

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Keemia instituut

Bioorgaanilise keemia õppetool

Mattias Kaspar Krõlov

Elulevuse profiili mõõtmine resasuriini meetodil glioblastoomi rakuliinis U87-MG hüpoksilistes ja normoksilistes tingimustes

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Keemia

Juhendaja: Darja Lavõgina, PhD

Tartu 2023

INFOLEHT

Elulevuse profiili mõõtmine resasuriini meetodil glioblastoomi rakuliinis U87-MG hüpoksilistes ja normoksilistes tingimustes

Bakalaureusetöö raames koostati glioblastoomi rakuliini U87-MG elulevuse profiil hüpoksilistes ja normoksilistes tingimustes pärast rakkude 48 h töötlust kindla ensüümiklassi inhibiitoriga. Resasuriini meetodil mõõdeti kokku 11 inhibiitorit ja üks kontrollühend (lomustiin). Inhibiitorite sihtmärkideks olid epigeneetiliste modifikatsioonidega või rakutsükliga seotud ensüümid. Inhibiitorite omavaheliseks võrdlemiseks leiti iga ühendi jaoks kontsentratsioon, mille puhul elulevus langes 50% võrra. Töö tulemusena selgus rakutsükliga seotud ensüümide inhibiitorite kõrgem efektiivsus.

Märksõnad: Glioblastoom, rakukultuur, elulevuse mõõtmine, hüpoksia, normoksia, inhibiitorid, epigeneetilised modifikatsioonid, rakutsükkel

CERCS koodid: P310 Proteiinid, ensüömoloogia; B740 Farmakoloogia, farmakognoosia, farmaatsia, toksikoloogia; B200 Tsütoloogia, onkoloogia, kantseroloogia

Profiling the viability of glioblastoma cell line U87-MG using the resazurin assay following treatment in hypoxic and normoxic conditions

In the course of this work, viability of glioblastoma cell line U87-MG was profiled in hypoxic and normoxic conditions. The profile was compiled based on the results of the resazurin assay following 48 h treatment of the cells with various enzyme inhibitors. A total of 11 inhibitors and one control substance (lomustine) were tested. Among the targets of the inhibitors were enzymes responsible for epigenetic modifications or regulation of the cell cycle. To compare the inhibitors with each other, inhibitor concentration resulting in 50% reduction of cell viability was calculated for each compound. As a general trend, higher efficacy was observed for cell cycle inhibitors in both normoxic and hypoxic condition.

Keywords: Glioblastoma, cell culture, viability profiling, hypoxia, normoxia, inhibitors, epigenetic modifications, cell cycle

CERCS codes: P310 Proteins, enzymology; B740 Pharmacological sciences, pharmacognosy, pharmacy, toxicology; B200 Cytology, oncology, cancerology

SISUKORD

| | |
|---|----|
| INFOLEHT | 2 |
| 1. KASUTATUD LÜHENDID | 5 |
| 2. SISSEJUHATUS | 7 |
| 3. KIRJANDUSE ÜLEVAADE | 8 |
| 3.1. Töös kasutatud rakuliin | 8 |
| 3.2. Hüpkösiä..... | 8 |
| 3.3. Epigeneetilised ja rakutsükliga seotud sihtmärgid | 9 |
| 3.3.1. Valgu arginiini metüültransferaasid | 9 |
| 3.3.2. Histoöni deatsetülaasid..... | 10 |
| 3.3.3. Histoöni lüsiini N-metüültransferaasid | 10 |
| 3.3.4. DNA metüültransferaasid..... | 11 |
| 3.3.5. Rakutsükkel ning sellega seotud proteiinkinaasid | 12 |
| 3.3.5.1. Tsükliinist sõltuvad kinaasid | 12 |
| 3.3.5.2. Aurora kinaasid | 13 |
| 3.4. Rakkude elulevuse mõõtmine resasuriini meetodil..... | 13 |
| 4. EKSPERIMENTAALNE OSA..... | 15 |
| 4.1. Kasutatud rakuliin ja reagendid..... | 15 |
| 4.2. Kasutatud masinad | 15 |
| 4.3. Lühikirjeldus rakkude kultuurishoidmisest..... | 16 |
| 4.4. DAPI test kui saastatuse kontroll enne katsetega alustamist..... | 16 |
| 4.5. Elulevuse mõõtmine resasuriini meetodil | 16 |
| 4.5.1. Rakuarvu optimeerimine elulevuse mõõtmiseks..... | 16 |
| 4.5.2. Elulevuse mõõtmise põhimõte inhibiitoritega töötuse korral | 16 |
| 4.5.3. Rakkude elulevuse mõõtmine resasuriini meetodil..... | 17 |
| 4.6. Kasutatud tarkvara ning andmetöötlus | 17 |

| | |
|---|----|
| 4.6.1. Kasutatud tarkvara..... | 17 |
| 4.6.2. Andmetöötlus | 17 |
| 5. TULEMUSED JA ARUTELU..... | 19 |
| 5.1. Rakuarvu lineaarse ala optimeerimine | 19 |
| 5.2. Elulevuse mõõtmine U87-MG rakuliinis | 20 |
| 5.2.1. Elulevuse mõõtmine epigeneetiliste modifikatsioonidega seotud ensüümide inhibeerimise järel | 21 |
| 5.2.1.1. Valgu arginiini metüültransferaasid | 21 |
| 5.2.1.2. Histooni deatsetülaasid..... | 21 |
| 5.2.1.3. Histooni lüsiini N-metüültransferaasid | 22 |
| 5.2.1.4. DNA metüültransferaasid..... | 22 |
| 5.2.2. Elulevuse mõõtmine rakutsükliga seotud proteiinkinaaside inhibeerimise järel ... | 23 |
| 5.2.2.1. Tsükliinist sõltuvad kinaasid | 23 |
| 5.2.2.2. Aurora kinaasid | 23 |
| 5.3. Olulisimad trendid..... | 25 |
| 5.3.1. Epigeneetiliste modifikatsioonidega seotud ensüümide inhibiitorid | 25 |
| 5.3.2. Rakutsükliga seotud ensüümide inhibiitorid | 27 |
| 5.4. Resasuriini meetodi usaldusväärsuse hindamine elulevuse mõõtmisel | 28 |
| 5.5. Edasised väljundid..... | 29 |
| 6. KOKKUVÕTE..... | 30 |
| 7. SUMMARY | 31 |
| 8. KASUTATUD KIRJANDUS | 33 |
| 9. LISAD | 41 |
| Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks | 50 |

1. KASUTATUD LÜHENDID

aDMA – asümmeetriliselt dimetüülitud arginiin

ATCC – American Type Culture Collection (firma nimi)

ATP – adenosiin-5'-trifosfaat

AURK – Aurora kinaasid (ingl *Aurora kinases*)

CDK – tsükliinist sõltuvad kinaasid (ingl *cyclin dependent kinases*)

DAPI – 2-(4-amidiinofenüül)-1H-indool-6-karboksamidiin

DNA – desoksüribonukleinhape

DNMT – DNA metüültransferaasid (ingl *DNA methyltransferases*)

EDTA – etüleendiamiintetraatsetaat

EZH2 – hariliku äädikakärbse valgu E(z) imetajates leiduv homoloog, tüüp 2 (ingl *enhancer of zeste homolog 2*)

FBS – veiseloote seerum (ingl *Fetal Bovine Serum*)

GBM – glioblastoom (ingl *glioblastoma*)

HAT – histooni atsetülaasid (ingl *histone acetylases*)

HDAC – histoonide deatsetülaasid (ingl *histone deacetylases*)

HIF – hüpopksiast indutseeritud transkriptsioonifaktorid

HMT – histooni lüsiini N-metüültransferaasid (ingl *histone lysine N-methyltransferases*)

HPLC-ESI-MS – kõrgefektiivne vedelikkromatograafia-elektropihustusionisatsioon-massispektromeetria

IC₅₀ – uuritava aine kontsentratsioon, mille juures on aine toimest tuleneva mõõdetava signaali väärtus pool maksimaalsest

MMA – monometüülitud arginiin

NAD, NADH – nikotiinamiid-adeniin dinukleotiid ja selle redutseeritud vorm

NADP, NADPH – nikotiinamiid-adeniin dinukleotiid fosfaat ja selle redutseeritud vorm

pIC₅₀ – negatiivne logaritm uuritava aine kontsentratsioonist, mille juures on aine toimest tuleneva mõõdetava signaali väärtus pool maksimaalsest

PRMT – valgu arginiini metüültransferaasid (ingl *protein arginine methyltransferases*)

SAHA – vorinostat ehk suberoüülaniliid-hüdroksoamhape (ingl *suberoylanilide hydroxamic acid*)

SAM – S-adenosüül-L-metioniin

sDMA – sümmeetriliselt dimetüülitud arginiin

2. SISSEJUHATUS

Glioblastoom (GBM) on agressiivne kesknärvisüsteemi kasvaja, mille puhul on täheldatud ka patsientide suhteliselt lühikest elumust [1] (ilma ravita on diagnoosijärgselt elumuse mediaaniks hinnatud 3 kuni 4 kuud [2]). GBM-i ravivalikuteks on kirurgiline, kiiritus- ja keemiaravi ning nende kombinatsioonid. Lisaks on kliiniliste uuringute tulemusena selgunud, et temosolomiidi (keemiaravim, mis kutsub rakusurma esile DNA kahjustamisel selle alküülimise kaudu [3]) manustamisel samaaegselt kiiritusraviga, on patsientide elumuse mediaaniks 14,6 kuud. Võrdluseks toodi samas uuringus välja, et ainult kiiritusravi korral on patsientide elumuse mediaaniks 12,1 kuud. [4]

Kuigi rakukultuuri tasemel ei ole võimalik modelleerida kõiki elusorganismis toimuvaid protsesse ja füsioloogilisi parameetreid, käituvad rakukultuuris kasvatatud rakuliinid lihtsustatud mudelitena ning on seetõttu esialgseteks uuringuteks piisavalt adekvaatsed infoallikad. Töö eesmärk on resasuriini meetodil hinnata GBM rakuliini U87-MG rakkude elulevust pärast 48 h töötlust epigeneetiliste modifikatsioonidega või rakutsükliga seotud ensüümide inhibiitoritega normoksilistes (20% O₂ ruumala järgi) ja hüpoksilistes (1% O₂ ruumala järgi) tingimustes.

Inhibiitorite valim sai koostatud sihtmärkide tüübi alusel, mis selgitati välja tööruhmas varasemalt teostatud töö käigus [5]. Valimisse võeti eelistatult kliinilistes uuringutes sees olnud ühendeid [6] ning ühendeid, mille jaoks on esmane info terapeutilise akna kohta olemas. Võrreldes tööruhmas varasemalt teostatud tööga, laiendati antud töös inhibiitorite ja konkreetsete sihtmärkide hulka. Selleks võeti juurde valgu arginiini metüültransferaaside (PRMT) ja tsükliinist sõltuvate kinaaside (täpsemalt CDK4/6) inhibiitoreid.

Elulevuse katsete tulemuste põhjal leiti iga inhibiitori jaoks pIC₅₀ väärtus ja selle alusel ka IC₅₀ väärtus. IC₅₀ väärtus on uuritava ühendi kontsentratsioon, mille juures on aine toimest tuleneva mõõdetava signaali väärtus pool maksimaalsest ning pIC₅₀ on selle negatiivne logaritm. pIC₅₀ väärtuste alusel oli võimalik iseloomustada ühendite mõju rakkudele normoksilises ja hüpoksilises keskkonnas ning samuti võrrelda ühendeid omavahel ja kirjanduse andmetega. Sel viisil sooviti leida uuritavate ühendite seast kõige efektiivsemad inhibiitorid, mille toimeid oleks võimalik edasi uurida ning pikemas perspektiivis potentsiaalselt rakendada GBM sihtmärkravis.

3. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

3.1. Töös kasutatud rakuliin

Töös kasutati GBM-i rakuliini U87-MG, mis pärines firmast American Type Culture Collection (ATCC). U87-MG on üks rakuliinidest, mille eraldas Jan Ponten 1966-1969 aastatel GBM-i põdevalt meessoost patsiendilt. Rakuliin kasvab plaadile kinnitunult ning seetõttu kasutati selle käigus hoidmisel polü-L-lüsiiniga kaetud Petri tasse [7]. 2023. a mai seisuga on meditsiiniuuringute-alaste teadusartiklite andmebaasis PubMed refereeritud üle 5800 teadustöö, mille märksõnade seas on U87 (võrdluseks on teiste GBM-i tuntud rakuliinide U251 ja T98G puhul vastete arvud vastavalt üle 3800 ja üle 1600) [8–10].

3.2. Hüpoksia

Hüpoksia on seisund, kus rakuvälises keskkonnas on puudulik hapnikuga varustus. Füsioloogiline normoksia (olukord, kus organismi varustus hapnikuga on piisav) on erinev organismi eri kudede jaoks, kuid keskmiselt on hinnatud, et *in vitro* tingimustes vastab sellele olukord, kus rakkude söötme kohal oleva atmosfääri hapniku sisaldus mahuprotsendina on 2–9% [11]. Sellest veelgi väiksema hapnikusisaldusega tingimusi on tuvastatud paljude kasvajate (sh GBM-i) kasvukeskkondades, mistõttu on ka hüpoksias kasvatatud rakkude uurimine oluline [12,13]. *In vitro* katsete puhul jäljendatakse hüpoksiat inkubeerides rakke tingimustes, kus söötme kohal oleva atmosfääri hapnikusisaldus on 0,3–1,0% [14].

Vähirakkude korral on märgatud hüpoksia mõju rakkude ainevahetusele. Hüpoksilistes tingimustes stabiliseeruvad vähirakkudes hüpoksiast indutseeritud transkriptsioonifaktorid (HIF) [15]. Stabiliseeritud HIF-1 α aktiveerib muuhulgas glükoosi transportivate molekulide ja glükolüütiliste ensüümide ekspressiooni. Need ensüümid katalüüsivad protsesse, milles mittetäieliku oksüdeerumise käigus tekkivad vaheühendid on anaboolsetes reaktsioonides kasutusel nukleotiidide, fosfolipiidide ja aminohapete sünteesiks. Taoliste molekulide süntees võimaldab vähirakkudel paremini kasvada ja jaguneda. [16]

Lisaks on hüpoksilistes tingimustes märgatud vähirakkudes ka teisi muutusi, näiteks genoomi suurenenud ebastabiilsust, mille puhul on täheldatud DNA nukleotiidjärjestust parandava ensüümi Mlh1 ekspressiooni vähenemist. See tähendab, et komplementaarsete ahelate sünteesi käigus DNA järjestusse tekkinud vead jäävad parandamata, mis omakorda võib viia uute mutatsioonide tekkeni ja mõjutada vähirakkude vastuvõtlikkust ravile [17].

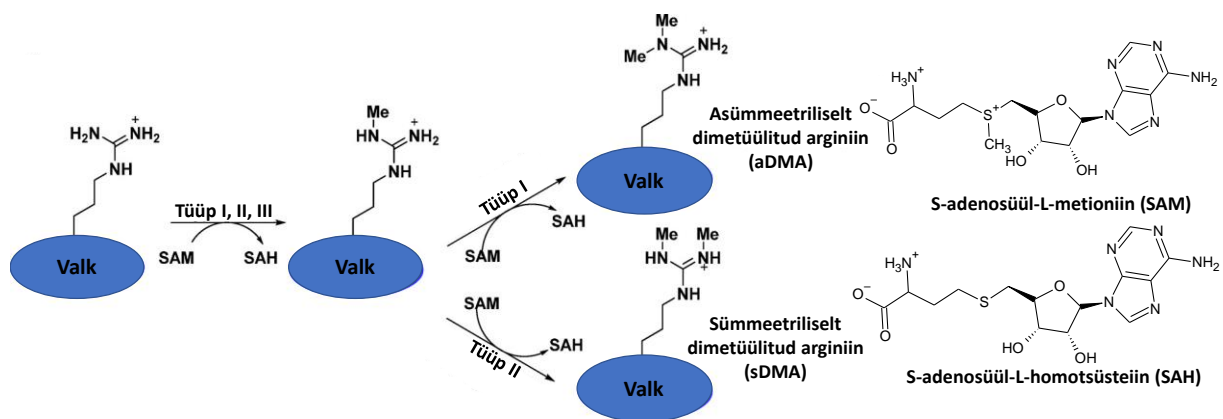
3.3. Epigeneetilised ja rakutsükliga seotud sihtmärgid

Töös uuritavad ühendid (lisa 1) on väikese molekulmassiga inhibiitorid, mis on suunatud kuuele erinevale ensüümiklassile. Neist neli vastutavad epigeneetiliste modifikatsioonide lisamise või eemaldamise eest (valgu arginiini metüültransferaasid, histooni deatsetülaasid, DNA metüültransferaasid ja histooni lüsiini N-metüültransferaasid) ja kaks teostavad rakutsükli toimimise seisukohalt olulist fosforüülimist (tsükliinist sõltuvad kinaasid ja Aurora kinaasid).

Epigeneetiliste modifikatsioonide puhul viivad ensüümid DNA või histoonide koosseisu funktsionaalrühmi, mõjutades seega geeniekspressiooni. Need modifikatsioonid on pöörduvad ning nende hulka kuuluvad näiteks DNA metüülimine või histoonide metüülimine ja atsetüülimine. [18]

3.3.1. Valgu arginiini metüültransferaasid

Valgu arginiini metüültransferaasid (PRMT) katalüüsivad metüülrühma kandmist S-adenosüül-L-metioniinilt (SAM) valkude arginiinijääkide guanidiinorühma lämmastikele. PRMT katalüüsi tulemusena tekib kas monometüülitud arginiin (MMA), asümmeetriliselt dimetüülitud arginiin (aDMA) või sümmeetriliselt dimetüülitud arginiin (sDMA). Metüülimise tüübi alusel jaotatakse PRMT-d kolme klassi: tüüp I, II ja III (joonis 1), mis katalüüsivad vastavalt MMA ja aDMA teket, MMA ja sDMA teket ning ainult MMA teket. [19]



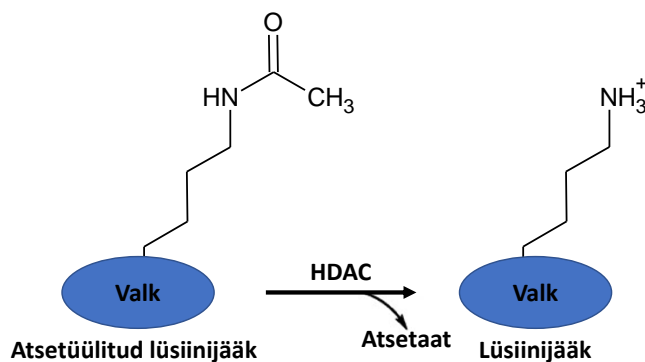
Joonis 1. Tüüp I, II ja III PRMT-de poolt katalüüsitud reaktsioonid koos metüülrühma doonoriga (SAM). Joonis on kohandatud artiklist [20]. Siin ja edaspidi tähistab SAH S-adenosüül-L-homotsüsteiini.

PRMT1 funktsioon DNA transkriptsiooni aktiveerimises seisneb asjaolus, et histooni arginiinijääkide asümmeetriline metüülimine soodustab histooni atsetülaaside (HAT) seostumist vastavale histoonile [21]. Arginiinijääkide positiivse laengu eemaldamisel

atsetüülimise kaudu väheneb vastastiktoime negatiivselt laetud DNA ja histooni vahel, mis hõlbustab DNA kaksikahela lahtikeerdumist histooni ümber ning seekaudu DNA transkriptsiooni. See-eest on sDMA esinemist, mille teket katalüüsib nt PRMT5, seostatud vähenenud DNA transkriptsiooniga, sest HAT-de seondumine on raskendatud. Näiteks on histooni H3 sümmeetrilist metüülimist PRMT5 poolt seostatud kasvajate arengut mahasuruvate geenide vähenenud ekspressiooniga. [22] Kokkuvõttes on mõlemat tüüpi PRMT-de kõrgeks ekspresseeritud taset seostatud vähkkasvajate tekke ja arenguga. Töös on uuritavateks PRMT-de inhibiitoriteks MS023 ja onametostat, mis inhibeerivad vastavalt PRMT1/3/4/6/8 (tüüp I) ja PRMT5 (tüüp II). Onametostat inhibeerib PRMT5, seostudes SAM-i seondumisalasse [23]. MS023 inhibeerib tüüp I PRMT-sid, seostudes metüülitava arginiini seondumisalasse [24].

3.3.2. Histooni deatsetülaasid

Histooni deatsetülaasid (HDAC) katalüüsivad atsetüülrühma eemaldamist histooni lüsiinjäägi aminorühmalt (joonis 2) (st katalüüsitakse HAT-de suhtes vastassuunalist reaktsiooni), mille tulemusena suureneb vastastikmõju histooni ja DNA kaksikahela vahel. See võimaldab DNA kaksikahelal tihedamalt ümber histooni keerduda, reguleerides seeläbi DNA transkriptsiooni. HDAC-de inhibeerimise tulemusena on täheldatud rakuväliste ja rakusiseste apoptootiliste signaaliradade käivitumist ning samuti kasvaja supressorvalgu p53 aktiivsuse suurenemist, mis viib rakutsükli peatumiseni ja apoptoosini [25]. Töös uuritav HDAC inhibiitor vorinostat (SAHA) seostub HDAC-de aktiivtsentri tsingiiooniga, inhibeerides seekaudu ensüümi [26].

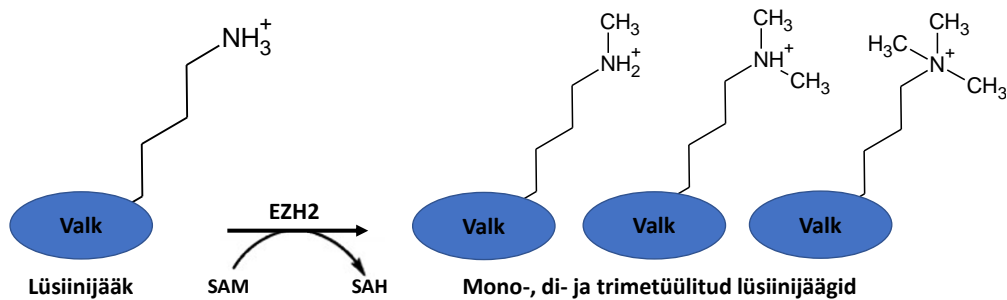


Joonis 2. HDAC-de poolt katalüüsitud reaktsioon.

3.3.3. Histooni lüsiini N-metüültransferaasid

Histooni lüsiini N-metüültransferaasid (HMT) katalüüsivad metüülrühma ülekandmist SAM-lt histooni lüsiini lämmastikule (joonis 3). Töös keskendutakse ühele konkreetsele HMT-le, *enhancer of zeste homolog 2*-le (EZH2). GBM-i korral on täheldatud, et suurenenud EZH2

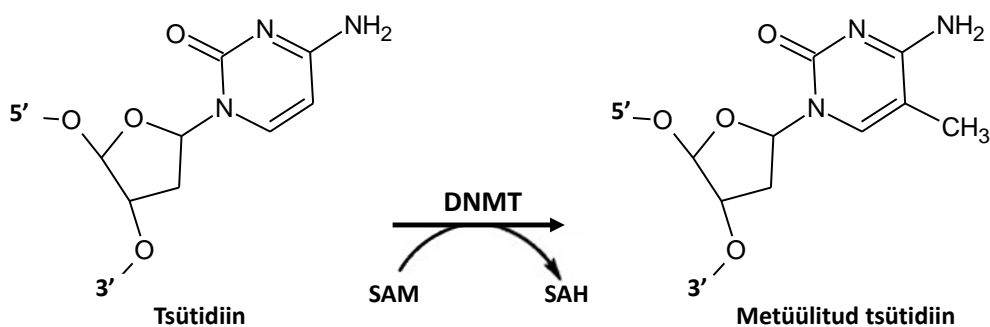
ekspressioon suurendab transkriptsioonifaktori STAT3 ekspressiooni, mille aktiivsust on omakorda seostatud vähirakkude vohamise ning sissetungivusega (invasiivsusega) [27,28]. Lisaks on ka teiste vähkkasvajate puhul täheldatud EZH2 efekti kasvaja supressorvalgu p21 geeni vaigistamises [29]. Töös on uuritavaks EZH2 inhibiitoriks tasemetostaat. Tasemetostaat konkureerib SAM-ga EZH2 seondusmisala pärast ning inhibeerib seekaudu ensüümi [30].



Joonis 3. HMT-de poolt katalüüsitud reaktsioon.

3.3.4. DNA metüültransferaasid

DNA metüültransferaasid (DNMT) katalüüsivad metüülrühma ülekannet SAM-lt DNA tsütosiinijääkidele (joonis 4). Tsütosiinijääkide ülemetüülimine võib põhjustada geenide vaigistamise, mis võib omakorda soodustada vähirakkudes genoomi ebastabiilsuse suurenemist ja mutatsioonide teket [31]. Näiteks on tuvastatud kasvaja supressorgeenide transkriptsiooni vaigistamist DNA tsütosiinisaarte (ingl *CpG islands*; alad, kus DNA ahelas järgneb tsütosiinile guaniin) ülemetüülimise tõttu, soodustades seega vähirakkude levikut [32].



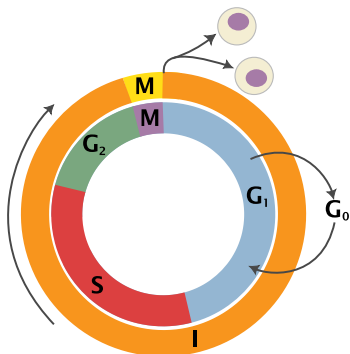
Joonis 4. DNMT-de poolt katalüüsitud reaktsioon.

Töös on uuritavaks DNMT inhibiitoriks asatsütidiin. Ainevahetuse käigus moodustub asatsütidiinist 5-asa-2'-desoksütüüdiinifosfaat, mida on võimalik DNA replikatsioonil substraadina kasutada. Selle tulemusena viiakse 5-asa-2'-desoksütüüdiini nukleotiidid DNA kaksikahelasse, kus DNMT-d võivad seda tsütosiinina ära tunda. Tsütosiini metüülimise mehhanism põhineb reaktsioonil, kus DNMT ja tsütosiini 6. süsiniku vahel moodustub ajutine

kovalentne side, mis seejärel laguneb β -elimineerimise käigus tsütosiini 5. süsiniku kaudu. Asatsütidiinis on 5. süsinik asendatud lämmastikuga, seega ei ole DNMT ja asatsütidiini vahelist kovalentset sidet võimalik lõhkuda ning ensüüm jääb asatsütidiini külge seotuks. [33]

3.3.5. Rakutsükkel ning sellega seotud proteiinkinaasid

Rakutsükli eesmärk on kahekordistada rakus olev DNA ja valguline materjal, näiteks tsentrosoomide ja mikrotuubulite komponendid, ning jaotada see võrdselt rakujagunemise käigus tekkivate tütarakkude vahel. Rakutsükkel jaotatakse neljaks faasiks: G_1 , S, G_2 ja M. G_1 , S ja G_2 faasid omakorda moodustavad interfaasi (I; joonis 5). G_1 faasis rakk kasvab (kordistatakse rakus olevaid organelle ja osa valgulisest materjalist) ning faasi lõpus otsustatakse rakusiseste ja -väliste signaalide alusel rakujagunemise soodsuse üle. S faasis kahekordistatakse rakus esinevad kromosoomid. G_2 faasis toimub valgulise materjali jõuline kordistamine ja mikrotuubulite süntees. G_2 faasi lõpus otsustatakse rakusiseste ja -väliste signaalide alusel, kas alustatakse kromatiini kondensatsiooni ja kromosoomide joondusega. M faasis jaotatakse kahekordistunud kromosoomid ja raku sisu võrdselt kahe moodustuva tütaraku vahel. Lisaks on olemas ka G_0 faas, kus rakk on n-ö soikeseisundis ning millesse rakk võib G_1 faasis esinevate ebasoodsate tingimuste tõttu minna. [34,35]

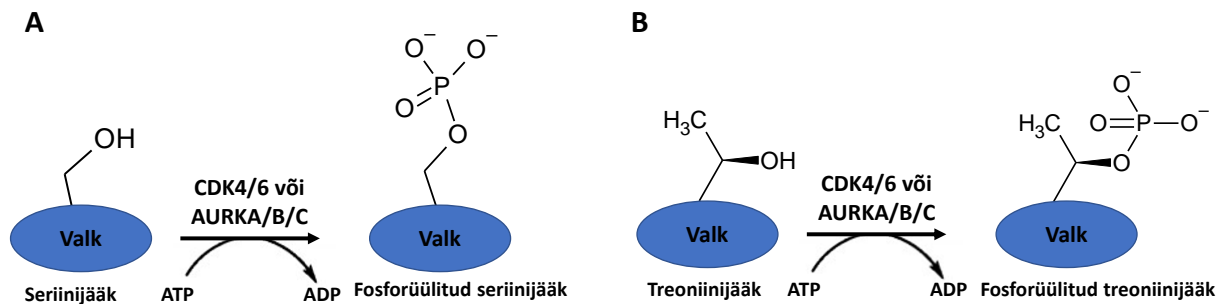


Joonis 5. Rakutsükkel. [36], CC BY-SA 3.0.

3.3.5.1. Tsükliinist sõltuvad kinaasid

Proteiinkinaasid, sh tsükliinist sõltuvad kinaasid (CDK) katalüüsivad ATP-lt fosfaatrühma ülekannet valgu seriini- või treoniini jääkidele (joonis 6). CDK-d reguleerivad rakutsükli üleminekuid (nt G_1 faasist S faasi), fosforüülides muuhulgas nn retinoblastoomi valku. Fosforüülitud retinoblastoomi valk kaotab aktiivsuse, mistõttu väheneb selle kaudu toimuv E2F transkriptsioonifaktorite inhibeerimine. See omakorda võimaldab ekspresseerida geene, mis on vajalikud rakutsükli üleminekuks G_1 faasist S faasi. Töös keskendutakse peamiselt CDK4/6-le, mille puhul on vähirakuliinides täheldatud suurenenud ekspressiooni. [37] CDK4/6 muutub

katalüütiliselt aktiivseks, kui sellega on seostunud tsükliin D [38]. Töös on uuritavaks CDK4/6 inhibiitoriks palbotsikliib, mis konkureerib ATP-ga CDK4/6-le seondumisel [39].



Joonis 6. CDK4/6 ja Aurora kinaaside (AURKA/B/C) poolt katalüüsitud valgu seriiniinjäägi (A) või treoniiniinjäägi (B) fosforüülimine.

3.3.5.2. Aurora kinaasid

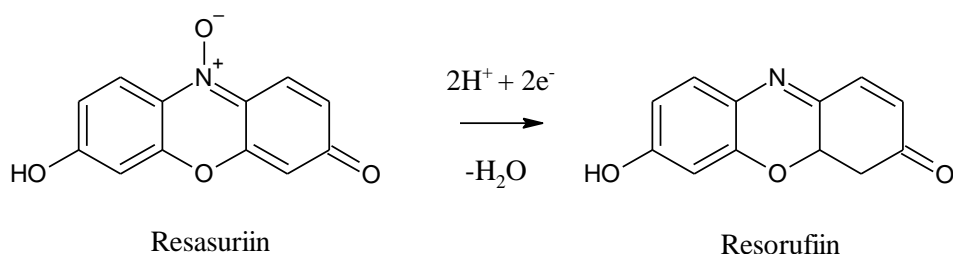
Aurora kinaasideks (AURK) on Aurora A, B ja C, millel kõigil on oluline roll rakutsükliis. AURK-d katalüüsivad ATP-lt fosfaatühme ülekandmist valgu seriini- või treoniiniinjääkidele (joonis 6). AURK-de aktiivsuse kasv algab hilises S faasis, saavutades maksimumi M faasis. AURK-d osalevad tsentrosoomi kahekordistamisel ja eraldamisel, mikrotuubulite ja tütarchromatiidide kinetokooride interaktsioonil ning käävinidistiku moodustamisel, mille tulemusena on rakul võimalik kahekordistatud organellid ja geneetiline materjal kahe moodustuva tütaraku vahel võrdselt jaotada. [40] Seega oleks AURK-de inhibeerimise tulemusena võimalik takistada vähirakkude edasist jagunemist. Töös on uuritavateks AURK-de inhibiitoriteks danusertiib, alisertiib, CYC116, VX689 ja barasertiib. Kõik eelmainitud inhibiitorid konkureerivad ATP-ga AURK-dele seondumisel [41–45].

3.4. Rakkude elulevuse mõõtmine resasuriini meetodil

Resasuriin on rakumembraani läbiv redoksindikaator, mida saab kasutada rakkude elulevuse hindamisel [46]. Resasuriini naatriumsool lahustub erinevates biokeemias kasutatavates veepõhistes puhvrites (k.a antud töös kasutatav *Dulbecco's phosphate-buffered saline* ehk DPBS, mis puhverdab pH vahemikus 7,0-7,6 [47]), mis võimaldab seda otse rakkudega katseplaadile pipeteerida. Lisaks lahustuvusele veepõhistes puhvrites, läbivad resasuriin ja selle redutseeritud vorm resorufiin rakumembraani, mis võimaldab teha jooksvalt mõõtmisi rakkudele lisatud lahustes [46].

Mida suurem on rakkude arv süvendis, seda suuremal määral redutseerub resasuriin resorufiiniks [48] – seejuures on oluline just metaboolselt aktiivsete rakkude arv. Metaboolselt

aktiivsete rakkude ainevahetuse käigus toodetakse erinevaid ensüüme – nt reduktaase, mille kofaktoriteks on nikotiinamiid-adeniin dinukleotiidi redutseeritud vorm (NADH) ja nikotiinamiid-adeniin dinukleotiid fosfaadi redutseeritud vorm (NADPH). Ensüümkatalüüsi kaudu saavad NADH ja NADPH resasuriini resorufiiniks redutseerida [49]. Resasuriini ja resorufiini (joonis 7) neeldumismaksimumid on vastavalt lainepikkustel 610 nm ja 575 nm [50], samuti on resorufiini puhul tegu fluorestseeruva ühendiga. Nende omaduste alusel saab rakkude elulevuse mõõtmisi resasuriiniga teostada kahes formaadis: kolorimeetrilises ja fluorimeetrilises.



Joonis 7. Resasuriini redutseerumine resorufiiniks.

Kolorimeetrilise mõõtmise aluseks on resasuriini ja resorufiini erinevad neeldumismaksimumid nähtavas alas. Resasuriini redutseerumisel resorufiiniks väheneb resasuriini kontsentratsioon lahuses, mistõttu väheneb (Lambert-Beer'i seaduse põhjal) lahuse neelduvus lainepikkusel 610 nm. Samal ajal suureneb reaktsiooni käigus resorufiini kontsentratsioon, mistõttu suureneb neelduvus lainepikkusel 575 nm [48]. Saadud andmete põhjal on võimalik leida neelduvuste suhte muutus ajas ja muutuse sõltuvus rakkude arvust süvendis.

Fluorimeetrilise mõõtmise aluseks on resorufiini fluorestseeruvad omadused. Mõõtmiste teostamisel ergastatakse süvendit lainepikkustel 530-570 nm ja fluorestsentsi mõõdetakse lainepikkustel 585-590 nm [48]. Reaktsiooni käigus suureneb resorufiini kontsentratsioon rakke katvas lahuses ning seetõttu ka fluorestsentsi intensiivsus. Mõõtmistulemuste põhjal on võimalik leida fluorestsentsi muutus ajas ja samuti muutuse sõltuvus rakkude arvust süvendis.

Varasemalt mainitud ensüümide inhibeerimise tulemusena võib väheneda rakkude elulevus, mistõttu redutseeritakse resasuriini vähem. Kuna inhibiitorite efekt sõltub kontsentratsioonist, on erinevate inhibiitorite kontsentratsioonidega töödeldud rakkudega süvendite korral näha erinevaid elulevuse muutusi ja seega signaali väärtusi. Selle põhjal on võimalik leida elulevuse muutuse sõltuvus inhibiitori kontsentratsioonist.

4. EKSPERIMENTAALNE OSA

4.1. Kasutatud rakuliin ja reagentid

Töös kasutatud U87-MG rakuliin pärines firmast American Type Culture Collection (ATCC). Rakkude kultuurishoidmisel kasutati rakusöödet *Eagle's Minimum Essential Medium* firmast ATCC, veepõhist fosfaatpuhvrit *Dulbecco's phosphate-buffered saline* (Corning) ja 0,25% trüpsiinilahust (Corning). Kõikide eelmainitud reagentide täpsed koostisosad koos kontsentratsioonidega on leitavad lisa 2 kuni 4 alt.

Elulevuse mõõtmiseks vajalik resasuriini naatriumsool (CAS: 62758-13-8) pärines firmast Sigma Aldrich. Reagentipudeli värvaine sisaldus oli > 75% [51]. DAPI testide jaoks vajalik 2-(4-amidiinofenüül)-1H-indool-6-karboksamidiin (DAPI) pärines firmast Invitrogen (puhtus > 95%). Lisaks kasutati DAPI testi jaoks plaadi ettevalmistusel rakkude fikseerimiseks metanooli (Riedel-de Haën, puhtus > 99,8%). Töös uuritavatest ühenditest onametostat, MS023, tasemetostaat, palbotsikliib, danusertiib, alisertiib, CYC116, VX689 ja barasertiib ning võrdlusaine lomustiin pärinesid firmast Selleckchem. Kõigi eelmainitud ühendite puhtus oli > 99%. Vorinostat ja asatsütidiin (puhtused vastavalt > 98% ja > 95%) pärinesid firmast Cayman Chemical.

4.2. Kasutatud masinad

Rakkude käigus hoidmisel kasutati CO₂ sensoriga inkubaatoreid (Sanyo MCO-18AC(UV) ja Eppendorf Galaxy 48 R), Bio-Rad TC-10™ automaatset rakuloendajat ja Kojair BioWizard Golden Line laminaarkappi. Resasuriini mõõtmisteks kasutati BioTek Cytation 5 ja BioTek Synergy Neo plaadilugejaid, millega oli võimalik sooritada fluorestsentsi ja neelduvuse mõõtmisi. BioTek Cytation 5 plaadilugeja on lisaks integreeritud mikroskoobiga, mistõttu kasutati seda ka DAPI testi korral. Samuti kasutati BioTek Cytation 5 plaadilugejat plaatide inkubeerimiseks hüpoksilistes tingimustes. Selleks oli aparaat ühendatud gaasikontrolleriga (BioTek), mis hoidis atmosfääri koostist inkubaatoris järgnevana: 1% O₂, 5% CO₂ (rakukultuuris välja kujunenud standardsisaldus [52], mis on vajalik karbonaadil põhinevate söötmete puhverdamiseks), 94% N₂ (N5,0 puhtusaste). Normoksia puhul sisaldas gaaside segu 5% CO₂ (Linde Gas) ja ülejäänud osa oli õhk. DAPI testi jaoks kasutati DAPI filterkuubikut (BioTek), mille ergastusfilter on lainepikkusega 377 (50) nm ja emissioonfilter lainepikkusega 447 (60) nm; sulgudes on tähistatud filtri lainepikkuste vahemik. Elulevuse mõõtmistel mõõdeti aparaadi monokromaatorit kasutades neelduvusi lainepikkustel 570 nm ja 600 nm ning

fluorestsentsi intensiivsust ergastusega lainepikkusel 540 nm ja emissiooniga lainepikkusel 590 nm (pilu laius 20 nm, fookuskõrgus 8,5 mm).

4.3. Lühikirjeldus rakkude kultuurishoidmisest

Rakkude kultuurishoidmisel lähtuti Tartu Ülikooli keemia instituudi bioorgaanilise keemia õppetoolis varasemalt välja kujunenud protokollidest [53], mida vastavalt vajadusele muudeti. Rakuliini kultuurishoidmist puudutav töö viidi läbi steriilsetes tingimustes laminaarkapi all.

4.4. DAPI test kui saastatuse kontroll enne katsetega alustamist

Enne katsetega alustamist kontrolliti DAPI testiga, ega rakud bakterite või seentega saastunud ole. Rakkude mõõtmisi teostati 12-süvendilise läbipaistva põhjaga plaadiga, mis oli paar päeva enne testi ette valmistatud. Testi käigus pesti rakud üle DPBS-ga, fikseeriti rakud 15 min -20°C juures metanooliga, pesti rakud veel kord DPBS-ga ning lisati 300 nM DAPI lahus fikseeritud rakkudele. Mikroskoopiatulemuste interpreteerimine ning näidisvõrdlus saastega ja saasteta plaatide vahel on leitav lisa 5 alt.

4.5. Elulevuse mõõtmine resasuriini meetodil

4.5.1. Rakuarvu optimeerimine elulevuse mõõtmiseks

Enne rakkude töötlemist inhibiitoritega oli tarvis leida töötluks optimaalne rakuarv, mille korral jääksid negatiivse kontrolli (töötlemata rakkudega süvendi) ja inhibiitoriga töödeldud rakkudega süvendi signaalid lineaarsesse alasse. Lineaarse ala puhul on mõeldud rakuarvu piirkonda, milles mõõdetava signaali ja algselt süvendisse kantud rakuarvu vahel esineb võrdeline sõltuvus. Selle leidmiseks tehti mõõtmisi erinevate rakuarvude juures. 96 süvendiga plaadi ühte veergu kanti trüpsineerimise järgselt esialgu 50 000 rakku (hilisemates katsetes 16 000 rakku), millest tehti kahekordseid lahjendusi igasse järgnevasse veergu. Lahjenduste valmistamise järgselt jäi igasse süvendisse 100 μl raku suspensiooni kasvusöötmes. Kokku tehti 10 lahjendust ja mõõtmised tehti 72 h inkubatsiooni järel (mille käigus said rakud plaadile kinnituda ja jaguneda). Katsete tulemusena leiti sobivaks rakuarvuks 2000 rakku süvendi kohta.

4.5.2. Elulevuse mõõtmise põhimõte inhibiitoritega töötluks korral

Inhibiitoritega töötluks korral kanti 96 süvendiga plaadile igasse süvendisse (v.a ridadesse A ja H ning veergudesse 1 ja 12, kuhu kanti milliQ vett) 2000 rakku. Eraldi 96 süvendiga plaadile tehti seerialahjendus uuritavatest inhibiitoritest ning kontrollühendist (lomustiin). Ühes katses uuriti korraga kolme inhibiitorit viiel erineval kontsentratsioonil kolme replikaadina (paralleelkatsena), lomustiini lahjendused ühe replikaadina. Inhibiitorite lahused lisati

rakkudele 24 h pärast rakkude plaadile kandmist ning seejärel inkubeeriti plaate koos inhibiitorite lahustega 48 h, mille järel teostati fluorimeetrisel ja kolorimeetrisel mõõtmised. Lisaks inhibiitoritega töödeldud rakkudega süvenditele oli igal plaadil negatiivne kontroll (töötlemata rakkudega süvendid, 10 tk) ja positiivne kontroll (ainult resasuriiniga süvendid, 2 tk). Negatiivne kontroll kirjeldas olukorda, kus inhibiitori kontsentratsioon on nii väike, et see ei mõjuta rakkude elulevust. Positiivne kontroll kirjeldas olukorda, kus inhibiitori kontsentratsioon on nii suur, et kõik rakud on surnud.

4.5.3. Rakkude elulevuse mõõtmine resasuriini meetodil

Normoksia plaate inkubeeriti 72 h normoksias ning hüpoksia plaati inkubeeriti 24 h normoksias ja seejärel 48 h hüpoksias. Rakkude elulevust mõõdeti resasuriini meetodil kolorimeetriselt ja fluorimeetriselt. Enne mõõtmisi pesti plaate DPBS-ga ning seejärel pipeteeriti igasse rakkudega süvendisse ja kahte äärmisesse süvendisse 100 µl 50 µM resasuriini lahust. Ühe mõõtmise jooksul mõõdeti iga 15 min järel fluorestsentsi intensiivsus lainepikkusel 590 nm ja neelduvuste intensiivsused lainepikkustel 570 nm ja 600 nm. Üks mõõtmine kestis 2 h ning ühel päeval mõõdeti üks hüpoksias ja kaks normoksias inkubeeritud plaati.

4.6. Kasutatud tarkvara ning andmetöötlus

4.6.1. Kasutatud tarkvara

DAPI testis tehtud mikroskoopiapiltide töötlemiseks kasutati pilditöötlustarkvara ImageJ (NIH/LOCI) ja ühendite struktuuride jooniste tegemiseks programmi ChemSketch (ACD/Labs). Elulevuse katsete mõõtmisi viidi läbi kasutades Gen5 programmi (BioTek). Tulemusi analüüsi programmidega Microsoft Excel (MS Office) ja Prism (GraphPad).

4.6.2. Andmetöötlus

Rakuarvu optimeerimiskatsete korral kasutati lineaarse ala määramisel lineaarset regressiooni. Lineaarse ala ulatust hinnati neelduvuste suhte või fluorestsentsi intensiivsuse rakuarvust sõltuvuste graafikute alusel. Elulevuse katsetes inhibiitoritega kasutati inhibiitorite efekti kontsentratsioonisõltuvuse hindamiseks mittelineaarset regressiooni. Andmete analüüsimisel leiti negatiivse kontrolli signaali ajast sõltuvuse graafiku alusel lineaarse ala ulatus. Doosvastus kõverate koostamiseks valiti lineaarse ala viimane ajapunkt (sel juhul on positiivse ja negatiivse kontrolli jaoks mõõdetud signaalide erinevus lineaarse ala sees suurim).

Saadud kolorimeetrisel ja fluorimeetrisel mõõtmiste tulemused normaliseeriti positiivse ja negatiivse kontrolli järgi (min-max skaleerimine). Olenevalt inhibiitorist koostati ühe- või

kahefaasiline doos-vastus kõver, kus y -teljel oli normaliseeritud signaali intensiivsus ja x -teljel logaritm ühikulise molaarsusega läbi jagatud inhibiitori kontsentratsioonist. Doos-vastus kõverate alusel arvutati mõlema meetodi korral iga inhibiitori jaoks pIC_{50} väärtus. Seejuures piirati arvutuste käigus doos-vastus kõvera tõus väärtuse -1 juurde. Taoline lähenemine on doos-vastus kõverate puhul tavapärase juhtudel, kus ei ole väga palju andmepunkte (kontsentratsioonipunkte) ning seetõttu peeti lähenemist antud töös ka põhjendatuks [54]. Ühe- ja kahefaasiliste doos-vastus kõverate mudelid on kirjeldatud valemitega (1) ja (2), kus $P_{\bar{u}}$ ja P_a on vastavalt ülemise ja alumise platoo väärtused, $Frac$ on maksimaalse vastuse osakaal väikseima doosi juures esineva efekti korral ning nH_1 ja nH_2 on ühikuta tõusufaktorid. Y vastab signaali intensiivsusele ja x vastab inhibiitori kontsentratsioonile.

$$Y = P_a + \frac{P_{\bar{u}} - P_a}{1 + 10^{x - \log(IC_{50})}} \quad (1)$$

$$Y = P_{\bar{u}} - P_a + (P_{\bar{u}} - P_a) \times \frac{Frac}{\frac{(1 + IC_{50_1})^{nH_1}}{x}} + (P_{\bar{u}} - P_a) \times \frac{1 - Frac}{\frac{(1 + IC_{50_2})^{nH_2}}{x}} \quad (2)$$

Iga inhibiitori korral sooritati $n \geq 3$ korduskatset. Samades tingimustes teostatud korduskatsete tulemusena leitud pIC_{50} väärtuste põhjal uuriti Welchi parandiga Studenti t -testi abil, kas inhibiitori efekti erinevus rakkude elulevusele hüpoksias ja normoksias on statistiliselt oluline [55]. Lisaks tehti Welchi parandiga Studenti t -test inhibiitori hüpoksia pIC_{50} ja lomustiini hüpoksia pIC_{50} väärtuste vahel ning inhibiitori normoksia pIC_{50} ja lomustiini normoksia pIC_{50} väärtuste vahel. Erinevusi loeti statistiliselt oluliseks kui saadud p -väärtus $\leq 0,05$.

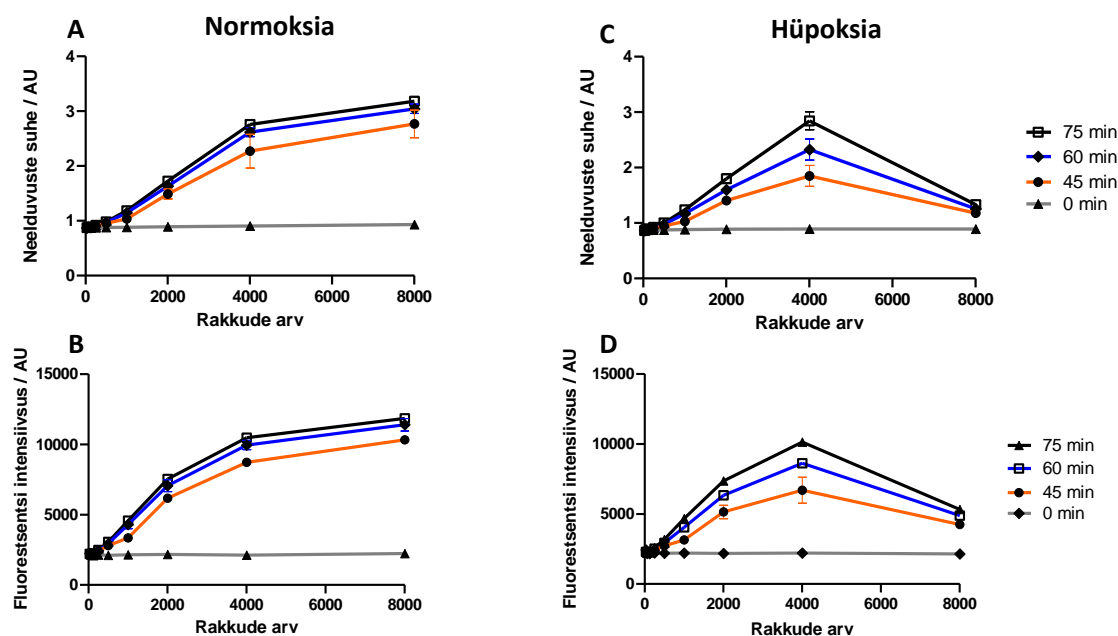
Samuti hinnati Z' -faktori abil resasuriini meetodi headust iga plaadi jaoks inhibiitoritega katsetes. Z' -faktori väärtus $> 0,5$ tähendab, et kasutatud meetod on kvantitatiivsete järelduste tegemiseks piisavalt usaldusväärne [56]. Z' -faktorit arvutati valemiga (3), kus σ_p ja σ_n on vastavalt positiivse ja negatiivse kontrolli standardhälbed ning μ_p , ja μ_n on vastavalt positiivse ja negatiivse kontrolli aritmeetilised keskmised. Negatiivse kontrollina kasutati inhibiitori poolt mõjutamata rakkudega süvendite signaaliväärtusi ja positiivse kontrollina ainult resasuriiniga (ilma rakkudeta) süvendite signaaliväärtusi ajahetkedel, mille tulemusi kasutati pIC_{50} arvutustes.

$$Z' = 1 - \frac{3(\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|} \quad (3)$$

5. TULEMUSED JA ARUTELU

5.1. Rakuarvu lineaarse ala optimeerimine

Rakuarvu optimeerimiskatseid tehti kahes inkubatsioonitingimuses: normoksia 24 h + hüpoksia 48 h ja normoksia 72 h. Esimesel katsel kanti suurima rakuarvuga süvendisse 50 000 rakku ja igasse järgnevasse süvendisse kaks korda vähem rakke. Katsest selgus, et 12 500...50 000 rakku süvendi kohta oli liiga palju. Nende süvendite puhul võis oletada, et süvendid olid 72 h inkubatsiooni jooksul üle kasvanud ja seetõttu olid rakud muutunud ainevahetuslikult passiivseks (rakud olid üle läinud nn vaiksesse seisundisse, kus nende metaboolne aktiivsus oli vähenenud) [57]. Seetõttu kanti järgnevas katsetes suurima rakuarvuga süvendisse 16 000 rakku. Järgnevate katsete seast on välja toodud ühe iseloomuliku hüpoksia ja normoksia plaadi tulemused (joonis 8).



Joonis 8. Lineaarse ala optimeerimine rakkude kasvatamise järel normoksias (läbivalt 72 h) või hüpoksias (24 h normoksia + 48 h hüpoksia). Graafikud kujutavad plaatide neelduvuste suhte (A, C) ja fluorestsentsi intensiivsuse (B, D) sõltuvust süvendisse algselt kantud rakuarvust ajahetkedel $t = 0$ min, $t = 45$ min, $t = 60$ min ja $t = 75$ min pärast resasuriini lisamist rakkudele, mis on eelnevalt kasvatatud normoksias (A, B) ja hüpoksias (C, D). Näidatud on ühe esindusliku katse tulemused; veavälbad näitavad replikaatide aritmeetilise keskmise standardhälvet.

Jooniselt on näha, et neelduvuste suhte graafikutel toimub kõrvalekalle lineaarsest alast üleminekul 4000 rakuga süvendist 8000 rakuga süvendile, fluorestsentsi intensiivsuste graafikutel aga üleminekul 2000 rakuga süvendist 4000 rakuga süvendile. Seetõttu otsustati

edaspidistes inhibiitoritega katsetes jääda 2000 rakuga süvendite juurde. Sel juhul võis kindel olla, et nii fluorimeetriliste kui ka kolorimeetriliste mõõtmiste korral jääb signaali intensiivsus rakuarvu suhtes lineaarsesse alasse.

5.2. Elulevuse mõõtmine U87-MG rakuliinis

Tabelis 1 on toodud inhibiitorite mõõtmiste tulemused: pIC₅₀ väärtused, nende standardhälbed (SD), vastavad IC₅₀ väärtused, doos-vastus kõverate alumiste platoode väärtused ning Welchi parandiga Studenti t-testi tulemus hüpoksia ja normoksia pIC₅₀ väärtuste võrdlemisel.

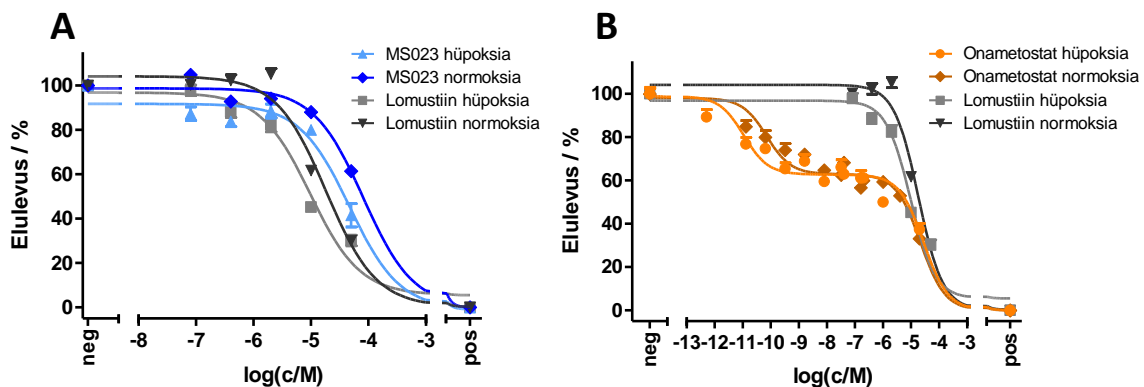
Tabel 1. Inhibiitorite mõõtmiste koondtulemused

| | | Hüpoksia | | | | Studenti t-testi p-väärtus (hüpoksia vs normoksia) |
|----------------|---------------|-------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|--|
| Uuritav ensüüm | Uuritav ühend | pIC ₅₀ | SD (pIC ₅₀) | IC ₅₀ | Alumine platoo / % | |
| PRMT | Onametostat | 11 ja 4,6 | 0,6 ja 0,3 | 10 pM ja 25 µM | 63 ± 2 ja 0 ± 2 | 0,07 ja 0,48 |
| | MS023 | 4,33 | 0,07 | 46,8 µM | -1 ± 4 | < 0,0001 |
| HDAC | SAHA | 5,65 | 0,04 | 2,24 µM | -7 ± 2 | < 0,0001 |
| EZH2 (HMT) | Tasemetostaat | 5,6 | 0,4 | 2,5 µM | 82 ± 5 | 0,03 |
| DNMT | Asatsütidiin | 5,82 | 0,04 | 1,51 µM | 2 ± 2 | 0,002 |
| CDK4/6 | Palbotsikliib | 5,2 | 0,1 | 6,3 µM | -3 ± 6 | < 0,0001 |
| AURK | Danusertiib | 6,38 | 0,07 | 0,41 µM | -3 ± 3 | 0,44 |
| | Alisertiib | 8,2 | 0,1 | 6,3 nM | 49 ± 2 | 0,0006 |
| | CYC116 | 5,7 | 0,1 | 2,0 µM | 4 ± 5 | 0,2 |
| | VX689 | 6,48 | 0,05 | 0,331 µM | 1 ± 2 | 0,04 |
| | Barasertiib | 7,9 | 0,3 | 12 nM | 66 ± 4 | 0,73 |
| Kontrollühend | Lomustiin | 5,53 | 0,05 | 2,95 µM | 6 ± 2 | < 0,0001 |
| | | Normoksia | | | | |
| Uuritav ensüüm | Uuritav ühend | pIC ₅₀ | SD (pIC ₅₀) | IC ₅₀ | Alumine platoo / % | |
| PRMT | Onametostat | 10 ja 4,68 | 0,4 ja 0,04 | 63,1 pM ja 20,9 µM | 64 ± 1 ja 0 ± 1 | |
| | MS023 | 4,09 | 0,06 | 81,3 µM | 0 ± 2 | |
| HDAC | SAHA | 5,85 | 0,02 | 1,41 µM | -6 ± 1 | |
| EZH2 (HMT) | Tasemetostaat | 5,3 | 0,2 | 5,0 µM | 79 ± 9 | |
| DNMT | Asatsütidiin | 5,91 | 0,03 | 1,23 µM | 2 ± 1 | |
| CDK4/6 | Palbotsikliib | 4,76 | 0,06 | 17,4 µM | 0 ± 3 | |
| AURK | Danusertiib | 6,31 | 0,06 | 0,490 µM | -1 ± 3 | |
| | Alisertiib | 8,65 | 0,09 | 2,24 nM | 43 ± 2 | |
| | CYC116 | 5,94 | 0,06 | 1,15 µM | -7 ± 3 | |
| | VX689 | 6,54 | 0,03 | 0,288 µM | 0 ± 1 | |
| | Barasertiib | 8,0 | 0,1 | 10 nM | 52 ± 2 | |
| Kontrollühend | Lomustiin | 4,73 | 0,04 | 18,6 µM | 0 ± 2 | |

5.2.1. Elulevuse mõõtmine epigeneetiliste modifikatsioonidega seotud ensüümide inhibeerimise järel

5.2.1.1. Valgu arginiini metüültransferaasid

Joonisel 9 on toodud onametostati ja MS023 doos-vastus kõverad normoksias ja hüpoksias. Onametostati puhul tuli doos-vastus kõver ühendi keeruka toimemehhanismi tõttu lähendada kahefaasilisele doos-vastus kõverale, mistõttu on sellel ühendil kaks pIC_{50} väärtust. Tõenäoliselt mõjutab onametostat madalamatel kontsentratsioonidel rakkude jagunemisvõimet, põhjustamata nende surma (iseloomulik platoo, mis ei asu 0% juures). Kõrgematel kontsentratsioonidel aga mõjutab onametostat rakkude elulevust (alumine platoo 0% juures). [48] Onametostati korral saadi pIC_{50} väärtusteks hüpoksias $11,0 \pm 0,6$ ja $4,6 \pm 0,3$ ning normoksias $10 \pm 0,4$ ja $4,68 \pm 0,04$. MS023 jaoks saadi pIC_{50} väärtuseks hüpoksias $4,33 \pm 0,07$ ning normoksias $4,09 \pm 0,06$. Studenti t-testi p-väärtuse põhjal esines statistiliselt oluline erinevus pIC_{50} väärtuses hüpoksia ja normoksia vahel vaid MS023 korral (p-väärtus $< 0,0001$). Onametostati jaoks saadi p-väärtused 0,07 ja 0,48, seega statistiliselt olulist erinevust ei esinenud. Onametostati puhul on alumine platoo kõrgematel kontsentratsioonidel 0% juures ning madalamatel kontsentratsioonidel normoksias $64 \pm 1\%$ ja hüpoksias $63 \pm 2\%$ juures. MS023 puhul on nii normoksias kui ka hüpoksias alumine platoo 0% juures.

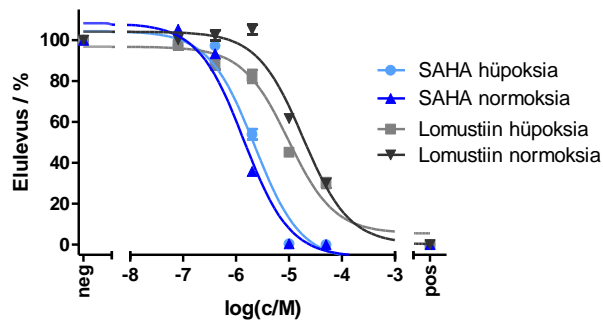


Joonis 9. PRMT inhibiitorite MS023 (A) ja onametostati (B) ning kontrollühendi lomustiini doos-vastus kõverad. Siin ja edaspidi tähistavad veavälbad replikaatide aritmeetilise keskmise standardhälvet. Neg ja pos on vastavalt negatiivse ja positiivse kontrolli signaaliväärtused, mida kasutati normaliseerimisel.

5.2.1.2. Histooni deatsetülaasid

Joonisel 10 on toodud SAHA doos-vastus kõver normoksias ja hüpoksias. SAHA pIC_{50} väärtuseks saadi hüpoksias $5,65 \pm 0,04$ ning normoksias $5,85 \pm 0,02$. Selle põhjal võiks järeldada, et SAHA on normoksias efektiivsem kui hüpoksias. Statistiliselt olulist erinevust

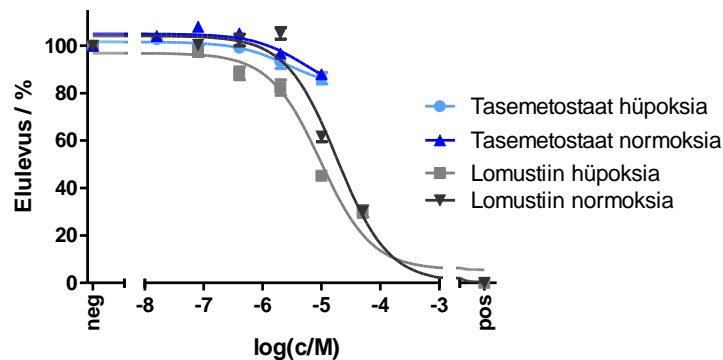
kinnitab ka Studenti t-testi alusel saadud p-väärtus $< 0,0001$. Doos-vastus kõvera alumine platoo asub normoksias $-6 \pm 1\%$ ja hüpoksias $-7 \pm 2\%$ juures.



Joonis 10. HDAC inhibiitori SAHA ja kontrollühendi lomustiini doos-vastus kõverad.

5.2.1.3. Histooni lüsiini N-metüültransferaasid

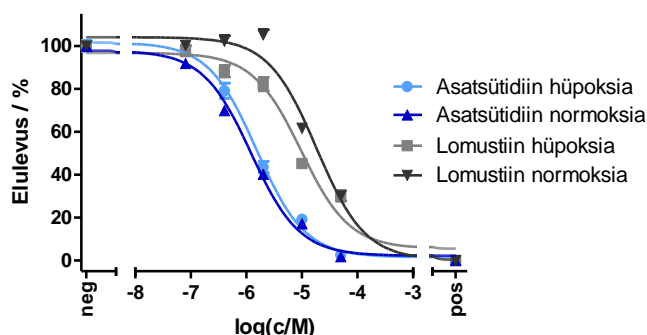
Joonisel 11 on toodud tasemetostaadi doos-vastus kõver. Tasemetostaadi pIC_{50} väärtuseks saadi hüpoksias $5,6 \pm 0,4$ ning normoksias $5,3 \pm 0,2$, mille alusel võiks järeldada, et tasemetostaat on hüpoksias efektiivsem. Statistiliselt olulist erinevust kinnitab ka Studenti t-testiga saadud p-väärtus 0,03. Tasemetostaadi puhul asub alumine platoo normoksias $79 \pm 9\%$ juures ja hüpoksias $82 \pm 5\%$ juures. Võrreldes teiste töös uuritud ühenditega on tasemetostaadil kõige kõrgem alumine platoo. Niivõrd kõrge alumise platoo tõttu ei ole tasemetostaadi efektiivsus piisav, et ühendit edaspidi potentsiaalseks ravimikandidaadiks pidada.



Joonis 11. HMT inhibiitori tasemetostaadi ja kontrollühendi lomustiini doos-vastus kõverad.

5.2.1.4. DNA metüültransferaasid

Joonisel 12 on toodud asatsütidiini doos-vastus kõver. Asatsütidiini pIC_{50} väärtuseks saadi hüpoksias $5,82 \pm 0,04$ ning normoksias $5,91 \pm 0,03$, mille alusel võiks asatsütidiini normoksias efektiivsemaks pidada. Statistiliselt olulist erinevust kinnitab Studenti t-testiga saadud p-väärtus 0,002. Asatsütidiini alumine platoo asub normoksias $2 \pm 1\%$ ja hüpoksias $2 \pm 2\%$ juures.

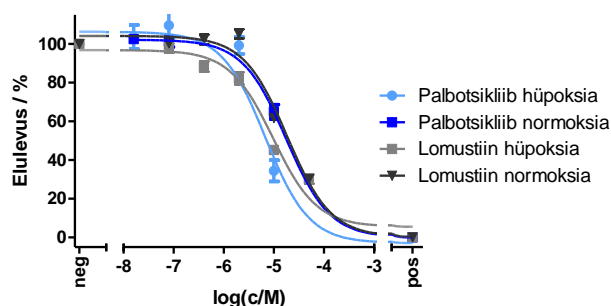


Joonis 12. DNMT inhibiitori asatsütidiini ja kontrollühendi lomustiini doos-vastus kõverad.

5.2.2. Elulevuse mõõtmine rakutsükliga seotud proteiinkinaaside inhibeerimise järel

5.2.2.1. Tsükliinist sõltuvad kinaasid

Joonisel 13 on toodud palbotsikliibi doos-vastus kõver. Palbotsikliibi pIC_{50} väärtuseks saadi hüpoksias $5,2 \pm 0,1$ ning normoksias $4,76 \pm 0,06$, mille alusel võiks palbotsikliibi hüpoksias efektiivsemaks pidada. Statistiliselt olulist erinevust kinnitab Studenti t-testi alusel saadud p-väärtus $< 0,0001$. Palbotsikliibi doos-vastus kõvera alumine platoo asub normoksias $0 \pm 3\%$ ja hüpoksias $-3 \pm 6\%$ juures.

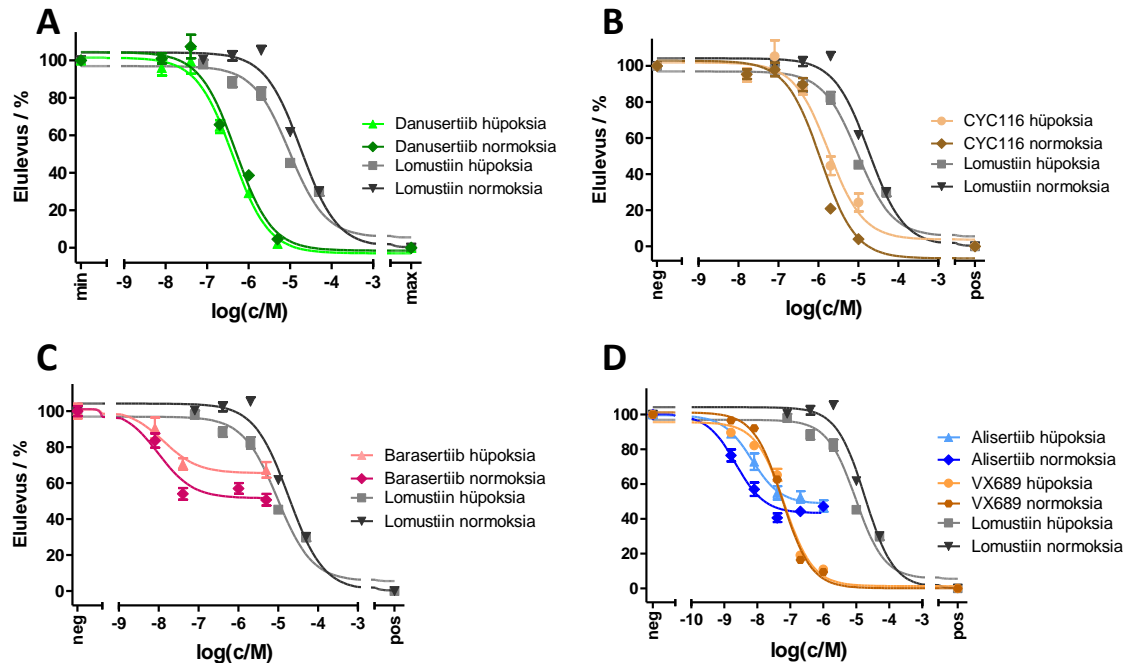


Joonis 13. CDK4/6 inhibiitori palbotsikliibi ja kontrollühendi lomustiini doos-vastus kõverad.

5.2.2.2. Aurora kinaasid

Joonisel 14 on toodud AURK-de inhibiitorite doos-vastus kõverad. Danusertiibi korral saadi pIC_{50} väärtuseks hüpoksias $6,38 \pm 0,07$ ning normoksias $6,31 \pm 0,06$ (Studenti t-testiga saadud p-väärtus 0,44). Alisertiibi korral saadi pIC_{50} väärtuseks hüpoksias $8,2 \pm 0,1$ ning normoksias $8,65 \pm 0,09$ ($p = 0,0006$). CYC116 korral saadi pIC_{50} väärtuseks hüpoksias $5,7 \pm 0,1$ ning normoksias $5,94 \pm 0,06$ ($p = 0,2$). VX689 korral saadi pIC_{50} väärtuseks hüpoksias $6,48 \pm 0,05$ ning normoksias $6,54 \pm 0,03$ ($p = 0,04$). Barasertiibi korral saadi pIC_{50} väärtuseks hüpoksias $7,9 \pm 0,3$ ning normoksias $8,0 \pm 0,1$ ($p = 0,73$). Seega esines statistiliselt oluline erinevus inhibiitori pIC_{50} väärtuses hüpoksia ja normoksia vahel vaid alisertiibi ja VX689 puhul.

Alisertiibi ja barasertiibi doos-vastus kõverate alumine platoo asub hüpoksias vastavalt $49 \pm 2\%$ ja $66 \pm 4\%$ ning normoksias $43 \pm 2\%$ ja $52 \pm 2\%$ juures. Danusertiibi, CYC116 ja VX689 doos-vastus kõverate alumised platood asuvad hüpoksias vastavalt $-3 \pm 3\%$, $4 \pm 5\%$ ja $1 \pm 2\%$ ning normoksias $-1 \pm 3\%$, $-7 \pm 3\%$ ja $0 \pm 1\%$ juures.



Joonis 14. AURK-de inhibiitorite danusertiib (A), CYC116 (B), barasertiib (C), alisertiib ja VX689 (D) ning kontrollühendi lomustiini doos-vastus kõverad.

Alisertiibi puhul täheldati nii antud töö algsetes katsetes kui ka Muscal *et al.* artiklis doos-vastus kõveratel $0,1 \mu\text{M}$ kontsentratsioonist ($\log(c/M) = -7$) kõrgematel kontsentratsioonidel tõusu rakkude elulevuses (lisa 6). Antud töö teostamisel tekitas tõus rakkude elulevuses kõrgemate kontsentratsioonide juures kahtlusi kasutatava lahuse puhtuses ning ühendi stabiilsuses. Eelneva kontrollimiseks teostas Dr. Kaido Viht kõrgefektiivse vedelikkromatograafia-elektropihustusionisatsioon-massispektromeetria (HPLC-ESI-MS) analüüsi töö mõõtmistes kasutatud lahusega ning ühe varasemalt kasutatud alisertiibi lahusega, mille puhul taolist tõusu elulevuses doos-vastus kõveratel teistes rakuliinides ei täheldatud (TÜ kliinilise meditsiini instituudi laboritehnika Helen Lusti andmetel). Analüüsi tulemuste põhjal (lisad 7 ja 8) sai järeldatud, et ühend ei ole lagunenu ja lahuses ei paistnud segavat saastet. Seega otsustati järgnevate katsete jaoks alustada seerialahjendusi madalamate kontsentratsioonide juurest.

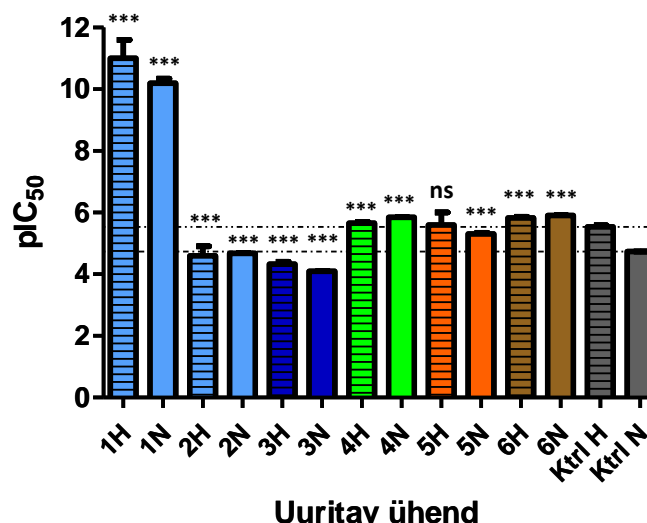
Muscal *et al.* proovisid taolist ebaloolumulikku tõusu elulevuses selgitada alisertiibi omadusega kõrgematel kontsentratsioonidel inhibeerida teataval määral ka Aurora B kinaasi. Selle

tulemusena oleks rakujagunemise üks kontrollpunkte defektne, viies omakorda rakkude jagunemise kiirenemiseni. Tekkinud vigase kromosoomikomplektiga, kuid metaboolselt aktiivsed rakud võivad katse lõpuni elus püsida ja seetõttu on näha ka näilist elulevuse kasvu. [58] Lisaks on kahes osteosarkoomi rakuliinis täheldatud, et alisertiib võib viia mitokondri poolt vahendatud apoptoosini. Selle tulemusena muutuvad mitokondri membraanid poorsemaks ning varasemalt mitokondris sisaldunud valgud ja muud komponendid (nt NADH) võivad tsütoplasmasse vabaneda. Vabanenud NADH võib tsütoplasmas resasuriini redutseerida, põhjustades seeläbi näilist elulevuse kasvu. [59] Antud töö puhul lahendati taoline ebaloomulik elulevuse tõusu probleem kasutades alisertiibi lahjenduste valmistamisel madalama kontsentratsiooniga emalahust. Selle kasutamisel jäi varasemalt anomaalne kontsentratsioonipunkt alles, kuid uute katsete korral sarnast ebaloomulikku tõusu elulevuses ei täheldatud. Seetõttu on alust arvata, et tegu ei pruugi olla alisertiibi bioloogilise efektiga, vaid hoopis lahustuvuse probleemidega kõrgematel kontsentratsioonidel.

5.3. Olulisimad trendid

5.3.1. Epigeneetiliste modifikatsioonidega seotud ensüümide inhibiitorid

Joonisel 15 on välja toodud töös uuritud epigeneetiliste modifikatsioonidega seotud ensüümide inhibiitorite pIC_{50} väärtused. Jättes välja onametostati kõrgema pIC_{50} väärtuse, jäid kõigi inhibiitorite pIC_{50} väärtused 1,82 logaritmhüki suurusesse vahemikku. Suurim erinevus ühe inhibiitori normoksia ja hüpoksia pIC_{50} väärtuste vahel oli 1,0 logaritmhüki (onametostati kõrgem pIC_{50} väärtus). Jooniselt on näha trend, et SAHA, tasemetostaat ja asatsütidiin on U87-MG rakuliinis efektiivsemad kui lomustiin (kontroll) ning MS023 vähem efektiivne. Statistiliselt oluline erinevus inhibiitori ja lomustiini pIC_{50} vahel esines kõigil juhtudel v.a tasemetostaadi ja lomustiini hüpoksia pIC_{50} väärtuste vahel.



Joonis 15. Epigeneetiliste modifikatsioonidega seotud ensüümide inhibiitorite pIC₅₀ väärtused. Numbrid tähistavad uuritud ühendeid: onametostat (1 ja 2; kahe pIC₅₀ väärtuse põhjuseks on kahefaasiline doos-vastus kõver), MS023 (3), SAHA (4), tasemetostaat (5), asatsütidiin (6) ning lomustiin (Ktrl). Tähed tähistavad hüpoksiat (H) ja normoksiat (N). Veavälbad näitavad pIC₅₀ väärtuste standardhälbeid. Iga tulba kohal on vastava ühendi ja lomustiini pIC₅₀ tulemuste vahel tehtud Studenti t-testi p-väärtusele vastav tähis. *** tähistab p-väärtust < 0,001 ning ns statistiliselt olulise erinevuse puudumist. Katkendlikud jooned tähistavad lomustiini hüpoksia ja normoksia pIC₅₀ väärtuseid.

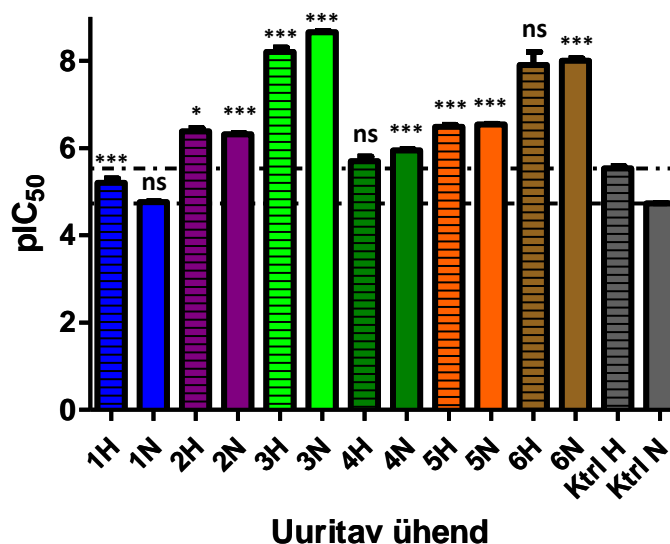
Tulemuste põhjal võib eeldada, et kõige efektiivsem on rakkude elulevust inhibeerida PRMT kaudu, kasutades onametostati. See-eest oli HDAC ja DNMT inhibeerimine efektiivsem kui PRMT inhibeerimine MS023-ga. Inhibeerimise efektiivsuse erinevuse põhjuseks võivad olla ühendite muud omadused, mida töös ei uuritud (nt rakumembraani läbimisvõime või bioloogiline stabiilsus). Kuigi tasemetostaadil (HMT, täpsemalt EZH2 inhibiitor) on kõrgem pIC₅₀ kui MS023-l, ei saa HMT inhibeerimist tasemetostaadiga pidada efektiivsemaks kui PRMT inhibeerimist MS023-ga. Seda põhjusel, et tasemetostaadi korral asub doos-vastus kõvera alumine platoo küllaltki kõrgel: hüpoksias $82 \pm 5\%$ ja normoksias $79 \pm 9\%$ juures (joonis 11). Tõenäoliselt ei mõju tasemetostaat seega rakkude elulevusele, vaid jagunemisvõimele ning ka see mõju pole märkimisväärne, kuivõrd alumise platoo väärtus on suhteliselt kõrge. Mõnevõrra sarnane olukord on ka onametostati puhul madalamate kontsentratsioonide juures, kuid sellel juhul paiknes vaheplatoo hüpoksias $63 \pm 2\%$ ja normoksias $64 \pm 1\%$ juures. MS023, SAHA, asatsütidiini ja lomustiini doos-vastus kõverate alumine platoo on 0% juures. Onametostatist järgmine kõige efektiivsem inhibiitor on asatsütidiin (DNMT inhibiitor). Kokkuvõtlikult oleksid seega edasisteks uuringuteks huvipakkuvad kandidaadid nii onametostat kui ka asatsütidiin.

Varasemast kirjandusest on võimalik leida GBM rakuliinides SAHA ja asatsütidiini jaoks IC₅₀ väärtusi. SAHA jaoks raporteeritakse 72 h töötuse jaoks IC₅₀ väärtusi 1 µM (U251N rakuliin) [60] ja 17,27 µM (U87-MG rakuliin) ning 48 h töötuse jaoks IC₅₀ väärtust 159,0 µM [61]. Antud töös saadi 48 h töötusega katsete jaoks arvutatud pIC₅₀ abil IC₅₀-ks 2,24 µM. Artiklis [61] publitseeritud katsetes aga kanti süvenditesse 25 000 rakku, mis on käesolevas töös tehtud optimeerimiskatsete tulemuste alusel lineaarsest alast väljas. Lisaks kasutasid autorid elulevuse mõõtmiseks tetrasooliumvärvil põhinevat meetodit, mis on resasuriini meetodist vähem tundlik. Asatsütidiini jaoks on U87-MG rakuliinis täheldatud IC₅₀ väärtust $10,5 \pm 3,4$ µM [62].

Antud töös saadi pIC_{50} -st arvutatud IC_{50} -ks 1,23 μM . Seega on asatsütidiini puhul saadud IC_{50} väärtus kirjandusega sarnases suurusjärgus.

5.3.2. Rakutsükliga seotud ensüümide inhibiitorid

Joonisel 16 on välja toodud töös uuritud rakutsükliga seotud ensüümide inhibiitorite pIC_{50} väärtused. Kõigi inhibiitorite pIC_{50} väärtused jäid 3,89 logaritmhüku suurusesse vahemikku. Suurim erinevus ühe inhibiitori normoksia ja hüpoksia pIC_{50} väärtuste vahel oli 0,45 logaritmhüku (alisertiib). Jooniselt on näha trend, et normoksias on kõik uuritud inhibiitorid efektiivsemad kui lomustiin (kontroll) ja hüpoksias on vaid palbotsikliib lomustiinist vähem efektiivne. Statistiliselt olulist erinevust inhibiitori ja lomustiini pIC_{50} -te vahel ei esinenud kolmel võrdlusel: palbotsikliibi normoksia pIC_{50} ja lomustiini normoksia pIC_{50} , CYC116 hüpoksia pIC_{50} ja lomustiini hüpoksia pIC_{50} ning barasertiibi hüpoksia pIC_{50} ja lomustiini hüpoksia pIC_{50} vahel.



Joonis 16. Rakutsükliga seotud proteiinkinaaside inhibiitorite pIC_{50} väärtused. Numbrid tähistavad uuritud ühendeid: palbotsikliib (1), danusertiib (2), alisertiib (3), CYC116 (4), VX689 (5), barasertiib (6) ning lomustiin (Ktrl). Tähed tähistavad hüpoksiat (H) ja normoksiat (N). Veavälbad näitavad pIC_{50} väärtuste standardhälbeid. Iga tulba kohal on vastava ühendi ja lomustiini pIC_{50} tulemuste vahel tehtud Studenti t-testi p-väärtusele vastav tähis. * tähistab p-väärtust < 0,05, *** p-väärtust < 0,001 ning ns statistiliselt olulise erinevuse puudumist. Katkendlikud jooned tähistavad lomustiini hüpoksia ja normoksia pIC_{50} väärtuseid.

Tulemustest võib eeldada, et AURK-de inhibeerimine avaldab rakkude elulevusele suuremat mõju kui CDK4/6 inhibeerimine, kuigi taas võib erinevuse põhjuseks olla ka ühendi mõni muu omadus. Lisaks ei asu alisertiibi ja barasertiibi (AURK inhibiitorid) puhul alumine platoo 0%

juures, vaid alisertiibi puhul hüpoksias $49 \pm 2\%$ ja normoksias $43 \pm 2\%$ ning barasertiibi puhul hüpoksias $66 \pm 4\%$ ja normoksias $52 \pm 2\%$ juures. Seega, sarnaselt tasemetostaadile ja onametostati madalamale kontsentratsioonivahemikule, võib arvata, et ühendid mõjuvad rakkude jagunemisvõimele ning mitte nende elulevusele. Palbotsikliibi, danusertiibi, CYC116 ja VX689 puhul on alumine platoo 0% juures, mida võib nende eeliseks pidada. Alisertiibi ja barasertiibi pIC_{50} väärtused on aga eelmainitud ühendite pIC_{50} väärtustest tunduvalt kõrgemad, mistõttu võiks neid ka kõige efektiivsemateks pidada.

Varasemast kirjandusest on võimalik leida GBM rakuliinides palbotsikliibi ja alisertiibi jaoks IC_{50} väärtusi. Palbotsikliibi jaoks raporteeritakse viiepäevase töötamise järel U87-MG rakuliinis $1,1 \mu M$ IC_{50} väärtust [63]. Antud töös saadi pIC_{50} -st arvatud IC_{50} -ks $17,4 \mu M$. Alisertiibi jaoks on kümnapäevase töötamise järel erinevates primaarsetes rakkudes saadud IC_{50} väärtused vahemikus $30 \dots 95$ nM [64]. Primaarsed rakud on patsientide biopsiast värskest eraldatud (ei ole kultiveeritud nagu rakuliinid) ning võivad seetõttu rakuliinidest erineda tundlikkuse poolest. Antud töös saadi alisertiibi jaoks pIC_{50} -st arvatud IC_{50} väärtuseks $2,24$ nM. Selle põhjal võib öelda, et saadud tulemused on alisertiibi puhul kirjandusest leitavate tulemustega võrreldes suurusjärg madalamad ning palbotsikliibi puhul suurusjärg kõrgemad. Erinevused võivad siinkohal olla põhjustatud töötamise erinevast kestusest ning rakuliini asemel primaarsete rakkude kasutamisest.

5.4. Resasuriini meetodi usaldusväärsuse hindamine elulevuse mõõtmisel

Tabelis 2 on välja toodud kõigi plaatide (mille tulemusi kasutati pIC_{50} arvutustel) fluorestsentsi ja neelduvuste suhte mõõtmiste Z' -faktorite keskväärtused koos standardhälbega ajahetkedel, mida töös pIC_{50} väärtuste arvutamisel kasutati. Kõik Z' -faktorid on $> 0,5$. Seega võib meetodit rakkude elulevuse mõõtmisel kvantitatiivsete järelduste tegemiseks piisavalt usaldusväärseks pidada.

Tabel 2. pIC_{50} arvutusteks kasutatud plaatide Z' -faktorite keskväärtused koos standardhälbega

| | Fluorestsents | | Neelduvuste suhe | |
|---------------|---------------|------------|------------------|------------|
| | t = 45 min | t = 60 min | t = 75 min | t = 90 min |
| Keskväärtus | 0,66 | 0,71 | 0,60 | 0,61 |
| Standardhälve | 0,10 | 0,09 | 0,13 | 0,15 |

5.5. Edasised väljundid

Sihtmärkravi puhul toimib ravim konkreetsele sihtmärgile, milleks võib olla nt retseptor või ensüüm, avaldades seekaudu mõju rakkude elulevusele või jagunemisvõimele. Uuritavaks ravimikandidaadiks võib seejuures olla inhibiitor, antikeha või ka vaktsiin. [65] Üks näide sihtmärkravis kasutatavast ühendist on GBM ravis kasutatav bevatsizumab, mis sai 2009. aastal Ameerika Ühendriikide Toidu- ja Raviameti poolt heaks kiidetud. Bevatsizumab on antikeha, mis konkureerib vaskulaarse endoteeli kasvufaktoriga selle retseptorile ning mõjutab seekaudu kasvaja kasvu. [66] Inhibiitorite uurimisel on eri kliinilistes katsetes lisaks üksiku inhibiitori efekti uurimisele proovitud ka kombinatsioone juba kasutusel olevate keemiaravimitega (nt temosolomiid, lomustiin). Kombinatsioonide kasutamine võib huvi pakkuda olukordades, kus üksiku inhibiitori manustamisel puudub märgatav efekt patsiendi elumusele. [65] Seetõttu võiks enne antud töös kõige efektiivsemateks peetud inhibiitoritega edasi minemist uurida ka nende kombinatsioone lomustiiniga.

Samas tuleb arvestada asjaoluga, et patsientide kasvajakud ei ole identsed. Selleks on laiemal projektil (mille alla töö kuulub) raames uuritud samu inhibiitoreid ka kahes teises GBM rakuliinis (U251-MG ja T98G). Need rakuliinid erinevad teineteisest valkude ekspressiooni ja kromosomaalsete komplekside poolest (T98G liinis on viis komplekti kromosoomi, aga U87-MG ja U251-MG liinides kaks komplekti [7,67,68]). Taoline kromosomaalsete komplekside ja valkude ekspressiooni erinevus mõjutab omakorda liinide vastuseid eri teraapiatele. Näiteks on Ape1 valgu kõrgeks ekspressiooniga U87-MG liinis võrreldes U251-MG liiniga seostatud U87-MG liini kõrgema kiiritusravi resistentsusega [69]. Rakuliinide erinevuste tõttu tuleks uurida, millistel inhibiitoritel on kõigis kolmes rakuliinis kõrgeim pIC_{50} väärtus nii normoksias kui ka hüpoksias. Sel viisil saab tuvastada kõige robustsemalt töötavaid inhibiitoreid.

Kombinatsioonidega katseid tuleks võimalusel samuti kõigis kolmes rakuliinis teha. Sel viisil saaks sarnaselt kõige efektiivsemate inhibiitorite leidmisele defineerida ka kõige efektiivsemad kombinatsioonid, millega oleks võimalik planeerida kliinilist uuringut patsientidega. Enne kliinilise uuringu alustamist, tuleks lisaks põhjalikumalt kirjandusest uurida valitud inhibiitori(te) vere-aju barjääri läbimisvõimet. Juhul, kui valitud inhibiitor läbib vere-aju barjääri kehvasti, tuleks kaaluda inhibiitori kombineerimist kiiritusraviga. Kiiritusravi puhul on täheldatud vere-aju barjääri omaduste, sh läbitavuse, muutumist. Taolised muutused vere-aju barjääri läbitavuses võimaldaksid sihtmärkraviga kombinatsioonis omakorda parandada inhibiitori jõudmist kasvajani. [70]

6. KOKKUVÕTE

Bakalaureusetöö raames mõõdeti glioblastoomi rakuliini U87-MG elulevust hüpoksilistes ja normoksilistes tingimustes pärast 48 h töötlust epigeneetiliste modifikatsioonide või rakutsükliga seotud ensüümide inhibiitoritega.

Teoreetilises osas kirjeldati kasutatud glioblastoomi rakuliini (U87-MG), hüpoksiat ning hüpoksia mõju vähirakkudele. Lisaks anti ülevaade kõigist töös uuritud inhibiitorite sihtmärkideks olevatest ensüümidest ja elulevuse mõõtmiseks kasutatud resasuriini meetodist.

Eksperimentaalses osas kinnitati kõigepealt DAPI testi abil bakteriaalse saaste puudumine rakkudes. Seejärel optimeeriti rakuarvu elulevuse mõõtmiseks resasuriini meetodil. Selleks teostati katseid erinevate rakuarvude juures, mille tulemusena leiti nii fluorimeetriliste kui ka kolorimeetriliste mõõtmiste jaoks optimaalne rakuarv (2000 rakku süvendi kohta). Viimaks teostati optimeeritud rakuarvuga elulevuse mõõtmisi, kus enne mõõtmist töödeldi rakke uuritava inhibiitoriga 48 h jooksul hüpoksilistes või normoksilistes tingimustes. Lisaks hinnati arvutatud Z' -faktorite abil resasuriini meetodit kvantitatiivsete järelduste tegemiseks usaldusväärseks.

Elulevuse mõõtmiste tulemuste põhjal leiti inhibiitorite omavahel võrdlemiseks iga inhibiitori jaoks hüpoksiat ja normoksiat pIC_{50} väärtused. Üldise trendina nähti, et rakutsükliga seotud ensüümide inhibiitoritel olid kõrgemad pIC_{50} väärtused. Sellest tulenevalt võis rakutsükli inhibeerimist pidada rakkude elulevuse mõjutamisel efektiivsemaks kui epigeneetiliste modifikatsioonidega seotud ensüümide inhibeerimist. Antud rakuliini puhul olid (pIC_{50} väärtuse põhjal) kõige efektiivsemateks inhibiitoriteks onametostat (sihtmärk: PRMT), asatsütidiin (sihtmärk: DNMT), alisertiib ja barasertiib (sihtmärk: AURK). Töö edasiste väljunditena võrreldakse laiema projekti raames U87-MG liini tulemusi U251-MG ja T98G liinide tulemustega. Seejärel valitakse välja kõigis kolmes rakuliinis hüpoksiat ja normoksiat kõige robustsemalt töötanud inhibiitor, millega saaks edaspidi uurija algatatud kliinilist uuringut planeerida.

Antud bakalaureusetöö on osa Eesti Teadusagentuuri poolt rahastatavast projektist PRG454 (vastutav täitja professor Asko Uri, projekti kestus 01.2019 – 12.2023) ja TÜ kliinilise meditsiini instituudi baasfinantseeritavast projektist “Glioblastoomi uued ravivalikud: *in vitro* testidest akadeemilise kliinilise uuringuni” (vastutav täitja professor Jana Jaal, projekti kestus 06.2019 – 12.2022).

7. SUMMARY

The aim of this work was to profile the viability of glioblastoma cell line U87-MG in both hypoxic and normoxic conditions following 48 h treatment with either inhibitors of enzymes responsible for epigenetic modifications or regulation of the cell cycle. A total of 11 inhibitors and one control substance were tested using the resazurin-based cell viability assay. In comparison to a study previously conducted by members of the Chair of Bioorganic Chemistry of the University of Tartu [5], the number of inhibitors and targeted enzymes was extended in this work.

In the theoretical part of this work, the used cell line (U87-MG) was described. Furthermore, hypoxia and its effects (such as its impact on the biological stability of hypoxia-inducible factors) were introduced. Finally, an overview was given of all enzymes targeted by inhibitors used in this work and the resazurin-based cell viability assay.

In the experimental section of this work, firstly, the absence of bacterial contamination in the cells was assessed using the DAPI test. Then, the optimal cell number was found for viability experiments. For this, cells were plated at various cell numbers per well. As a result, 2000 cells per well was deemed optimal for both fluorimetric and colorimetric measurements. Following the optimisation, fluorimetric and colorimetric viability measurements were performed after 48 h treatment of the cells with various inhibitors or the control substance. Furthermore, the reliability of the test was confirmed with Z' -factor calculations.

To compare the efficiency of the studied inhibitors, pIC_{50} values were calculated for each inhibitor in both hypoxic and normoxic conditions. As a general trend, higher pIC_{50} values were observed among inhibitors of enzymes responsible for regulation of the cell cycle. Therefore, the inhibition of such enzymes could overall represent a more effective strategy than the inhibition of enzymes responsible for epigenetic modifications. Based on all calculated pIC_{50} values, inhibitors of interest for further studies were selected. The latter were as follows: onamostat (targeting PRMT), azacitidine (targeting DNMT), alisertib and barasertib (targeting AURK). The pIC_{50} values for inhibitors studied in U87-MG cells should now be compared with the results of experiments in U251-MG and T98G cells (also originating from glioblastoma). Following the comparison, an inhibitor that proves effective in all three cell lines and in both hypoxic and normoxic conditions will be selected for further exploration within an investigator-initiated academic clinical study.

This work was a part of a larger project funded by the Estonian Research Agency (project PRG454, principal investigator: professor Asko Uri, duration: 01.2019 – 12.2023) and a project internally financed by the Institute of Clinical Medicine of the University of Tartu (title: „Novel glioblastoma therapy options: from *in vitro* experiments to an academic clinical trial“, principal investigator: professor Jana Jaal, duration: 06.2019 – 12.2022).

8. KASUTATUD KIRJANDUS

1. E. Crocetti, A. Trama, C. Stiller, A. Caldarella, R. Soffietti, J. Jaal, D.C. Weber, U. Ricardi, J. Slowinski, A. Brandes, Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe, *Eur J Cancer*. 48 (2012) 1532–1542. DOI: 10.1016/j.ejca.2011.12.013.
2. S. Faraz, S. Pannullo, M. Rosenblum, A. Smith, A.G. Wernicke, Long-term survival in a patient with glioblastoma on antipsychotic therapy for schizophrenia: a case report and literature review, *Ther Adv Med Oncol*. 8 (2016) 421–428. DOI: 10.1177/1758834016659791.
3. S.Y. Lee, Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme, *Genes & Diseases*. 3 (2016) 198–210. DOI: 10.1016/j.gendis.2016.04.007.
4. R. Stupp, W.P. Mason, M.J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M.J.B. Taphoorn, K. Belanger, A.A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R.C. Janzer, S.K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J.G. Cairncross, E. Eisenhauer, R.O. Mirimanoff, Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma, *New Engl J Med*. 352 (2005) 987–996. DOI: 10.1056/NEJMoa043330.
5. D. Lavogina, T. Laasfeld, M. Vardja, H. Lust, J. Jaal, Viability fingerprint of glioblastoma cell lines: roles of mitotic, proliferative, and epigenetic targets, *Sci Rep*. 11 (2021) 20338. DOI: 10.1038/s41598-021-99630-0.
6. NIH, National Library of Medicine, Home - ClinicalTrials.gov, (2023). <https://clinicaltrials.gov/> (viimati vaadatud aprill 28, 2023).
7. ATCC, U-87 MG, (2023). <https://www.atcc.org/products/htb-14> (viimati vaadatud märts 28, 2022).
8. NIH, National Library of Medicine, U87 - Search Results - PubMed, (2023). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=U87> (viimati vaadatud mai 21, 2023).
9. NIH, National Library of Medicine, U251 - Search Results - PubMed, (2023). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=U251> (viimati vaadatud mai 21, 2023).
10. NIH, National Library of Medicine, T98G - Search Results - PubMed, (2023). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=T98G> (viimati vaadatud mai 21, 2023).
11. M.C. Simon, B. Keith, The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function, *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9 (2008) 285–296. DOI: 10.1038/nrm2354.
12. B. Muz, P. de la Puente, F. Azab, A.K. Azab, The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy, *Hypoxia (Auckl)*. 3 (2015) 83–92. DOI: 10.2147/HP.S93413.

13. A.R. Monteiro, R. Hill, G.J. Pilkington, P.A. Madureira, The Role of Hypoxia in Glioblastoma Invasion, *Cells*. 6 (2017) 45. DOI: 10.3390/cells6040045.
14. R.L. Westbrook, E. Bridges, J. Roberts, C. Escribano-Gonzalez, K.L. Eales, L.A. Vettore, P.D. Walker, E. Vera-Siguenza, H. Rana, F. Cuzzo, K.-L. Eskla, H. Vellama, A. Shaaban, C. Nixon, H. Luuk, G.G. Lavery, D.J. Hodson, A.L. Harris, D.A. Tennant, Proline synthesis through PYCR1 is required to support cancer cell proliferation and survival in oxygen-limiting conditions, *Cell Rep*. 38 (2022) 110320. DOI: 10.1016/j.celrep.2022.110320.
15. B. Keith, M.C. Simon, Hypoxia-Inducible Factors, Stem Cells, and Cancer, *Cell*. 129 (2007) 465–472. DOI: 10.1016/j.cell.2007.04.019.
16. N. Colwell, M. Larion, A.J. Giles, A.N. Seldomridge, S. Sizdahkhani, M.R. Gilbert, D.M. Park, Hypoxia in the glioblastoma microenvironment: shaping the phenotype of cancer stem-like cells, *Neuro-Oncology*. 19 (2017) 887–896. DOI: 10.1093/neuonc/now258.
17. V.T. Mihaylova, R.S. Bindra, J. Yuan, D. Campisi, L. Narayanan, R. Jensen, F. Giordano, R.S. Johnson, S. Rockwell, P.M. Glazer, Decreased Expression of the DNA Mismatch Repair Gene Mlh1 under Hypoxic Stress in Mammalian Cells, *Mol Cell Biol*. 23 (2003) 3265–3273. DOI: 10.1128/MCB.23.9.3265-3273.2003.
18. A. Portela, M. Esteller, Epigenetic modifications and human disease, *Nat Biotechnol*. 28 (2010) 1057–1068. DOI: 10.1038/nbt.1685.
19. M.T. Bedford, S.G. Clarke, Protein Arginine Methylation in Mammals: Who, What, and Why, *Molecular Cell*. 33 (2009) 1–13. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.12.013.
20. Y. Wang, W. Hu, Y. Yuan, Protein Arginine Methyltransferase 5 (PRMT5) as an Anticancer Target and Its Inhibitor Discovery, *J. Med. Chem*. 61 (2018) 9429–9441. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b00598.
21. E. Guccione, S. Richard, The regulation, functions and clinical relevance of arginine methylation, *Nat Rev Mol Cell Biol*. 20 (2019) 642–657. DOI: 10.1038/s41580-019-0155-x.
22. S. Pal, S.N. Vishwanath, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, S. Sif, Human SWI/SNF-Associated PRMT5 Methylates Histone H3 Arginine 8 and Negatively Regulates Expression of ST7 and NM23 Tumor Suppressor Genes, *Mol Cell Biol*. 24 (2004) 9630–9645. DOI: 10.1128/MCB.24.21.9630-9645.2004.
23. D. Brehmer, L. Beke, T. Wu, H.J. Millar, C. Moy, W. Sun, G. Mannens, V. Pande, A. Boeckx, E. van Heerde, T. Nys, E.M. Gustin, B. Verbist, L. Zhou, Y. Fan, V. Bhargava, P. Safabakhsh, P. Vinken, T. Verhulst, A. Gilbert, S. Rai, T.A. Graubert, F. Pastore, D. Fiore, J. Gu, A. Johnson, U. Philippar, B. Morschhäuser, D. Walker, D. De Lange, V.

- Keersmaekers, M. Viellevoye, G. Diels, W. Schepens, J.W. Thuring, L. Meerpoel, K. Packman, M.V. Lorenzi, S. Laquerre, Discovery and Pharmacological Characterization of JNJ-64619178, a Novel Small-Molecule Inhibitor of PRMT5 with Potent Antitumor Activity, *Mol Cancer Ther.* 20 (2021) 2317–2328. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-21-0367.
24. H. Hu, K. Qian, M.-C. Ho, Y.G. Zheng, Small Molecule Inhibitors of Protein Arginine Methyltransferases, *Expert Opin Investig Drugs.* 25 (2016) 335–358. DOI: 10.1517/13543784.2016.1144747.
25. T. Eckschlager, J. Plch, M. Stiborova, J. Hrabeta, Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs, *Int J Mol Sci.* 18 (2017) 1414. DOI: 10.3390/ijms18071414.
26. A.K. Bubna, Vorinostat—An Overview, *Indian J Dermatol.* 60 (2015) 419. DOI: 10.4103/0019-5154.160511.
27. M.D.A. Paskeh, A. Mehrabi, M.H. Gholami, A. Zabolian, E. Ranjbar, H. Saleki, A. Ranjbar, M. Hashemi, Y.N. Ertas, K. Hushmandi, S. Mirzaei, M. Ashrafizadeh, A. Zarrabi, S. Samarghandian, EZH2 as a new therapeutic target in brain tumors: Molecular landscape, therapeutic targeting and future prospects, *Biomed Pharmacother.* 146 (2022) 112532. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112532.
28. C. Piperi, K.A. Papavassiliou, A.G. Papavassiliou, Pivotal Role of STAT3 in Shaping Glioblastoma Immune Microenvironment, *Cells.* 8 (2019) 1398. DOI: 10.3390/cells8111398.
29. R. Duan, W. Du, W. Guo, EZH2: a novel target for cancer treatment, *J Hematol Oncol.* 13 (2020) 104. DOI: 10.1186/s13045-020-00937-8.
30. R.A. Copeland, Protein methyltransferase inhibitors as precision cancer therapeutics: a decade of discovery, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 373 (2018) 20170080. DOI: 10.1098/rstb.2017.0080.
31. B. Jin, K.D. Robertson, DNA Methyltransferases (DNMTs), DNA Damage Repair, and Cancer, *Adv Exp Med Biol.* 754 (2013) 3–29. DOI: 10.1007/978-1-4419-9967-2_1.
32. F.V. Jacinto, M. Esteller, Mutator pathways unleashed by epigenetic silencing in human cancer, *Mutagenesis.* 22 (2007) 247–253. DOI: 10.1093/mutage/gem009.
33. C. Stresemann, F. Lyko, Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine, *Int J Cancer.* 123 (2008) 8–13. DOI: 10.1002/ijc.23607.
34. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, An Overview of the Cell Cycle, *Molecular Biology of the Cell.* 4th Edition. (2002). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26869/> (viimati vaadatud november 29, 2022).

35. H.K. Matthews, C. Bertoli, R.A.M. de Bruin, Cell cycle control in cancer, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 23 (2022) 74–88. DOI: 10.1038/s41580-021-00404-3.
36. Rakutsükkel, Vikipeedia. (2022). <https://et.wikipedia.org/wiki/Rakuts%C3%BCkkel> (viimati vaadatud detsember 29, 2022).
37. S.M. Bronner, K.A. Merrick, J. Murray, L. Salphati, J.G. Moffat, J. Pang, C.J. Sneeringer, N. Dompe, P. Cyr, H. Purkey, G. de L. Boenig, J. Li, A. Kolesnikov, R. Larouche-Gauthier, K.W. Lai, X. Shen, S. Aubert-Nicol, Y.-C. Chen, J. Cheong, J.J. Crawford, M. Hafner, P. Haghshenas, A. Jakalian, J.-P. Leclerc, N.-K. Lim, T. O'Brien, E.G. Plise, H. Shalan, C. Sturino, J. Wai, Y. Xiao, J. Yin, L. Zhao, S. Gould, A. Olivero, T.P. Heffron, Design of a brain-penetrant CDK4/6 inhibitor for glioblastoma, *Bioorg Med Chem Lett.* 29 (2019) 2294–2301. DOI: 10.1016/j.bmcl.2019.06.021.
38. T. VanArsdale, C. Boshoff, K.T. Arndt, R.T. Abraham, Molecular Pathways: Targeting the Cyclin D–CDK4/6 Axis for Cancer Treatment, *Clin Cancer Res.* 21 (2015) 2905–2910. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0816.
39. M.E. Law, P.E. Corsino, S. Narayan, B.K. Law, Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors as Anticancer Therapeutics, *Mol Pharmacol.* 88 (2015) 846–852. DOI: 10.1124/mol.115.099325.
40. T. de Almeida Magalhães, G.R. de Sousa, G. Alencastro Veiga Cruzeiro, L.G. Tone, E.T. Valera, K.S. Borges, The therapeutic potential of Aurora kinases targeting in glioblastoma: from preclinical research to translational oncology, *J Mol Med.* 98 (2020) 495–512. DOI: 10.1007/s00109-020-01895-x.
41. G. Borthakur, H. Dombret, P. Schafhausen, T.H. Brummendorf, N. Boissel, E. Jabbour, M. Mariani, L. Capolongo, P. Carpinelli, C. Davite, H. Kantarjian, J.E. Cortes, A phase I study of danusertib (PHA-739358) in adult patients with accelerated or blastic phase chronic myeloid leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia resistant or intolerant to imatinib and/or other second generation c-ABL therapy, *Haematologica.* 100 (2015) 898–904. DOI: 10.3324/haematol.2014.115279.
42. T.B. Sells, R. Chau, J.A. Ecsedy, R.E. Gershman, K. Hoar, J. Huck, D.A. Janowick, V.J. Kadambi, P.J. LeRoy, M. Stirling, S.G. Stroud, T.J. Vos, G.S. Weatherhead, D.R. Wysong, M. Zhang, S.K. Balani, J.B. Bolen, M.G. Manfredi, C.F. Claiborne, MLN8054 and Alisertib (MLN8237): Discovery of Selective Oral Aurora A Inhibitors, *ACS Med Chem Lett.* 6 (2015) 630–634. DOI: 10.1021/ml500409n.

43. G. Griffiths, F. Scaerou, C. Midgley, S. McClue, C. Tosh, W. Jackson, D. MacCallum, S. Wang, P. Fischer, D. Glover, D. Zheleva, Anti-tumor activity of CYC116, a novel small molecule inhibitor of Aurora kinases and VEGFR2, *Cancer Res.* 68 (2008) 5644.
44. C.P. Gully, F. Zhang, J. Chen, J.A. Yeung, G. Velazquez-Torres, E. Wang, S.-C.J. Yeung, M.-H. Lee, Antineoplastic effects of an Aurora B kinase inhibitor in breast cancer, *Mol Cancer.* 9 (2010) 42. DOI: 10.1186/1476-4598-9-42.
45. D. Lavogina, E. Enkvist, K. Viht, A. Uri, Long Residence Times Revealed by Aurora A Kinase-Targeting Fluorescent Probes Derived from Inhibitors MLN8237 and VX-689, *ChemBioChem.* 15 (2014) 443–450. DOI: 10.1002/cbic.201300613.
46. T.L. Riss, R.A. Moravec, A.L. Niles, S. Duellman, H.A. Benink, T.J. Worzella, L. Minor, S. Markossian, A. Grossman, K. Brimacombe, *et al.*, *Assay Guidance Manual*, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD), 2004. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/> (viimati vaadatud märts 28, 2022).
47. Corning, 21-030-CV | Corning® Dulbecco’s Phosphate-Buffered Saline, 1X with calcium and magnesium, (2022). <https://www.corning.com/catalog/cls/documents/formulations/CLS-CG-FM-003.pdf> (viimati vaadatud aprill 21, 2022).
48. D. Lavogina, H. Lust, M.-J. Tahk, T. Laasfeld, H. Vellama, N. Nasirova, M. Vardja, K.-L. Eskla, A. Salumets, A. Rinken, J. Jaal, Revisiting the Resazurin-Based Sensing of Cellular Viability: Widening the Application Horizon, *Biosensors.* 12 (2022) 196. DOI: 10.3390/bios12040196.
49. S.N. Rampersad, Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays, *Sensors.* 12 (2012) 12347–12360. DOI: 10.3390/s120912347.
50. P. Zrimšek, J. Kunc, M. Kosec, J. Mrkun, Spectrophotometric application of resazurin reduction assay to evaluate boar semen quality, *Int J Androl.* 27 (2004) 57–62. DOI: 10.1046/j.0105-6263.2003.00448.x.
51. Merck, Resazurin certified 62758-13-8, (2022). <https://www.sigmaaldrich.com/EE/en/product/aldrich/199303> (viimati vaadatud mai 26, 2022).
52. ATCC, Eagle’s Minimum Essential Medium (EMEM) | ATCC, (2022). <https://www.atcc.org/products/30-2003> (viimati vaadatud aprill 23, 2022).
53. M.-J. Tahk, Apoptoosi mõõtmise rakkudes kaspas-3 substraadil põhineva biosensorsüsteemiga, University of Tartu, 2018.

54. M.M. Wenner, T.E. Wilson, S.L. Davis, N.S. Stachenfeld, Pharmacological curve fitting to analyze cutaneous adrenergic responses, *J Appl Physiol* (1985). 111 (2011) 1703–1709. DOI: 10.1152/jappphysiol.00780.2011.
55. GraphPad Software, GraphPad Prism 9 Statistics Guide - The unequal variance Welch t test, (2022). https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/stat_the_unequal_variance_welch_t_t.htm (viimati vaadatud detsember 27, 2022).
56. J.-H. Zhang, T.D.Y. Chung, K.R. Oldenburg, A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays, (1999). <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/108705719900400206> (viimati vaadatud november 29, 2022).
57. G. Yao, Modelling mammalian cellular quiescence, *Interface Focus*. 4 (2014) 20130074. DOI: 10.1098/rsfs.2013.0074.
58. J.A. Muscal, K.A. Scorsone, L. Zhang, J.A. Ecsedy, S.L. Berg, Additive effects of vorinostat and MLN8237 in pediatric leukemia, medulloblastoma, and neuroblastoma cell lines, *Invest New Drugs*. 31 (2013) 39–45. DOI: 10.1007/s10637-012-9831-9.
59. N.-K. Niu, Z.-L. Wang, S.-T. Pan, H.-Q. Ding, G.H. Au, Z.-X. He, Z.-W. Zhou, G. Xiao, Y.-X. Yang, X. Zhang, T. Yang, X.-W. Chen, J.-X. Qiu, S.-F. Zhou, Pro-apoptotic and pro-autophagic effects of the Aurora kinase A inhibitor alisertib (MLN8237) on human osteosarcoma U-2 OS and MG-63 cells through the activation of mitochondria-mediated pathway and inhibition of p38 MAPK/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, *DDDT*. 9 (2015) 1555–1584. DOI: 10.2147/DDDT.S74197.
60. I. Zhang, M. Beus, U. Stochaj, P.U. Le, B. Zorc, Z. Rajić, K. Petrecca, D. Maysinger, Inhibition of glioblastoma cell proliferation, invasion, and mechanism of action of a novel hydroxamic acid hybrid molecule, *Cell Death Discov*. 4 (2018) 41. DOI: 10.1038/s41420-018-0103-0.
61. J. Kaur, S. Jakhmola, R.R. Singh, B. Joshi, H.C. Jha, A. Joshi, Ultrasonic Atomizer-Driven Development of Biocompatible and Biodegradable Poly(d,l-lactide-co-glycolide) Nanocarrier-Encapsulated Suberoylanilide Hydroxamic Acid to Combat Brain Cancer, *ACS Appl. Bio Mater*. 4 (2021) 5627–5637. DOI: 10.1021/acsabm.1c00430.
62. A.S. Yamashita, M. da Costa Rosa, A. Borodovsky, W.T. Festuccia, T. Chan, G.J. Riggins, Demethylation and epigenetic modification with 5-azacytidine reduces IDH1 mutant glioma growth in combination with temozolomide, *Neuro Oncol*. 21 (2019) 189–200. DOI: 10.1093/neuonc/noy146.

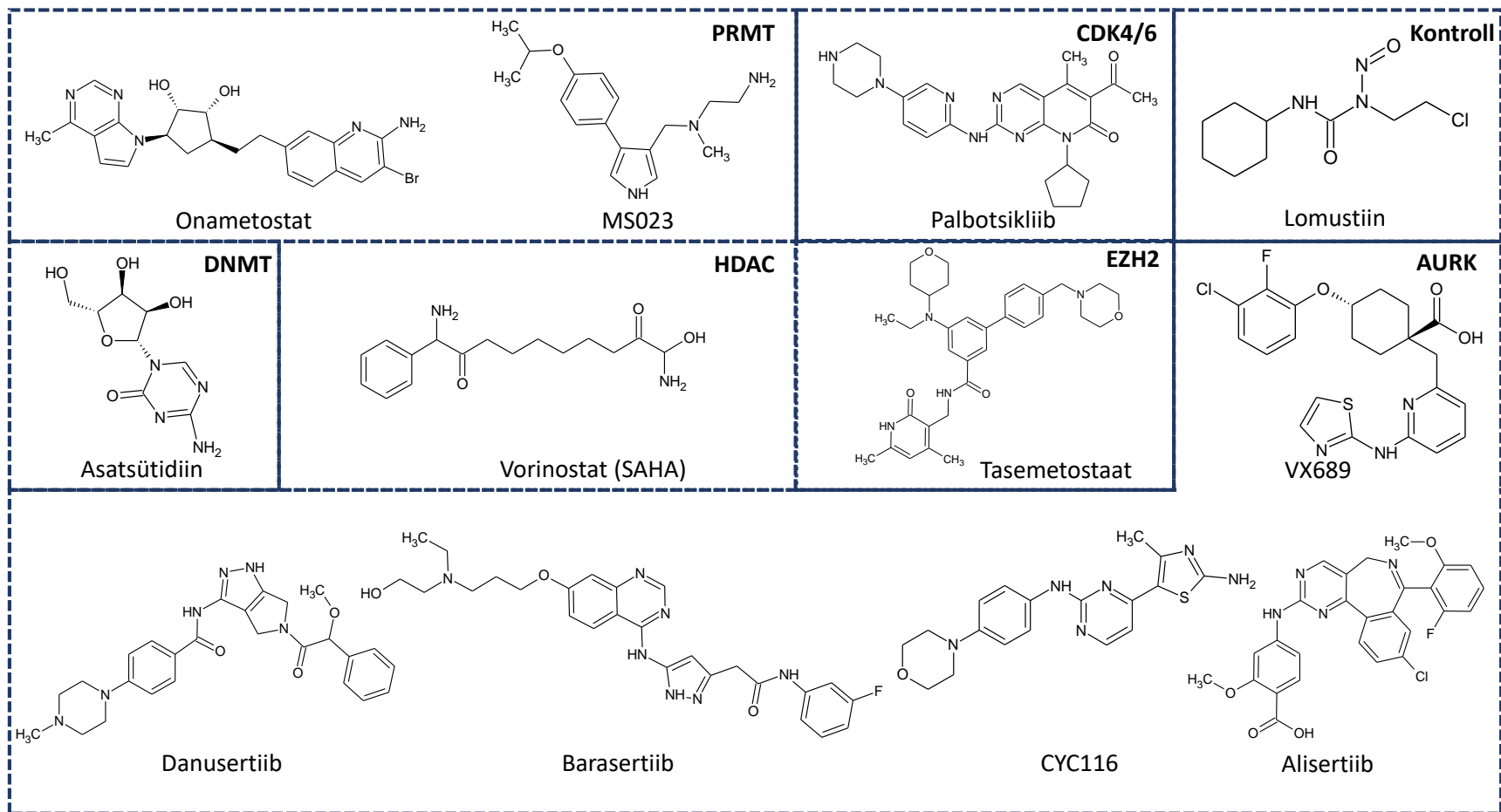
63. W.R. Wiedemeyer, I.F. Dunn, S.N. Quayle, J. Zhang, M.G. Chheda, G.P. Dunn, L. Zhuang, J. Rosenbluh, S. Chen, Y. Xiao, G.I. Shapiro, W.C. Hahn, L. Chin, Pattern of retinoblastoma pathway inactivation dictates response to CDK4/6 inhibition in GBM, *PNAS*. 107 (2010) 11501–11506. DOI: 10.1073/pnas.1001613107.
64. C. Kurokawa, H. Geekiyanage, C. Allen, I. Iankov, M. Schroeder, B. Carlson, K. Bakken, J. Sarkaria, J.A. Ecsedy, A. D'Assoro, B. Friday, E. Galanis, Alisertib demonstrates significant antitumor activity in bevacizumab resistant, patient derived orthotopic models of glioblastoma, *J Neurooncol*. 131 (2017) 41–48. DOI: 10.1007/s11060-016-2285-8.
65. K. Yang, Z. Wu, H. Zhang, N. Zhang, W. Wu, Z. Wang, Z. Dai, X. Zhang, L. Zhang, Y. Peng, W. Ye, W. Zeng, Z. Liu, Q. Cheng, Glioma targeted therapy: insight into future of molecular approaches, *Mol Cancer*. 21 (2022) 39. DOI: 10.1186/s12943-022-01513-z.
66. M.H. Cohen, Y.L. Shen, P. Keegan, R. Pazdur, FDA Drug Approval Summary: Bevacizumab (Avastin®) as Treatment of Recurrent Glioblastoma Multiforme, *The Oncologist*. 14 (2009) 1131–1138. DOI: 10.1634/theoncologist.2009-0121.
67. ATCC, T98G [T98-G] - CRL-1690, (2023). <https://www.atcc.org/products/crl-1690> (viimati vaadatud aprill 28, 2023).
68. Merck, Authenticated U251 MG Cell Line Sigma Aldrich, (2023). https://www.sigmaaldrich.com/EE/en/product/sigma/cb_09063001 (viimati vaadatud aprill 28, 2023).
69. M.D. Naidu, J.M. Mason, R.V. Pica, H. Fung, L.A. Peña, Radiation resistance in glioma cells determined by DNA damage repair activity of Ape1/Ref-1, *J Radiat Res*. 51 (2010) 393–404. DOI: 10.1269/jrr.09077.
70. E. Hart, Z. Odé, M.P.P. Derieppe, L. Groenink, M.W. Heymans, R. Otten, M.H. Lequin, G.O.R. Janssens, E.W. Hoving, D.G. van Vuurden, Blood-brain barrier permeability following conventional photon radiotherapy – A systematic review and meta-analysis of clinical and preclinical studies, *Clinical and Translational Radiation Oncology*. 35 (2022) 44–55. DOI: 10.1016/j.ctro.2022.04.013.
71. AAT Bioquest, EBSS (magnesium, calcium, phenol red) (pH 7.0) Preparation and Recipe, (2022). <https://www.aatbio.com/resources/buffer-preparations-and-recipes/ebss-calcium-magnesium-phenol-red-ph-7> (viimati vaadatud aprill 23, 2022).
72. J. van der Valk, G. Gstraunthaler, Fetal Bovine Serum (FBS) — A Pain in the Dish?, *Altern Lab Anim*. 45 (2017) 329–332. DOI: 10.1177/026119291704500611.

73. Corning, 25-052 | Corning® 100 mL Trypsin EDTA 1X, (2022).
<https://www.corning.com/catalog/cls/documents/formulations/CLS-CG-FM-033.pdf>
(viimati vaadatud aprill 24, 2022).
74. Rakukultuur, Vikipeedia. (2023). <https://et.wikipedia.org/w/index.php?title=Rakukultuur>
(viimati vaadatud märts 7, 2023).

9. LISAD

| | |
|--|----|
| Lisa 1. Töös uuritavad ühendid koos inhibeeritavate ensüümidega..... | 42 |
| Lisa 2. <i>Eagle's Minimum Essential Medium</i> rakusöötme koostisosad ja nende kontsentratsioonid..... | 43 |
| Lisa 3. Veepõhise fosfaatpuhvri <i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i> koostisosad ja nende kontsentratsioonid..... | 44 |
| Lisa 4. 0,25% trüpsiinilahuse koostisosad ja nende kontsentratsioonid..... | 45 |
| Lisa 5. Antud töös enne katsetega alustamist üks DAPI testi käigus tehtud fluorestsentskanali mikroskoopiapiltidest ja võrdluseks <i>Mycoplasma</i> saastega mikroskoopiapilt kirjandusest.... | 46 |
| Lisa 6. Alisertiibi doos-vastus kõver, millel esineb 0,1 μM kontsentratsioonist ($\log(c/M) = -7$) kõrgematel kontsentratsioonidel näiline tõus rakkude elulevuses..... | 47 |
| Lisa 7. Antud töös kasutatud alisertiibi lahuse HPLC-ESI-MS analüüsi tulemused..... | 48 |
| Lisa 8. Õppetoolis varem kasutatud alisertiibi lahuse HPLC-ESI-MS analüüsi tulemused..... | 49 |

Lisa 1. Töös uuritavad ühendid koos inhibeeritavate ensüümidega



Lisa 2. Eagle's Minimum Essential Medium rakusöötme koostisosad ja nende kontsentratsioonid [52,71]

| Koostisosa | c [mM] | Lisatud aminohape | c [mM] |
|---|---------|----------------------------------|--------|
| CaCl ₂ | 1,0 | L-alaniin | 0,1 |
| MgSO ₄ ·7 H ₂ O | 0,81 | L-arginiin*HCl | 0,6 |
| KCl | 5,0 | L-asparagiin*H ₂ O | 0,1 |
| NaHCO ₃ | 26 | L-asparagiinhape | 0,1 |
| NaCl | 117 | L-tsüsteiin*2HCl | 0,16 |
| Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O | 1,0 | L-glutamiinhape | 0,1 |
| Dekstroos | 6,0 | Glütsiin | 0,1 |
| Fenoolpunane | 0,03 | L-histidiin*HCl*H ₂ O | 0,2 |
| Lisatud aminohapped | - | L-isoletsütiin | 0,4 |
| L-glutamiin | 2,0 | L-leutsütiin | 0,4 |
| Natriumpüruvaat | 1,0 | L-lüsiin*HCl | 0,4 |
| NaHCO ₃ | 18 | L-metioniin | 0,1 |
| FBS | * | L-fenüülalaniin | 0,2 |
| Ampitsilliin | ** | L-proliin | 0,1 |
| Streptomütsiin | 0,17 | L-seriin | 0,1 |
| Amfoteritsiin B | 0,00027 | L-treoniin | 0,4 |
| | | L-trüptofaan | 0,05 |
| | | L-türosiin*2Na*2H ₂ O | 0,2 |
| | | L-valiin | 0,4 |

* tähistab 10% ruumala järgi; täpsetest koostisosadest ning nende kontsentratsioonidest ei ole võimalik FBS puhul rääkida, sest eri aastaegadel ja eri geograafilistes piirkondades toodetud FBS-i koostis võib varieeruda [72]

** tähistab 100 U/ml, kus U on *unit*, mis näitab aine bioloogilist aktiivsust

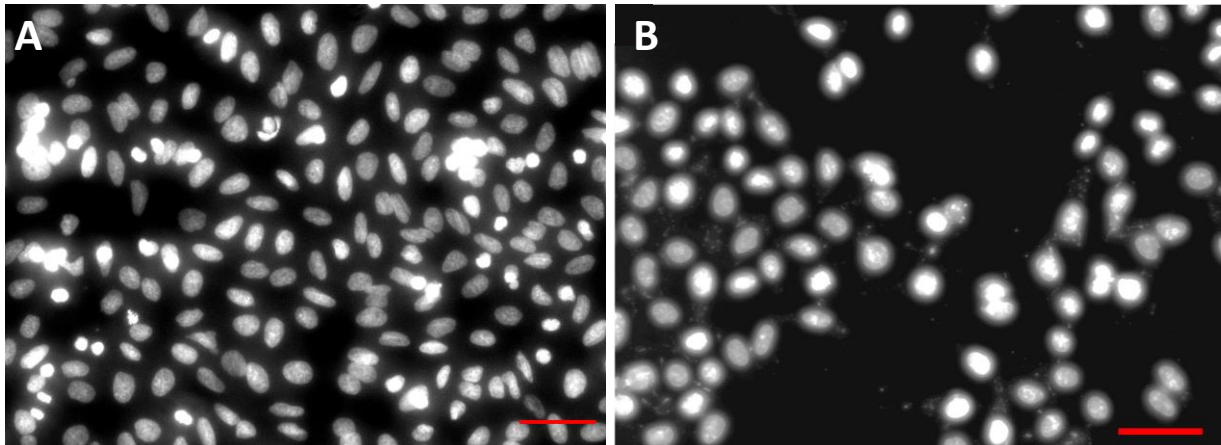
Lisa 3. Veepõhise fosfaatpuhvri Dulbecco's phosphate-buffered saline koostisosad ja nende kontsentratsioonid [47]

| Koostisosa | c [mM] |
|---|--------|
| CaCl ₂ | 0,90 |
| KCl | 2,68 |
| KH ₂ PO ₄ | 1,47 |
| MgCl ₂ ·6H ₂ O | 0,49 |
| NaCl | 137 |
| Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O | 8,10 |

Lisa 4. 0,25% trüpsiinilahuse koostisosad ja nende kontsentratsioonid [73]

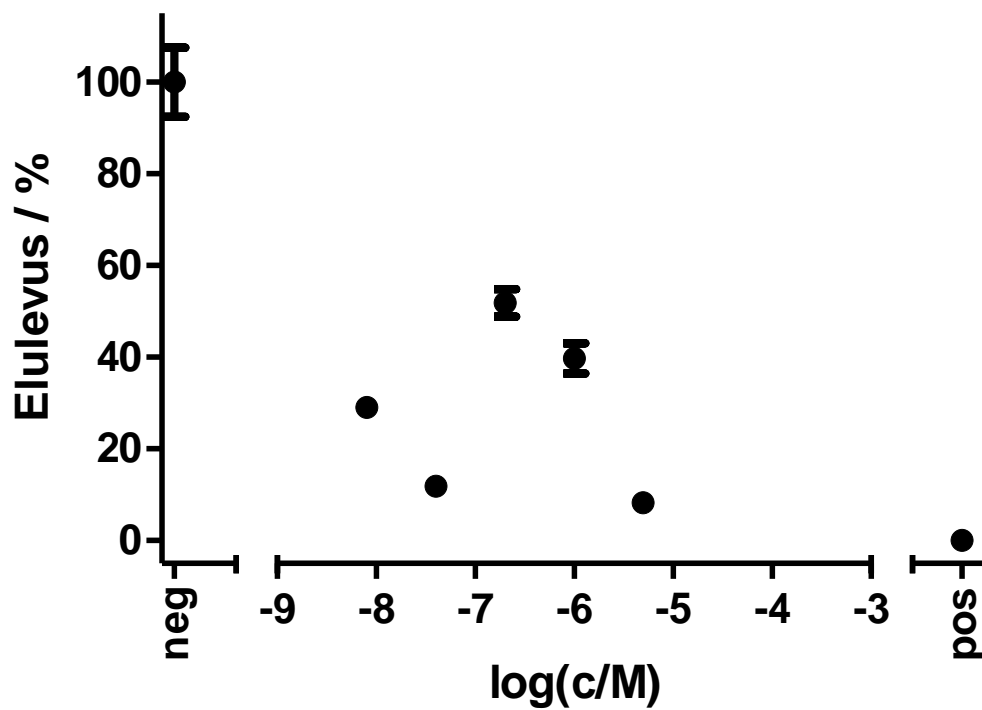
| Koostisosa | c [mM] |
|----------------------------------|--------|
| D-glükoos | 5,55 |
| Na ₄ EDTA | 0,53 |
| KCl | 5,37 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,44 |
| NaCl | 137 |
| Na ₂ HPO ₄ | 0,34 |
| Fenoolpunane | 0,03 |
| trüpsiin | 0,02 |

Lisa 5. Antud töös enne katsetega alustamist üks DAPI testi käigus tehtud fluorestsentskanali mikroskoopiapiltidest ja võrdluseks Mycoplasma saastega mikroskoopiapilt kirjandusest [74], CC BY-SA 4.0. Antud töös tehtud mikroskoopiapildil (A) ei ole väljaspool rakutuumasid fluorestseeruvaid täppe näha. Võrdluseks on Mycoplasma saastega mikroskoopiapildil (B) väljaspool rakutuumasid taolisi väikeseid fluorestseeruvaid täppe näha (Mycoplasma saaste). Skaala suurus on 50 μm .



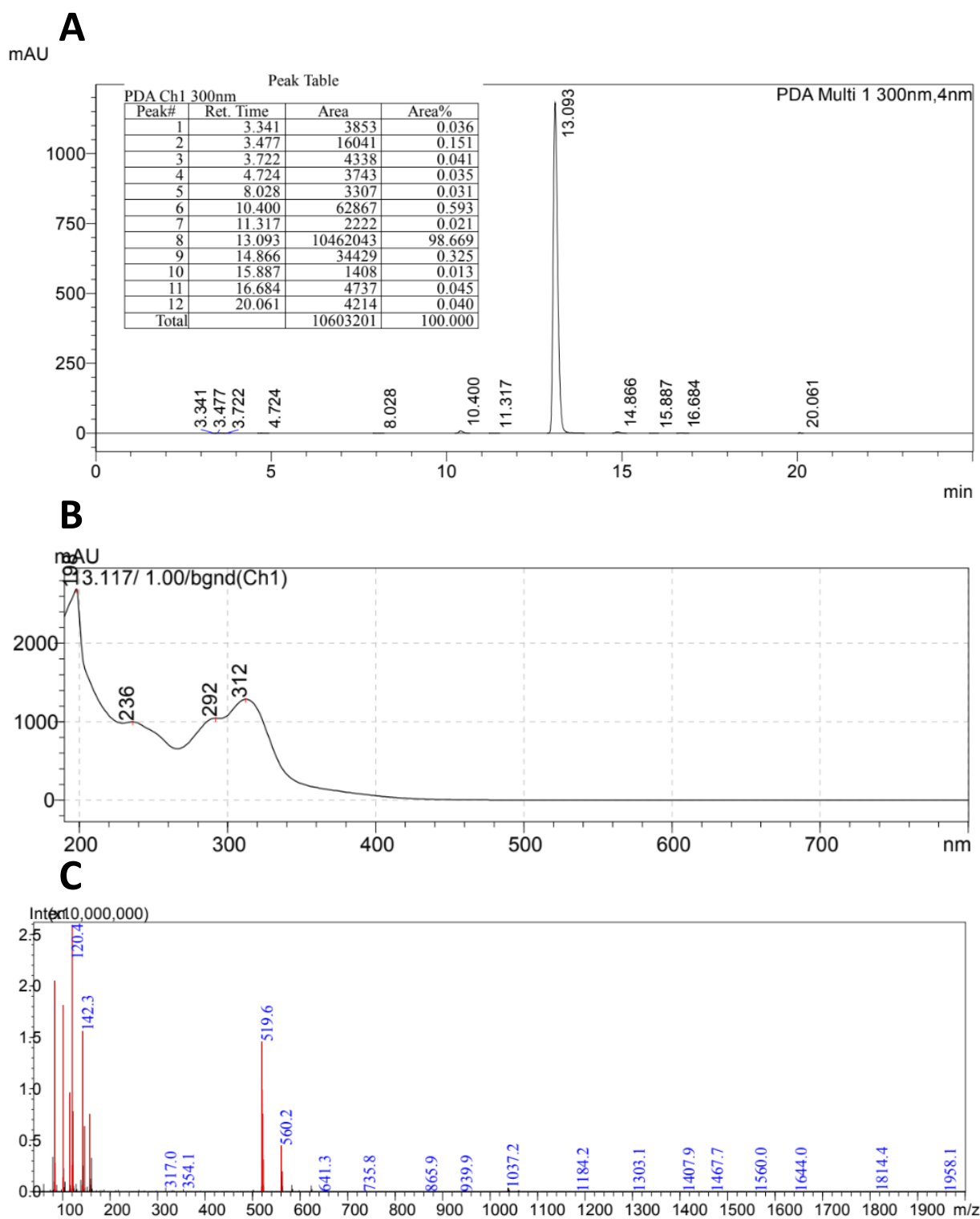
Plaadi vaatamiseks kasutati BioTek Cytation 5 plaadilugejat. Plaat vaadati nii läbiva valgusega kui ka DAPI filterkuubikuga. DAPI filterkuubikuga süvendeid vaadates ergastati rakke lainepikkusel 377 nm ja fluorestsentsi vaadeldi lainepikkusel 447 nm. Süvendite mikroskoobiga vaatamisel prooviti fluorestsentskanalist üles leida piirkondi, kus väljaspool rakutuuma nähti fluorestseeruvaid täppe. Kuna fluorestseerub just DAPI ja DNA kompleks, siis väljaspool rakutuumasid paiknevad fluorestseeruvad täpid võivad viidata potentsiaalsele saastele. Taoliste kohtade leidumisel tehti neist pilt nii fluorestsentskanalis kui ka läbiva valgusega. Samu kohti läbiva valgusega vaadates kontrolliti, kas tegu on potentsiaalse saastega (koondub raku plasmamembraanil), tuumavälise DNA või rakusurma järel tekkinud apoptootilise kehaga. Protsessi korrati ühes süvendis mitu korda ja seejärel liiguti järgmise süvendi juurde.

Lisa 6. Alisertiibi doos-vastus kõver, millel esineb $0,1 \mu\text{M}$ kontsentratsioonist ($\log(c/M) = -7$) kõrgematel kontsentratsioonidel näiline tõus rakkude elulevuses



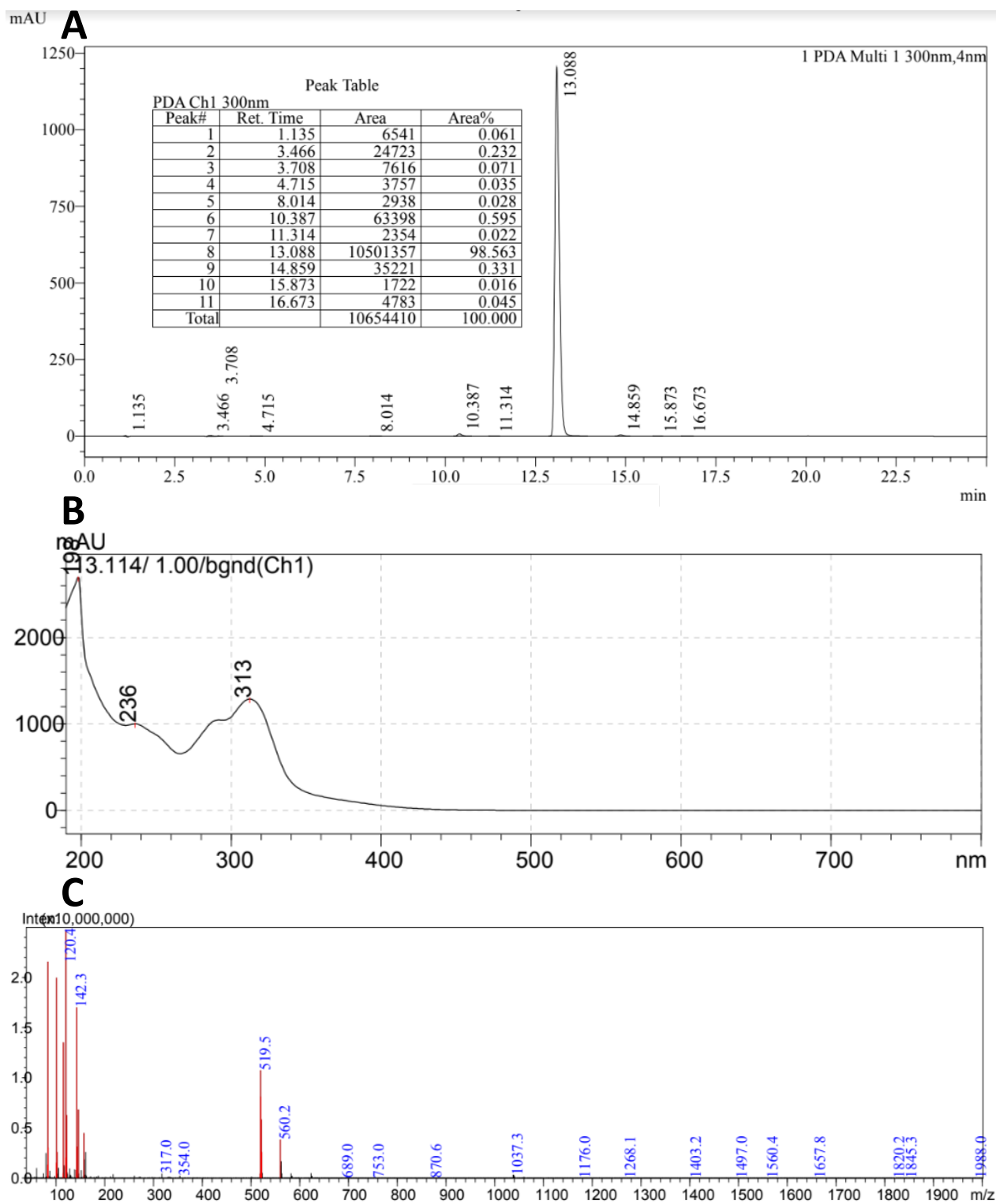
Neg ja pos on vastavalt negatiivse ja positiivse kontrolli signaaliväärtused, mida kasutati normaliseerimisel.

Lisa 7. Antud töös kasutatud alisertiibi lahuse HPLC-ESI-MS analüüsi tulemused



Lisas on välja toodud HPLC kromatogramm, mis detekteeriti lainepikkusel 300 nm detektoriga, mis mõõdab ultravioletse ja nähtava valguse ala neelduvust (UV-Vis) (A). Sellele järgneb UV-Vis spekter 13,093 min piigi jaoks (B) ning sama piigi jaoks mõõdetud ESI-MS massispekter (C), kus on näha molekulaariooni m/z suhtega 519,6.

Lisa 8. Õppetoolis varem kasutatud alisertiibi lahuse HPLC-ESI-MS analüüsi tulemused



Lisas on välja toodud HPLC kromatogramm, mis detekteeriti lainepikkusel 300 nm detektoriga, mis mõõdab ultravioletse ja nähtava valguse ala neelduvust (UV-Vis) (A). Sellele järgneb UV-Vis spekter 13,088 min piigi jaoks (B) ning sama piigi jaoks mõõdetud ESI-MS massispekter (C), kus on näha molekulaariooni m/z suhtega 519,5.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Mattias Kaspar Krõlov,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

„Elulevuse profiili mõõtmine resasuriini meetodil glioblastoomi rakuliinis U87-MG hüpoksilistes ja normoksilistes tingimustes“,

mille juhendaja on Darja Lavõgina,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Mattias Kaspar Krõlov

24.05.2023