandardsatcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=HTB-22&Template=cellBiology>, povzeto 17. julija 2012
18. <http://www.lgcstandardsatcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CRL-10317&Template=cellBiology>, povzeto 17. julija 2012.
19. <http://www.lgcstandardsatcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CRL-10317&Template=cellBiology>, povzeto 17. julija 2012.
20. Ochieng J, Basolo F, Albin A, Melchiori A, Watanabe H, Elliott J, Raz A, Parodi S, Russo J: Increased invasive, chemotactic and locomotive abilities of c-Ha-ras-transformed human breast epithelial cells. *Invasion Metastasis* 1991; 11(1):38-47.
21. <http://www.lgcstandardsatcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=HTB-14&Template=cellBiology>, povzeto 17. julija 2012.
22. <http://www.abcam.com/U87-MG-Human-glioblastoma-astrocytoma-epithelial-like-cell-line-Nuclear-Lysate-ab14903.html>, povzeto 17. julija 2012.
23. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/90112714?lang=en®ion=SI>, povzeto 17. julija 2012.
24. <http://www.lgcstandardsatcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=TIB-152&Template=cellBiology>, povzeto 17. julija 2012.

25. Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, Bazan NG, Blagosklonny MV: Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death and Differentiation* 2009; 16: 1093-1107.
26. http://www.bdbiosciences.com/external_files/pm/doc/tds/cell_bio/live/web_enabled/67201U_556574.pdf, povzeto 15. avgusta 2012.
27. Hafner A: Vloga gama1-sintropina pri posredovanju s katepsinom x uravnavane nevrotrofične aktivnosti gama-enolaze. *Diplomska naloga*; Ljubljana, 2009.
28. Erjavec A: Vloga polifenol-oksidge, peroksidaz in fenilalanin-deaminaze pri porjavenju krompirja. *Diplomska naloga*; Ljubljana, 2007.
29. Avberšek Lužnik I, Čelhar T, Karas Kuželički N, Milek M, Pajič T: Vaje iz klinične kemije 1: Študijsko gradivo za študente UŠ farmacije. Fakulteta za
30. <http://cba.musc.edu/flowcytometry/flowcytometry.html>, povzeto 7. avgusta 2012
31. Pucci B, Kasten M, Giordano A: Cell cycle and Apoptosis. *Neoplasia Vol.2 July-August 2000*; 4: 291-299.
32. <https://www.sigma-aldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/apoafbul.pdf>, povzeto 27. maja 2014
33. http://en.wikipedia.org/wiki/Propidium_iodide, povzeto 27. maja 2014.
34. Trayner ID, Rayner AP, Freeman GE, Farzaneh F: Quantitative multiwell myeloid differentiation assay using dichlorodihydrofluorescein diacetate or dihidrorhodamine 123. *Journal of Immunological Methods* 1995; 186: 275-284.
35. Zang Y, Beard RL, Chandraratna RAS, Kang JX: Evidence of a lysosomal pathway for apoptosis induced by the synthetic retinoid CD437 in human leukemia HL-60 cells. *Cell Death and Differentiation* 2001; 8: 477-485.
36. <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp07510.pdf>, povzeto 19. julija 2012.
37. <http://blog.labplanet.com/2011/01/03/electrophoresis/>, povzeto 8. avgusta 2012.
38. Michael K, Anning L: NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nature immunology* 2002; 3: 221 - 227.
39. Cogswell CP, Kashatus FD, Keifer AJ et al: NF- κ B and I κ B α are found in the mitochondria: Evidence for regulation of mitochondrial gene expression by NF- κ B. *The journal of biological chemistry* 2002. 278: 2963 - 2968.