



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU, BIOHEMIJU
I ZAŠTITU ŽIVOTNE SREDINE



Sofija Bekić

**Razvoj bioloških testova za identifikaciju
liganada steroidnih receptora i ispitivanje
aktivnosti steroidogenog enzima
aromataze**

-doktorska disertacija-

Novi Sad, 2020.

Predgovor

Dok se približavam kraju najvišeg stepena studija obuzimaju me neopisivo zadovoljstvo, sreća i osećaj lične ispunjenosti, koji ne bi bili potpuni bez izražavanja zahvalnosti onima koji su mi na bilo koji način pomogli u tome.

Ova doktorska disertacija je urađena u okviru istraživanja na projektu „Sinteza, karakterizacija i biološka ispitivanja steroidnih derivata i njihovih molekulskih agregata“ (broj projekta: 172021) finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Najveći deo eksperimentalnog istraživanja je sproveden u Laboratoriji za biohemiju i molekularnu biologiju Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, dok se deo korišćenih aparata i opreme nalazi u okviru drugih laboratorija istog departmana, kao i na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine. Ispitivanje antiproliferativne aktivnosti odabranih modifikovanih steroida sprovedeno je u Laboratoriji za eksperimentalnu onkologiju Instituta za onkologiju Vojvodine u Sremskoj Kamenici, dok je za studije protein-ligand interakcija fluorescentnom spektroskopijom korišćena oprema Centra za nanobiologiju i strukturnu biologiju u Novim Hradima, u Češkoj.

Zahvaliti na adekvatan način svim pojedincima čija podrška je doprinela da se ove korice potpisane mojim imenom nalaze u rukama čitaoca čini mi se jednako zahtevno kao i izrada same doktorske disertacije.

Pre svega, veliku zahvalnost izražavam mojim mentorima, dr Anđelki Ćelić i dr Suzani Jovanović-Šanta, vanrednim profesorima Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, pod čijim rukovodstvom je realizovana ova doktorska disertacija. Hvala vam za svu stručnu pomoć i dragocene savete tokom istraživačkog rada, nesebično pružanje znanja, konstruktivne sugestije i usmeravanje tokom izrade same doktorske disertacije. Zahvaljujem vam se i na poverenju da kao istraživač budem učesnik međunarodnih projekata pod vašim rukovodstvom, čime mi je omogućen napredak u naučnoj karijeri. Dr Anđelki Ćelić se posebno zahvaljujem što me je prihvatila u svoju laboratoriju i sa velikim strpljenjem uvela u uzbudljiv svet tehnika molekularne biologije, a dr Suzani Jovanović-Šanta, koja kroz mentorstvo prati moj naučni razvoj još od osnovnih studija, dugujem posebnu zahvalnost što me je zainteresovala za kompleksnu oblast biohemije steroida i pomogla mi da je razumem.

Veliku zahvalnost uputila bih i uvažanim članovima Komisije, dr Radivoju Prodanoviću, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta u Beogradu, i dr Andrei Nikolić, docentu Prirodno-

matematičkog fakulteta u Novom Sadu, na izdvojenom vremenu i posvećenosti prilikom čitanja ove doktorske disertacije, kao i na korisnim savetima kako da poboljšam njen kvalitet. Dr Edwardu Petriju, vanrednom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, se, pored ogromne stručne pomoći i spremnosti da odgovori na svako moje pitanje, od srca zahvaljujem na večitom optimizmu kojim zrači, a koji često nedostaje u laboratoriji. Čak i kada bih bila potpuno uverena da eksperiment nije uspeo, on bi pružio utehu pronalaskom potpuno originalnog rešenja zašto su dobijeni rezultati ipak dobri i konstantno me ohrabrivao. Dr Mariji Sakač, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, se najlepše zahvaljujem na svemu što je učinila za mene, u prvom redu na velikoj podršci i zalaganju kada mi je bilo najpotrebnije, kao i na poverenju koje mi je ukazala uključujući me u rad na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod njenim rukovodstvom. Ovom prilikom istakla bih duboku zahvalnost i kolegama sa projekta: vanr. prof. dr Jovani Ajduković, doc. dr Andrei Nikolić, doc. dr Marini Savić, doc. dr Aleksandru Oklješi, dr Ivani Kuzminac i MSc Vidaku Raičeviću bez čijih sintetisanih jedinjenja, ne bi bilo ni ove doktorske disertacije. Kada sam kod nabiranja ključnih komponenata bez kojih disertacija ne bi danas imala ovakvu formu, moram naglasiti i darežljivost koju su pokazali dr Blake Peterson, dr Gianfranco Gilardi, dr Gilles Truan i dr Norio Kagawa ljubaznim ustupanjem plazmidnih konstrukata i sojeva kvasca korišćenih u ovom istraživanju. Dr Vesni Kojić, naučnom saradniku sa Instituta za onkologiju Vojvodine u Sremskoj Kamenici, sam veoma zahvalna na izvedenim testovima ispitivanja citotoksičnosti odabranih modifikovanih steroida na tumorskim ćelijama.

Ovim putem volela bih da se zahvalim i svim kolegama sa Katedre za biohemiju i hemiju prirodnih proizvoda, sa kojima je pravo zadovoljstvo sarađivati. Istakla bih prijateljski odnos sa naučnim saradnicima, dr Milenom Rašetom i dr Sanjom Krstić, koja mi je pomogla oko pripreme biljnih ekstrakata korišćenih u disertaciji, kao i sa MSc Tatjanom Majkić, MSc Diandrom Pintać i jedinstvenom Macom.

Veliko zadovoljstvo mi je da spomenem imena članova Laboratorije za biohemiju i molekularnu biologiju Departmana za biologiju i ekologiju koji su me od prvog dana srdačno prihvatili i učinili da se osećam kao potpuno ravnopravni član njihovog fenomenalnog tima. Dr Danijeli Kojić i dr Jeleni Purać, vanrednim profesorima Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, se, osim mnoštva stručnih saveta i interesovanja koje su pokazale za moju doktorsku disertaciju, zahvaljujem na lepim jutarnjim razgovorima kojima smo započinjale dan.

Jovani i Maji, od kojih niko nije mogao bolje razumeti lepe i one manje lepe trenutke doktorskih studija, se od srca zahvaljujem na spremnosti da mi pomognu u svakom trenutku, na svim našim malim razgovorima i divnoj kolegijalnosti. Nikada neću zaboraviti vreme koje smo zajedno provele tokom istraživačkih boravaka u inostranstvu. Tanja i Snežo, vama želim da se zahvalim na veoma prijatnim i ohrabrujućim razgovorima koje smo vodile u pauzama rada, kao i na tome što bih se u vašoj blizini u laboratoriji uvek osećala potpuno bezbrižno, čak i ako nešto krene po zlu. Zahvaljujući Ivinom impresivnom poznavanju pravopisa srpskog jezika sa lakoćom sam rešavala jezičke nedoumice u okviru doktorske disertacije i mnogo joj hvala na tome. Željku, Elviri, Milošu, Srđani i Ani hvala na lepoj saradnji i prijatnoj atmosferi u laboratoriji.

Sa druge strane, bez mojih brojnih prijatelja dragoceni trenuci slobodnog vremena ne bi bili u potpunosti ispunjeni, te im upućujem iskrenu zahvalnost što mi ih ulepšavaju svih ovih godina. Ovu doktorsku disertaciju od srca posvećujem onima koji imaju najveću zaslugu za to što sam danas, mojim voljenim roditeljima, čija bezgranična ljubav, podrška i požrtvovanost me prate ceo životni put. Beskrajno vam hvala što ste uvek bili tu, nesebično ulagali u mene, učili me pravim vrednostima, verovali i kada ja nisam, nemoguće činili mogućim, ispraćali me i dočekivali. Kod izražavanja zahvalnosti koju osećam prema vama ponestaju prave reči, a naviru suze. Neizmernu zahvalnost dugujem i bratu Milanu, koji je razumeo sva moja učenja do kasno u noć, još iz školskih dana, i čiji su bezrezervna podrška i oslonac kroz život značajno doprineli mojim uspesima. Bez daljnjeg, veliki doprinos u ostvarenju ovog životnog cilja imali su i ostali članovi moje porodice, pri čemu bih posebno izdvojila moje drage bake, Kaku, u idili čijeg cvetnog dvorišta u selu je bilo najlepše učiti, koja je uvek bdila nada mnom, neumorno se svima hvalila mojim dostignućima i čija dobrota i vedri duh ne poznaju granice, i Milevu iz čijih životnih saveta, mudrosti i iskustva sam mnogo naučila. Na kraju, mom dragom Dušanu, u čijem zagrljaju je život dobio potpuno novi smisao i čijim osmehom su otklanjane poteškoće na ovom putu, iz dubine duše upućujem zahvalnost za svu pruženu ljubav, razumevanje i strpljenje tokom proteklih godina. Mnogo sam srećna što vas imam, a u isto vreme tužna što ste osetili težinu ove doktorske disertacije.

Najlepše vam svima hvala!

Novi Sad, januar 2020.

Sofija Bekić

Mami i tati za svu ljubav.

Lista skraćenica i pojmova

ADT	Androgen-deprivaciona terapija
AF	<i>Engl.</i> activation function
AIS	Sindrom neosetljivosti na androgene (<i>engl.</i> androgen insensitivity syndrome)
AP1	<i>Engl.</i> activating protein 1
AR	Androgeni receptor
ARE	Elementi odgovora na androgene (<i>engl.</i> androgen response elements)
ASD	Androstendion
ATP	Adenozin trifosfat
bp	Bazni par
cAMP	Ciklični adenozin monofosfat
CARM1	<i>Engl.</i> coactivator-associated arginine methyltransferase 1
CBP	<i>Engl.</i> CREB-binding protein
CCDC	<i>Engl.</i> Cambridge Crystallographic Data Centre
cDNK	Komplementarna DNK
cLogP	Logaritamska vrednost particionog koeficijenta
CPR	Citohrom P450 reduktaza
CRPC	Kancer prostate rezistentan na kastraciju (<i>engl.</i> castrate resistant prostate cancer)
CTE	C terminalni produžetak (<i>engl.</i> C terminal extension)
CYP	Familija citohrom P450 proteina
DBD	DNK vezujući domen (<i>engl.</i> DNA binding domain)
DBF	Dibenzilfluorescein
DHEA	Dehidroepiandrosteron
DHT	Dihidrotestosteron
DMEM	Dulbekov modifikovani medijum (<i>engl.</i> Dulbecco's modified Eagle's medium)
DMSO	Dimetilsulfoksid
DOX	Doksorubicin

DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DTT	Ditiotreitol
E	Eluat
E1	Estron
E2	Estradiol
EDTA	Etilendiamintetrasirćetna kiselina
ELISA	Enzimski imunoadsorpcioni test (<i>engl.</i> enzyme-linked immunosorbent assay)
EPR	Elektronska paramagnetna rezonanca
ER	Estrogeni receptor
ER+	Estrogen receptor pozitivno
ERE	Elementi odgovora na estrogene (<i>engl.</i> estrogen response elements)
ERR	Receptori srodni estrogenim (<i>engl.</i> estrogen related receptors)
EXM	Eksemestan
F	Fracije nakon ekskluzione hromatografije
FCS	Fetalni teleći serum (<i>engl.</i> fetal calf serum)
FOR	Formestan
FRET	Fluorescentni rezonantni transfer energije (<i>engl.</i> fluorescence resonance energy transfer)
FT	Protočna frakcija (<i>engl.</i> flow through)
FTIR	Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (<i>engl.</i> Fourier transform infrared spectroscopy)
GA	Genetički algoritam
GFP	Zeleni fluorescentni protein (<i>engl.</i> green fluorescent protein)
GnRH	Gonadotropin-oslobađajući hormon (<i>engl.</i> gonadotropin-releasing hormone)
GPCR	G protein-kuplovani receptor (<i>engl.</i> G protein-coupled receptor)
H295R	Ćelijska linija adrenokortikalnog karcinoma
HRE	Elementi hormonskog odgovora (<i>engl.</i> hormone response elements)
HRT	Hormonska supstituciona terapija (<i>engl.</i> hormone replacement therapy)

HSD	Hidroksisteroid dehidrogenaza
Hsp	Protein toplotnog šoka (<i>engl.</i> heat shock protein)
HTS	Testiranje velikog broja uzoraka odjednom (<i>engl.</i> high throughput screening)
IC ₅₀	Polovina maksimalne inhibitorne koncentracije
IMAC	Afinitetna hromatografija sa imobilisanim metalom (<i>engl.</i> immobilized metal affinity chromatography)
IPTG	Izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid
JEG-3	Ćelijska linija horiokarcinoma
Kd	Konstanta disocijacije
L	Lizat
LB	Medijum za gajenje bakterija (<i>engl.</i> lysogeny broth)
LBD	Ligand vezujući domen (<i>engl.</i> ligand binding domain)
LH	Luteinizirajući hormon
LHRH	Luteinizirajući hormon-oslobađajući hormon (<i>engl.</i> luteinizing hormone-releasing hormone), u literaturi poznat i kao GnRH
M	Marker
MAPK	Protein kinaza aktivirana mitogenom (<i>engl.</i> mitogen-activated protein kinase)
MCF-7	Ćelijska linija estrogen receptor pozitivnog adenokarcinoma dojke
MMF94s	Polje sile (<i>engl.</i> merck molecular force field 94)
MRC-5	Ćelijska linija zdravih fibroblasta pluća
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NI	Neindukovana kontrola
NLS	Nuklearni lokalizacioni signal
NMR	Nuklearna magnetna rezonantna spektroskopija
NTD	N-terminalni domen
OD	Optička gustina (<i>engl.</i> optical density)
ORI	Mesto početka replikacije (<i>engl.</i> origin of replication)

P	Spojene (<i>engl.</i> pooled) frakcije
p300	<i>Engl.</i> E1A-associated protein p300
PAGE	Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (<i>engl.</i> polyacrylamide gel electrophoresis)
PC-3	Ćelijska linija adenokarcinoma prostate
PDB	Baza podataka o proteinima (<i>engl.</i> Protein Data Bank)
PEG	Polietilenglikol
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluorid (<i>engl.</i> phenylmethylsulfonyl fluoride)
polyQ	Poliglutaminski trakt
PSA	Specifični antigen prostate (<i>engl.</i> prostate specific antigen)
Rf	Retencioni faktor
RMSD	Srednja kvadratna standardna devijacija (<i>engl.</i> root-mean-square deviation)
SARM	Selektivni modulatori androgenih receptora (<i>engl.</i> selective androgen receptor modulators)
SD-	Selektivni medijum u odsustvu odgovarajuće aminokiseline/a (<i>engl.</i> synthetic drop-out)
SDS	Natrijum dodecil sulfat (<i>engl.</i> sodium dodecyl sulfate)
SERD	Selektivni agensi za degradaciju estrogenih receptora (<i>engl.</i> selective estrogen receptor degrader)
SERM	Selektivni modulator estrogenih receptora (<i>engl.</i> selective estrogen receptor modulator)
SIL	Sildenafil
SN	Supernatant
Sp1	<i>Engl.</i> specificity protein
SPA	Test blizine scintilacije (<i>engl.</i> scintillation proximity assay)
SRC	Koaktivator steroidnih receptora (<i>engl.</i> steroid receptor coactivator)
ssDNK	Jednolančana DNK (<i>engl.</i> single stranded DNA)
T	Talog
T	Testosteron

TB	Medijum za gajenje bakterija (<i>engl.</i> terrific broth)
TBP	TATA vezujući protein (<i>engl.</i> TATA box binding protein)
TLC	Tankoslojna hromatografija (<i>engl.</i> thin-layer chromatography)
TMX	Tamoksifen
W	Frakcija nakon ispiranja His trap kolone
YAS	Androgeni skrining test u kvascu (<i>engl.</i> yeast androgen screen)
YES	Estrogeni skrining test u kvascu (<i>engl.</i> yeast estrogen screen)
YFP	Žuti fluorescentni protein (<i>engl.</i> yellow fluorescent protein)
YPD	Medijum za gajenje kvasaca (<i>engl.</i> yeast extract-peptone-dextrose)

Sadržaj

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	4
2.1. Steroidni hormoni	4
2.1.1. Struktura i fiziološki efekti steroidnih hormona	4
2.1.2. Biosinteza steroidnih hormona-steroidogeneza	7
2.1.3. Mehanizam delovanja steroidnih hormona	8
2.1.4. Patofiziološka uloga estrogenih i androgenih hormona u kanceru dojke i prostate	10
2.1.5. Mogućnosti lečenja hormon-zavisnih kancera	12
2.1.5.1. Hormonska terapija kancera dojke i prostate	13
2.1.6. Derivati steroidnih hormona kao antikancerski agensi	15
2.1.7. Terapeutska svojstva fitoestrogena	17
2.2. Steroidni receptori	19
2.2.1. Struktura i funkcija steroidnih receptora	20
2.2.1.1. Estrogeni receptor	23
2.2.1.2. Androgeni receptor	26
2.2.2. Odabrane metode za ispitivanje interakcija između steroidnih receptora i njihovih liganada ..	29
2.2.2.1. Fluorescentni test u kvascu	32
2.2.2.1.1. Kvasac kao model organizam	33
2.2.2.2. <i>In silico</i> predviđanje protein-ligand interakcija	35
2.3. Aromataza	37
2.3.1. Struktura i funkcija aromataze	37
2.3.2. Mehanizam delovanja aromataze	40
2.3.3. Inhibicija aromataze	42
2.3.4. Odabrane metode za ispitivanje aktivnosti aromataze	45
2.3.4.1. Rekombinantna ekspresija aromataze	47
2.3.5. Odabrane metode za detekciju vezivanja liganada za CYP450 enzime	49
2.3.5.1. Apsorpciona spektroskopija	50
2.3.5.2. Fluorescentna spektroskopija	52
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	54
4. EKSPERIMENTALNI DEO	56
4.1. Sojevi bakterija i kvasaca i plazmidni konstrukti	56
4.1.1. Ekstrakcija plazmida i kvasaca sa papira	57

4.2. Medijumi i podloge za rast bakterija i kvasaca.....	58
4.3. Ispitivana jedinjenja.....	59
4.4. Dobijanje kompetentnih bakterija.....	68
4.5. Transformacija bakterija.....	69
4.6. Prečišćavanje plazmidne DNK.....	71
4.6.1. Restrikciona digestija.....	72
4.6.2. Elektroforeza na agaroznom gelu.....	74
4.7. Transformacija kvasaca.....	75
4.7.1. Modifikovani protokoli kojima se povećava efikasnost transformacije kvasaca.....	77
4.8. Optimizacija fluorescentnog testa u kvascu za ispitivanje afiniteta vezivanja steroidnih jedinjenja za steroidne receptore.....	78
4.8.1. Fluorescentna mikroskopija.....	79
4.8.1.1. Denzitometrijska (ImageJ) analiza slika.....	80
4.8.2. Merenje fluorescencije u 96-formatu.....	81
4.9. Optimizacija fluorescentnog testa u kvascu za ispitivanje afiniteta fitoestrogena i estrogenog potencijala ekstrakata odabranih biljnih vrsta.....	82
4.9.1. Priprema ekstrakata odabranih biljnih vrsta.....	83
4.10. Određivanje citotoksičnosti MTT testom.....	84
4.11. Predviđanje protein-ligand interakcija molekularnim dokingom.....	86
4.12. Optimizacija heterologne ekspresije humane aromataze u <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	87
4.13. Izolacija kvašćevih mikrozoma precipitacijom solima.....	88
4.13.1. Ispitivanje aktivnosti CPR.....	89
4.14. Heterologna ekspresija humane aromataze u bakterijama <i>Escherichia coli</i>	90
4.15. Izolacija i prečišćavanje proteina Ni-afinitetnom i gel filtracionom hromatografijom.....	91
4.15.1. Razdvajanje proteina SDS-PAGE elektroforezom.....	93
4.15.2. Određivanje koncentracije proteina.....	94
4.16. Određivanje aktivnosti aromataze i inhibitornog potencijala odabranih steroidnih jedinjenja.....	94
4.16.1. Detekcija proizvoda enzimske reakcije tankoslojnom hromatografijom.....	96
4.16.1.1. Denzitometrijska analiza TLC hromatograma.....	97
4.16.2. Ispitivanje aktivnosti aromataze u tečnoj kulturi kvasaca bez izolacije mikrozoma.....	97
4.16.3. Kuplovani fluorescentni test za ispitivanje aktivnosti aromataze.....	98
4.16.4. Test oksidacije NADPH.....	99
4.17. Ispitivanje vezivanja liganada za aromatazu apsorpcionom spektroskopijom.....	99
4.18. Ispitivanje vezivanja liganada za aromatazu fluorescentnom spektroskopijom.....	100

5. REZULTATI I DISKUSIJA	102
5.1. Pregled korišćenih plazmidnih konstrukata	102
5.2. Verifikacija korišćenih plazmidnih konstrukata agaroznom elektroforezom nakon prečišćavanja iz DH5 α ćelija	105
5.3. Optimizacija netranskripcionog fluorescentnog testa u kvascu za detekciju liganada steroidnih receptora.....	108
5.3.1. Merenje relativnog afiniteta vezivanja liganada za ER α , ER β i AR fluorescentnom mikroskopijom živih ćelija.....	109
5.3.2. Merenje relativnog afiniteta vezivanja liganada za ER α , ER β i AR fluorimetrijom u pločama sa 96 polja	111
5.3.3. <i>In vitro</i> antiproliferativna aktivnost jedinjenja 1-4	114
5.3.4. Afinitet vezivanja jedinjenja 1-4 za LBD ER α / β predviđen molekularnim dokingom.....	115
5.4. Afinitet vezivanja modifikovanih steroida za ER α , ER β i AR, izmeren optimizovanim netranskripcionim fluorescentnim testom u kvascu	117
5.5. Primena netranskripcionog fluorescentnog testa u kvascu za ispitivanje afiniteta vezivanja fitoestrogena za ER β i estrogenog potencijala odabranih biljnih ekstrakata	122
5.6. Efikasnost transformacije sojeva sa optimizovanom redoks sredinom i prepoznavanje problema u vezi sa ćelijskom respiracijom	127
5.7. Mikrozomalna frakcija <i>Saccharomyces cerevisiae</i> kao izvor humane aromataze i/ili CPR.....	130
5.7.1. <i>In vitro</i> redukcija citohroma c aktivnošću CPR iz mikrozoma	131
5.8. Strategija za ekspresiju aromataze u bakterijama i izolovanje proteina u ligand-nezavisnoj formi	133
5.9. Aktivnost rekombinantne aromataze u jednokomponentnom i dvokomponentnom enzimskom testu i inhibitorni efekat odabranih steroidnih derivata	137
5.9.1. Rezultati ispitivanja aktivnosti aromataze ostalim testovima	142
5.10. Skrining vezivanja liganada za aromatazu apsorpcionom spektroskopijom.....	146
5.11. Promene u konformaciji aromataze usled vezivanja liganda praćene fluorescencijom triptofana	151
6. ZAKLJUČAK	155
7. LITERATURA	160
Biografija	177

1. UVOD

Razvoj antikancerskih agenasa predstavlja pravi izazov 21. veka. Iako je napredak medicine doveo do poboljšanja kvaliteta života, kancer se i dalje javlja sa velikom učestalošću i smrtnošću. Kanceri reproduktivnih tkiva predstavljaju zdravstveni problem globalnih razmera, pa se veliki naponi ulažu u otkrivanje efikasnijih terapijskih pristupa [1]. Trenutno postoje dva osnovna aspekta lečenja: metode lokalne terapije, koje obuhvataju hirurške tretmane i radioterapiju, i metode sistemskog lečenja, koje obuhvataju primenu specifičnih lekova koji krvotokom dospevaju do ciljnog tumorskog tkiva (citostatici, hormonska, ciljana i imuno terapija) [2].

Pored toga što imaju ključnu ulogu u fiziološkom razvoju i funkcionisanju reproduktivnih tkiva i organa, steroidni hormoni su uključeni i u njihove maligne promene, kao i u nastanak drugih bolesti i stanja zavisnih od koncentracije ovih hormona. Veliki broj kancera reproduktivnih tkiva zavisan je od koncentracije steroidnih hormona, te iz tog razloga, snižavanje njihove koncentracije ili sprečavanje delovanja može dovesti do smanjenja ili zaustavljanja proliferacije hormonski zavisnih ćelija kancera. Efikasni terapijski pristupi u ovom polju obuhvataju selektivnu inhibiciju određenih enzima steroidogeneze i/ili blokiranje vezivanja steroidnih hormona za specifične receptore [3].

Steroidni hormoni svoju fiziološku aktivnost ispoljavaju vezivanjem za specifične steroidne receptore, koji pripadaju porodici nuklearnih receptora, odnosno transkripcionih faktora koji se aktiviraju ligandima. Mehanizam njihovog delovanja obuhvata dimerizaciju receptora nakon specifičnog vezivanja liganda, translokaciju nastalog kompleksa u jedro i interakciju sa koregulatornim proteinima i specifičnim sekvencama DNK, što rezultuje transkripcijom ciljnih gena [4]. Estrogeni hormoni ispoljavaju fiziološke efekte specifičnim vezivanjem za dve izoforme estrogenog receptora, α i β (ER α i ER β) [5], stimulišući na taj način rast i proliferaciju zdravih epitelijalnih, ali i estrogen-zavisnih malignih ćelija dojke [6], jajnika [7] i drugih endokrinih tkiva. Sa druge strane, aktivnost androgena vezivanjem za androgene receptore (AR) je esencijalna za normalan razvoj prostate i drugih reproduktivnih tkiva muškaraca, ali i razvoj i napredovanje kancera prostate, u čijim je mnogim tipovima uočena povećana ekspresija ovog receptora [8]. S obzirom na značaj steroidnih receptora kao terapijskih meta, ne samo kod kancera reproduktivnih tkiva, već i kod raznih drugih stanja i bolesti zavisnih od steroidnih hormona [9,10], među istraživačima vlada veliki interes za razvoj metoda za otkrivanje njihovih

liganada. Budući da neki od testova opisanih u literaturi nose bezbednosne probleme, a drugi zahtevaju skupu opremu i posebne licence [11–14] razvijanje nove neradioaktivne i netranskripcione metode sa visokom specifičnošću i niskim troškovima izvođenja se nameće kao bitan cilj istraživanja.

Tokom reproduktivnog perioda kod žena estrogeni se pretežno sintetišu pod dejstvom steroidnog enzima aromataze u jajnicima, međutim, nakon menopauze, kada jajnici izgube svoju funkciju, osnovni izvor estrogena postaje konverzija androgena delovanjem aromataze u perifernim tkivima [15]. Aromataza ima bitne uloge u seksualnoj diferencijaciji i reprodukciji, ali i u kancerogenezi, pa je tako u tumorskom tkivu dojke uočena njena povećana ekspresija i viši nivo estrogena u odnosu na zdravo tkivo [16]. Imajući u vidu navedeno, kao i činjenicu da najveći procenat obolelih čine žene u postmenopauzi, inhibicija aromataze je ključni terapijski pristup u tretmanu estrogen-zavisnog kancera dojke kod žena u ovom dobu. Inhibitori aromataze mogu smanjiti nivo estrogena i preko 90% i predstavljaju standardnu terapiju u lečenju ove maligne bolesti [15,17]. Zbog pratećih neželjenih efekata prilikom terapije postojećim inhibitorima aromataze, teži se otkrivanju novih, sa povećanom specifičnošću i efikasnošću. Eksperimentalne metode za određivanje aktivnosti aromataze su od ključnog značaja za ispitivanje njenih inhibitora, a time i otkrivanje potencijalnih terapeutika. Iako je u literaturi opisano nekoliko *in vitro* i *in vivo* metoda [18–22], mnoge istraživačke grupe i dalje rade na razvoju novih visoko specifičnih, ekonomičnih u smislu vremena i troškova, reproducibilnih metoda, bez štetnih uticaja po ljudsko zdravlje.

Zahvaljujući svojim strukturnim karakteristikama i mogućnosti modifikacije steroidnog jezgra, čime se značajno utiče na njihovu biološku aktivnost, steroidna jedinjenja su izuzetno atraktivni kandidati za inhibiciju steroidnih enzima i promenu mogućnosti delovanja steroidnih receptora [23]. Da li novootkriveno biološki aktivno jedinjenje pozitivno utiče na lečenje pacijenta obolelog od kancera najprecizniji odgovor daju klinička ispitivanja, međutim, zbog etičkih i finansijskih ograničenja, prethode im istraživanja koja se izvode na eksperimentalnim organizmima kao model-sistemima [24]. Takva istraživanja često zahtevaju rad na rekombinantnom proteinu eksprimiranom u odgovarajućem model sistemu koji karakteriše jednostavno i jeftino laboratorijsko uzgajanje i genom kojim se lako manipuliše [25]. Dakle, osim na sintezu strukturno modifikovanih steroidnih jedinjenja, intenzivna biomedicinska

istraživanja su fokusirana i na razvoj bioloških testova za procenu afiniteta vezivanja jedinjenja za steroidne receptore, kao i inhibirajućeg potencijala prema aromatazi.

2. OPŠTI DEO

Opšti deo doktorske disertacije obuhvata pregled vladajućih stavova u naučnoj literaturi u oblasti biohemije steroida, tj. pregledni prikaz postojećih podataka o biosintezi i mehanizmu delovanja steroidnih hormona, kancerogenezi, u kojoj signaling steroidnih hormona igra centralnu ulogu, kao i identifikovanju strukturnih analoga endogenih hormona sa terapijskim potencijalom primenom metoda zasnovanih na različitim principima.

2.1. Steroidni hormoni

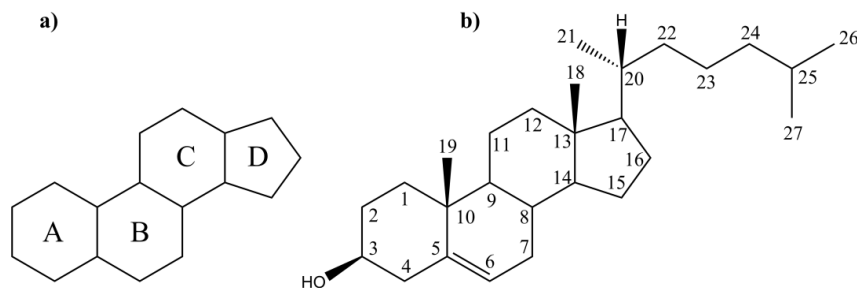
Endokrini sistem je mesto sinteze tri tipa hormona: steroidnih, peptidnih i derivata aminokiselina. Steroidni hormoni su lipofilni molekuli sa ulogom sekundarnih glasnika u mnogim organizmima, gde regulišu širok spektar fizioloških procesa od fetalnog do odraslog doba. Primarna mesta njihove sinteze i sekrecije su gonade, nadbubrežne žlezde i placenta. U zavisnosti od funkcije i vrste receptora za koji se vezuju, steroidni hormoni su grupisani u pet klasa: androgeni, estrogeni, progestini, glukokortikoidi i mineralokortikoidi. Delujući na širok spektar tkiva, oni utiču na reproduktivnu fiziologiju, osmotsku ravnotežu i metabolizam, kao i mnoge druge esencijalne fiziološke procese [26,27]. Osim za fiziološki razvoj određenih tkiva i organa, steroidni hormoni mogu biti uključeni i u njihove patološke promene [28].

U daljem tekstu posebna pažnja je posvećena androgenim i estrogenim hormonima, kao i predstavljanju terapijskog potencijala derivata steroidnih hormona u lečenju hormonski zavisnih kancera, kao i nesteroidnih jedinjenja donekle strukturno sličnih estrogenima, fitoestrogena.

2.1.1. Struktura i fiziološki efekti steroidnih hormona

Steroidni hormoni su međusobno strukturno slična steroidna jedinjenja koja deluju kao signalni molekuli. Organizam ih sintetise u cilju regulacije određenih fizioloških i metaboličkih funkcija, do koje dolazi nakon njihovog vezivanja za specifične receptore eksprimirane u ciljnim ćelijama. Ovi fiziološki aktivni steroidi su derivati zajedničkog prekursora, holesterola, iz kog se dobijaju nizom enzimski katalizovanih reakcija u procesu steroidogeneze. Osnovu njihove strukture čini policiklični molekul sa četiri međusobno povezana ugljenična prstena (A, B, C- cikloheksanski i D-ciklopentanski), tzv. ciklopentanoperhidrofenantren ili steran (**Slika 1.a**) [27]. Zahvaljujući hidrofobnom karakteru steranskog jezgra, ovi bioaktivni molekuli mogu lako da difunduju kroz ćelijske membrane, dok u telesnim tečnostima nisu rastvorljivi, te za transport krvotokom zahtevaju prisustvo specifičnih transportnih proteina [29,30].

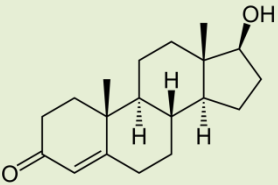
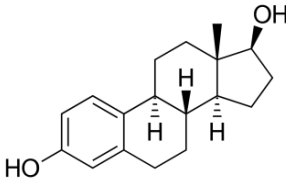
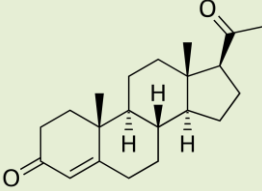
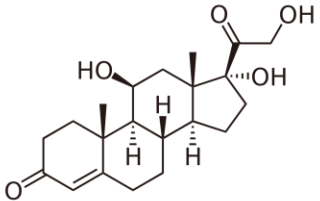
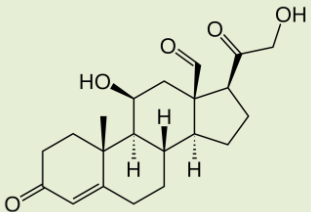
Numeracija C atoma steroidnih hormona je identična kao kod holesterola-počinje na A prstenu, nastavlja se na B, C i D (1-17), zatim se angularne metil grupe obeležavaju sa 18 i 19 i završava se na bočnom lancu (20-27) (**Slika 1.b**). Iako nisu planarni molekuli, steroidni hormoni se često zbog pojednostavljenja tako prikazuju, te je preporučljivo obeležiti orijentaciju atoma vodonika i supstituenata vezanih za steroidni skelet (alfa položaj-ispod ravni, beta položaj-iznad ravni). Ono po čemu se međusobno razlikuju klase steroidnih hormona su priroda i položaj supstituenata, kao i nezasićenost, što direktno utiče na fizičke i hemijske karakteristike molekula i doprinosi specifičnim interakcijama sa drugim biomolekulima, određujući njihovu biološku aktivnost i obezbeđujući specifičnost. Atom kiseonika na poziciji C-3 koji poseduju svi steroidni hormoni može biti u okviru hidroksilne ili keto grupe, dok ostali najčešći položaji supstituenata fiziološki aktivnih steroidnih hormona obuhvataju C-11 i C-21 kod kortikosteroida i C-17, gde se keto grupa javlja kod androstendiona i estrona, a hidroksilna kod testosterona i estradiola. Skraćivanje ili uklanjanje bočnog lanca holesterola dovodi do nastanka C21 jedinjenja pregnanske serije (progestini i kortikosteroidi), potpunim uklanjanjem nastaju C19 jedinjenja androstanske serije (androgeni), dok se aromatizacijom A prstena eliminiše C-19 metil grupa što rezultuje nastankom estranske serije jedinjenja (estrogeni) [31].



Slika 1. a) Ciklopentanoperhidrofenantren b) Numeracija C-atoma steroida na primeru holesterola.

Osim na osnovu strukture, podela steroidnih hormona je izvršena i na osnovu mesta sinteze na polne, koji se primarno sintetišu u polnim žlezdama (jajnicima i testisima), i kortikosteroidne, koji nastaju u kori nadbubrežnih žlezda. Dalja klasifikacija obuhvata pet grupa: androgeni, estrogeni, progestini, glukokortikoidi i mineralokortikoidi, čiji su predstavnici, primarna mesta biosinteze i važne funkcije koje imaju u organizmu prikazani u **Tabeli 1** [27,30,32].

Tabela 1. Pregled strukture i funkcije najaktivnijeg predstavnika svake klase steroidnih hormona i primarnih mesta njihove biosinteze.

Klasa	Mesto sinteze	Predstavnik	Struktura	Funkcija i efekti
Androgeni	Testisi Jajnici Nadbubrežne žlezde (<i>zona reticularis</i>)	Testosteron		Androgeni efekti (rast i razvoj reproduktivnih tkiva, primarne i sekundarne polne karakteristike muškaraca) Anabolički efekti (sinteza proteina)
Estrogeni	Granuloza ćelije jajnika Nadbubrežne žlezde	Estradiol		Rast i razvoj reproduktivnih tkiva, primarne i sekundarne polne karakteristike žena Regulacija menstrualnog ciklusa Neuroendokrini i kardiovaskularni efekti Regulacija metabolizma kostiju
Progestini	Corpus luteum Placenta Nadbubrežne žlezde	Progesteron		Regulacija menstrualnog ciklusa, trudnoće i embriogeneze
Glukokortikoidi	Nadbubrežne žlezde (<i>zona fasciculata</i>)	Kortizol		Povećanje nivoa šećera u krvi (stimulisanjem glukoneogeneze) Antiinflamatorno delovanje Regulacija metabolizma proteina, lipida i ugljenih hidrata
Mineralokortikoidi	Nadbubrežne žlezde (<i>zona glomerulosa</i>)	Aldosteron		Održavanje balansa soli i vode u organizmu Tubularna reapsorpcija Na ⁺ i sekrecija K ⁺ i H ⁺ Regulacija krvnog pritiska

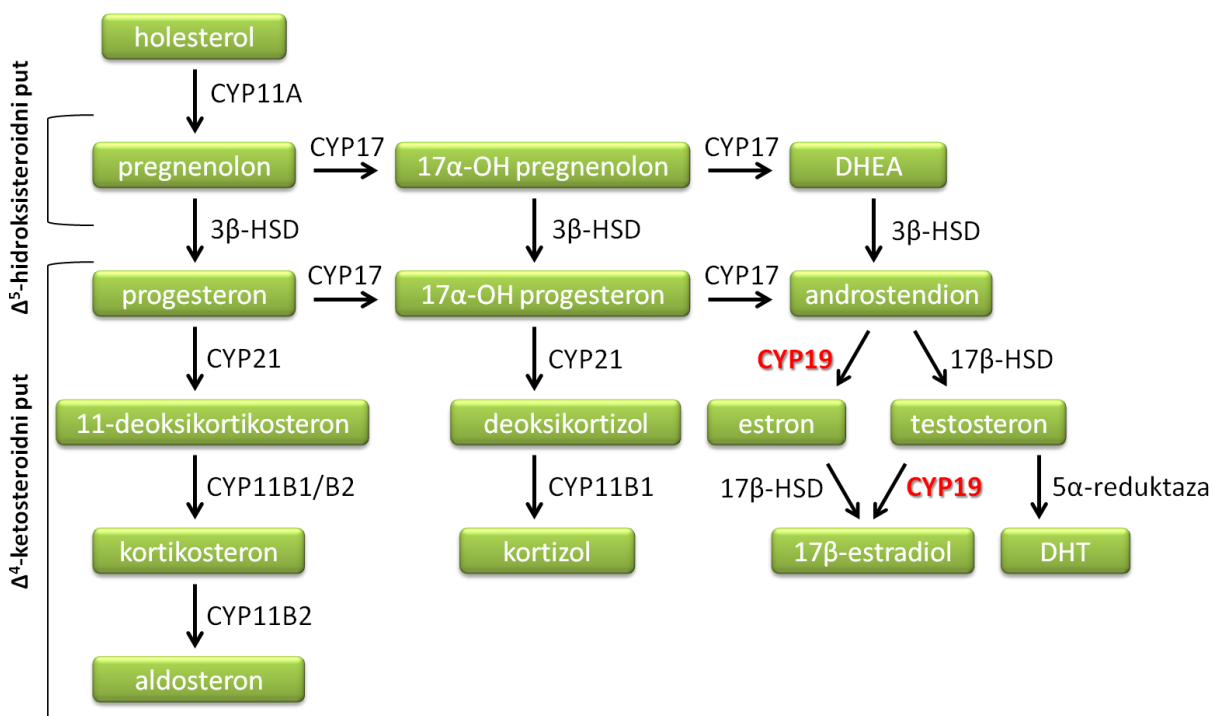
2.1.2. Biosinteza steroidnih hormona-steroidogeneza

Steroidogeneza predstavlja višefazni proces biosinteze steroidnih hormona iz holesterola (**Slika 2**) i dominantno se odvija u nadbubrežnim žlezdama, testisima i jajnicima [33]. Za biosintezu steroidnih hormona su odgovorni specifični steroidogeni enzimi iz familije citohrom P450 (CYP450) enzima i hidroksteroid dehidrogenaza (HSD) [34].

Prva enzimska reakcija steroidogeneze se odvija na unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani i predstavlja konverziju holesterola u pregnenolon skraćivanjem bočnog lanca delovanjem enzima holesterol dezmolaze (CYP11A). Sledeća u nizu je konverzija pregnenolona u progesteron delovanjem enzima 3β -hidroksteroid dehidrogenaze/ Δ^{5-4} izomeraze (3β -HSD), zastupljenog u mitohondrijama i glatkom endoplazmatičnom retikulumu ćelija steroidogenih tkiva. Biosintetski putevi steroidogeneze se od ovog mesta račvaju na Δ^5 -hidroksteroidni put, koji započinje pregnenonom (u najvećoj meri supstrat humanih enzima), i Δ^4 -ketosteroidni put, koji započinje progesteronom. Sledeći enzim uključen u biosintezu steroidnih hormona je 17α -hidroksilaza/ $17,20$ -lijaza (CYP17), sa dvojnomo aktivnošću, hidroksilaznom i lijaznom. Ovaj enzim prvo katalizuje hidroksilaciju pregnenolona i progesterona (C21 steroida) u C-17 položaju, a potom lijaznom aktivnošću konvertuje nastale 17α -hidroksilovane forme u C19 steroide, tj. androgene hormone dehidroepiandrosteron (DHEA), odnosno androstendion. U konverziji pregnenolona i ostalih supstrata Δ^5 -hidroksteroidnog puta u odgovarajuće Δ^4 -ketosteroide učestvuje enzim 3β -HSD [33].

Dalje reakcije steroidogeneze su specifične za pojedina tkiva. Biosinteza kortikosteroida započinje u kori nadbubrežnih žlezda dejstvom enzima 21α -hidroksilaze (CYP21), odgovornog za konverziju progesterona i 17α -hidroksiprogesterona do 11-deoksikortikosterona (mineralokortikoidni put) i 11-deoksikortizola (glukokortikoidni put), respektivno. Ovi molekuli su prekursori biološki aktivnih hormona aldosterona i kortizola, koji su produkti delovanja takođe tkivno specifičnih enzima iz kore nadbubrežnih žlezda, aldosteron sintetaze (CYP11B2, *zona glomerulosa*) i steroid 11β -hidroksilaze (CYP11B1, *zona fasciculata* i *zona reticularis*), respektivno. Kod muškaraca steroidogeneza se, osim u nadbubrežnim žlezdama, dominantno odvija u Lajdigovim ćelijama testisa, a regulisana je delovanjem luteinizirajućeg hormona (LH) adenohipofize. Konverziju neaktivnih 17-ketosteroida u aktivne 17β -hidroksi oblike katalizuje enzim 17β -hidroksteroid dehidrogenaza (17β -HSD), zastupljen u velikom broju izoformi, rasprostranjenih u različitim tkivima i različitog afiniteta prema supstratima. U završnoj fazi

biosintetskog puta polnih hormona kod muškaraca u prostati nastaje najpotentniji endogeni androgen, dihidrotestosteron, delovanjem enzima 5α -reduktaze. Kod žena sinteza polnih steroidnih hormona se dominantno odvija u teka ćelijama koje okružuju jajnu ćeliju, kao i u još nekim tipovima ćelija jajnika [33,35–37]. Na samom kraju biosinteze estrogenih hormona deluje enzim aromataza, čiji će ogroman značaj dalje biti detaljno opisan. Ukratko, ovaj CYP450 enzim (CYP19) jedini katalizuje konverziju C19 androgena, androstendiona i testosterona, u C18 estrogene hormone, estron i estradiol, praćenu aromatizacijom A prstena i predstavlja aktuelnu kliničku metu u terapiji kancera dojke i drugih reproduktivnih tkiva žene.



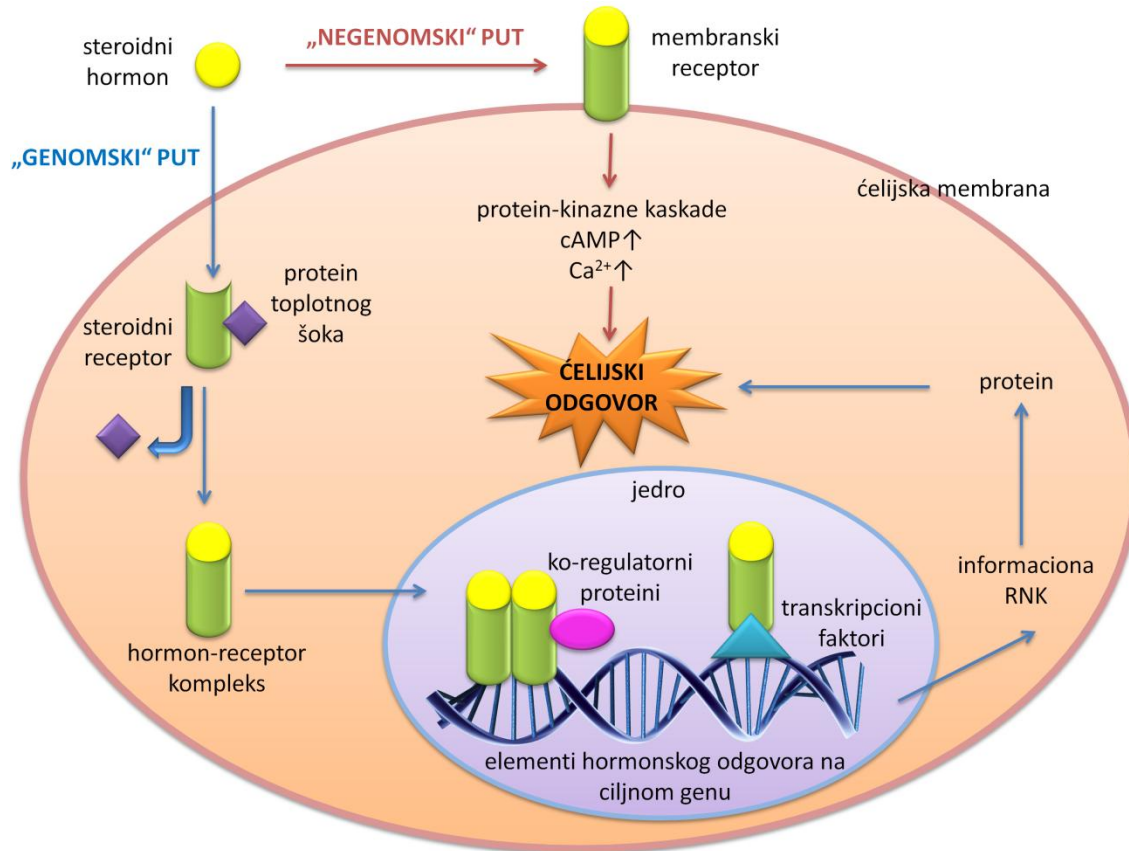
Slika 2. Biosinteza steroidnih hormona.

2.1.3. Mehanizam delovanja steroidnih hormona

Da bi se omogućilo razumevanje uloge steroidnih hormona u fiziološkim i patofiziološkim procesima neophodno je poznavanje mehanizama njihovog delovanja. Signalni putevi steroidnih hormona, iako vrlo kompleksni, a mnogi čak i nedovoljno istraženi, ovde su sažeto opisani. Steroidni hormoni ispoljavaju biološke efekte u ćelijama genomskim ili nengenomskim signalnim mehanizmima (Slika 3). Prema opšte prihvaćenoj teoriji i klasičnom mehanizmu delovanja, steroidni hormoni ulaze u ćeliju kroz membranu difuzijom ili preko transportera i vezuju se za steroidne receptore u citoplazmi ili jedru, koji deluju kao ligandom aktivirani transkripcioni faktori [38,39]. Naime, ovi receptori su u citoplazmi u neaktivnom

obliku u kompleksu sa različitim proteinima od kojih neki imaju ulogu šaperona, tzv. proteinima toplotnog šoka (*engl.* heat shock protein, Hsp) i do njihove disocijacije, a zatim i konformacione promene i aktiviranja receptora dolazi nakon vezivanja hormona. Sledeća faza obuhvata translokaciju nastalog hormon-receptor kompleksa u jedro, homo- ili heterodimerizaciju kompleksa i vezivanje dimera preko DNK vezujućeg domena za specifične motive prepoznavanja na molekulu DNK, tj. za elemente hormonskog odgovora (*engl.* hormone response elements, HRE) na promotorskom regionu ciljnog gena i koregulatorne proteine, što aktivira ili sprečava transkripcione procese. Osim direktnim vezivanjem za DNK, genska ekspresija može biti regulisana i indirektno, preko različitih transkripcionih faktora. Konačno, na osnovu sintetisane informacione RNK u endoplazmatičnom retikulumu se odvija sinteza proteina odgovornih za funkciju, rast i diferencijaciju ćelija [38–41]. Genomski put delovanja steroidnih hormona odlikuje duži vremenski period koji protekne od vezivanja steroidnog hormona za odgovarajući receptor do biološkog odgovora (sati, dani) i osetljivost na inhibitore transkripcije i sinteze proteina, kao i antagoniste unutarćelijskih steroidnih receptora [38,42,43].

Sa druge strane, mehanizmi delovanja steroidnih hormona negenomskim putem još uvek nisu dovoljno razjašnjeni, ali interesovanje za ovu temu je značajno poraslo i pretpostavlja se da je njihovo delovanje, u stvari, udružen proces više signalnih puteva [38]. Nasuprot genomskim efektima, negenomski se obično odvijaju u vrlo kratkom vremenskom periodu, pri čemu se ćelijski odgovor postiže za samo nekoliko sekundi ili minuta. S obzirom na to da ne uključuju procese vezivanja DNK, nisu osetljivi na inhibitore transkripcije i translacije [38,40]. U okviru ovog signalnog puta steroidni hormoni se vezuju za receptore koji se nalaze na ćelijskoj membrani i aktiviraju proteine kinaznih kaskada (protein kinaze aktivirane mitogenom (*engl.* mitogen-activated protein kinase, MAPK), fosfatidilinozitol-3-kinaze, protein kinazu C, itd) [38,41,43], učestvujući tako u posttranslacionim modifikacijama (najčešće fosforilaciji) i aktivaciji enzima odgovornih za određene ćelijske funkcije [44]. Drugi način negenomskog delovanja steroidnih hormona dešava se uz učešće sekundarnih glasnika (ciklični adenozin monofosfat (cAMP), Ca^{2+} i drugi) koji nastaju aktiviranjem membranskog G protein-kuplovanog receptora (*engl.* G protein-coupled receptor, GPCR) nakon vezivanja steroidnog hormona.



Slika 3. Mehanizmi delovanja steroidnih hormona-genomski i nengenomski efekti.

2.1.4. Patofiziološka uloga estrogenih i androgenih hormona u kanceru dojke i prostate

Reproduktivna tkiva i organi (prostata i testisi kod muškaraca, dojke, jajnici i endometrijum kod žena) su najčešća mesta nastanka hormonski zavisnih kancera. Kao što i samo ime govori, kod ovih vrsta kancera steroidni hormoni su pokretači proliferacije ćelija, pa su rast, razvoj i invazivnost kancera zavisni od njihove koncentracije i delovanja. Hormonski zavisni kanceri prostate i dojke su među najčešće dijagnostifikovanim malignitetima kod muškaraca, odnosno žena i, s obzirom na to da su vodeći uzroci smrti širom sveta, predstavljaju globalni zdravstveni problem [1]. Razumevanje hormonske osnove kancerogeneze je nužno za razvoj strategijskih pristupa u prevenciji i lečenju ovih bolesti. Poznato je da do pojave malignih fenotipova dolazi usled poremećaja u signalnim putevima steroidnih hormona, te narušavanja homeostaze [28]. Smanjenje produkcije i mogućnosti delovanja polnih hormona, ključnih za razvoj kancera dojke i prostate, su pokazali kliničku efikasnost, ali i pored toga napredovanje i recidiv kancera, kao i metastatski oblici rezistentni na hormonske terapije i dalje predstavljaju veliki problem [45,46].

Osim za normalno funkcionisanje reproduktivnih tkiva žena, kao što je, na primer proliferacija zdravih epitelijalnih ćelija dojke, dominantno zastupljeni oblik estrogenih hormona, estradiol, može biti odgovoran i za maligne promene [28]. Čak 70-80% svih kancera dojke je estrogen receptor pozitivno (ER+), odnosno njihove ćelije eksprimiraju ER za čiju aktivaciju su neophodni estrogeni hormoni [47]. Uočena je direktna povezanost između koncentracije i dužine izloženosti estrogenima i povećanog rizika od kancera dojke, pa su tako, na primer, rani ulazak u pubertet, kasna menopauza, broj trudnoća i nerađanje faktori usled kojih dolazi do povećavanja koncentracije ovih hormona i češćeg oboljevanja od estrogen-zavisnih bolesti [48]. Mehanizam kojim estrogeni utiču na razvoj kancera dojke još uvek nije potpuno razjašnjen, ali najšire prihvaćena teorija obuhvata proliferaciju epitelijalnih ćelija dojke stimulisanu estrogenima uz nastanak mutacija tokom procesa replikacije i umnožavanje takvih ćelija, što dovodi do nastanka kancera [49]. Ostali mehanizmi obuhvataju promenu ekspresije gena odgovornih za ćelijski ciklus i apoptozu epitelijalnih ćelija dojke dejstvom estrogena i time narušavanje ravnoteže ova dva procesa [28]; formiranje 4- i 6-hidroksi metabolita estrogena koji se u redoks reakcijama konvertuju u kateholestrogene i ispoljavaju genotoksične efekte [50] ili sintezu lokalnih faktora rasta posredstvom estradiola [51]. Takođe, estrogeni mogu i na druge načine biti uključeni u razvoj kancera dojke stimulisanjem angiogeneze ili delovanjem na imunski sistem [5]. Osim nivoa endogenih estrogenih hormona koji je primarni faktor rizika, na povećan rizik za nastanak i razvoj ove bolesti utiču i način života, životna okolina, starosna dob, kao i mnogi drugi faktori [15,28,46]. Većinu obolelih pacijenata čine žene u postmenopauzi [15], kod kojih je intratumorski nivo estradiola, estrona i estron sulfata čak 10-50 puta viši u odnosu na onaj u cirkulaciji, najčešće usled povećane enzimске aktivnosti aromataze u samom tumoru i njegovoj blizini ili usled preuzimanja estrogena iz cirkulacije [6,51,52], što još uvek nije poznato.

Androgeni hormoni imaju centralnu ulogu u rastu, razvoju i pravilnom funkcionisanju prostate, ali i u patogenezi. Rizik od kancera prostate se povećava sa godinama, više nego kod bilo koje druge vrste kancera. Nasuprot zdravom, kod tumorskog tkiva prostate ravnoteža između proliferacije i ćelijske smrti je narušena u korist prve, što rezultuje prvo hiperplazijom, a zatim i malignim promenama [28,53], međutim, precizni mehanizmi razvoja kancera prostate su veoma kompleksni i još uvek nedovoljno istraženi [54]. Pretpostavlja se da androgeni imaju glavnu ulogu u kancerogenezi, s obzirom na to da je reč o androgen-zavisnom tkivu [55]. Sinteza testosterona se odvija u Lajdigovim ćelijama testisa, a delovanjem enzima 5 α -reduktaze u

prostati nastaje nekoliko puta potentniji dihidrotestosteron, pa je povećana ekspresija ovog enzima, tačnije izoforme I, u tumorskom tkivu prostate logičan sled [45,56]. U prilog tome da su ćelije kancera prostate androgen-zavisne govore činjenice da većina eksprimira AR [45], prolaze kroz apoptozu nakon uklanjanja dostupnih androgena, kao i da su androgeni neophodni za rast ksenografta u *in vivo* ispitivanjima [56]. Povećan rizik od nastanka ove bolesti se osim sa povišenim nivoom androgena dovodi u vezu i sa polimorfizmom gena uključenih u signalne puteve ovih hormona [54], narušavanjem aktivnosti AR abnormalnostima u ekspresiji i funkciji ovih receptora i njihovih koregulatornih proteina [28] i onkogenim genetskim promenama. Interesantno je da i estrogeni mogu biti uključeni u kancerogenezu prostate svojim genotoksičnim mehanizmima [55]. Uprkos tome što mnogi naučni podaci podržavaju „androgenu hipotezu“ o nastanku kancera prostate, ima i onih koji negiraju njihov uticaj na razvoj bolesti [56], kao na primer činjenica da starenjem nivo androgena, kao najvećeg faktora rizika, u stvari opada [57].

2.1.5. Mogućnosti lečenja hormon-zavisnih kancera

S obzirom na to da kanceri reproduktivnih tkiva predstavljaju zdravstveni problem globalnih razmera, svakodnevno se ulažu veliki naponi u cilju otkrivanja što efikasnije terapijske strategije [1]. Trenutno su dostupna dva osnovna načina lečenja. Metode lokalne terapije podrazumevaju uklanjanje tkiva ili organa zahvaćenog kancerom hirurškim putem ili njegovo uništavanje primenom jonizujućeg zračenja, dok metode sistemskog lečenja obuhvataju primenu specifičnih lekova koji krvotokom dospevaju do ciljnog tkiva (citostatici, hormonska, ciljana i imunoterapija) [2]. Hormonska ili endokrina terapija ima za cilj da deluje na abnormalne hormonske signalne puteve koji prethode nastanku kancera i najčešće je terapija od izbora kod hormonski zavisnih kancera, gde može biti primenjivana primarno ili u kombinaciji sa drugim metodama lečenja [58]. Snižavanje koncentracije ili promena mogućnosti delovanja steroidnih hormona može zaustaviti ili smanjiti proliferaciju hormonski zavisnih ćelija kancera, tako da su najefikasniji terapijski pristupi u ovom polju selektivna inhibicija određenih enzima steroidogeneze, onemogućavanje sinteze ili samih steroidnih hormona ili hormona koji kontrolišu njihovu produkciju (gonadotropin-oslobađajući hormoni (*engl.* gonadotropin-releasing hormone, GnRH) i gonadotropini), kao i onemogućavanje vezivanja steroidnih hormona za specifične receptore. Tradicionalna hormonska terapija je podrazumevala hirurško odstranjivanje ili uništavanje hormonski zavisnog organa primenom zračenja uz mnogo pratećih neželjenih

efekata, dok su novije farmakološke metode manje invazivne i štetne [3,45]. Takođe, veliki izazov za istraživače predstavlja razvijanje otpornosti pojedinih vrsta kancera na tretman hormonskom terapijom, kao na primer fatalan kancer prostate rezistentan na kastraciju (*engl.* castrate resistant prostate cancer, CRPC) [57].

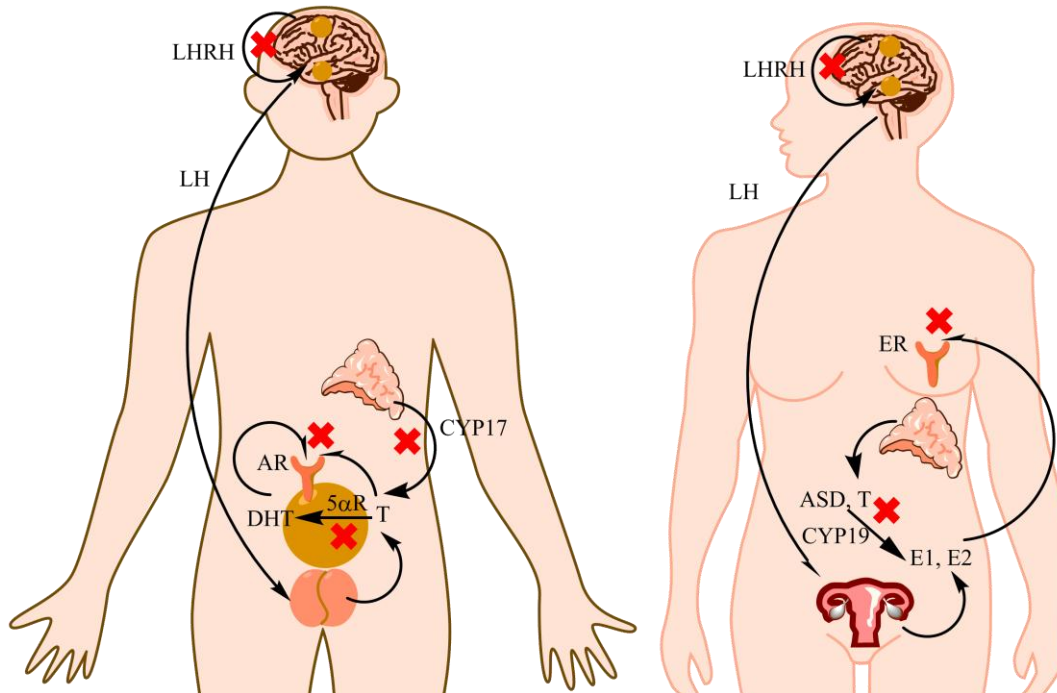
2.1.5.1. Hormonska terapija kancera dojke i prostate

Produkcija estrogena je pod stalnom kontrolom gonadotropina hipofize, čija sekrecija je regulisana gonadotropin-oslobađajućim hormonima iz hipotalamusa, koji su u medicinskoj literaturi poznati i kao luteinizirajući hormon-oslobađajući hormoni (*engl.* luteinizing hormone-releasing hormone, LHRH). Saznanje da hipofiza produženim izlaganjem LHRH postaje neosetljiva, čime se posledično prekida i sinteza estrogena u jajnicima, poslužilo je kao osnova za razvoj agonista LHRH (Goserelin, Leuprolid) u terapiji kancera dojke. Produženim izlaganjem ovim agonistima nivo cirkulišućih gonadotropina, a time i estrogena, opada do nivoa sličnih onima u menopauzi, odakle termin „medicinska ovariectomija“. Na ovaj način se postižu slični efekti kao i hirurškim uklanjanjem jajnika ili zračenjem, međutim glavna prednost je što je proces povratan, te je moguće obnoviti funkciju žlezde nakon prestanka tretmana [3,47].

Razvoj jedinjenja koja blokiraju efekte estrogena na nivou ER, tj. antiestrogena je doneo ogroman napredak u lečenju i prevenciji ER+ kancera dojke, pri čemu je „zlatni standard“ u poslednjih više od tri decenije tamoksifen [45,59]. Tamoksifen je selektivni modulator estrogenih receptora (*engl.* selective estrogen receptor modulator, SERM), jer osim antagonističkih može ispoljavati i tkivno specifične agonističke efekte (uterus, kosti, endometrijum), što može imati pozitivne efekte kod osteoporoze, ali i povećati rizik od nastanka kancera endometrijuma [45]. Osim za lečenje ER+ kancera dojke u ranoj ili uznapređaloj fazi kod žena, tamoksifen se koristi i u lečenju muškaraca obolelih od iste bolesti, zatim u cilju prevencije kod žena izloženih povećanom riziku ili kao adjuvantna terapija, odnosno terapija koja se primenjuje posle primarne terapije sa ciljem da se povećaju šanse za izlečenje [47]. Selektivni agensi za degradaciju estrogenih receptora (*engl.* selective estrogen receptor degrader, SERD) se razlikuju po mehanizmu delovanja od SERM po tome što vezivanjem za ER narušavaju njihovu stabilnost i dovode do degradacije. Prvi odobren lek iz ove grupe je fulvestrant [45]. Treći pristup u blokiranju stimulatornih efekata estrogena na rast malignog tumora dojke zasniva se na blokiranju njihove sinteze u perifernim tkivima, upotrebom inhibitora aromataze i detaljnije je opisan u potpoglavlju 3.3.3.

U cilju izbegavanja invazivne orhiektomije ili prostatektomije, potpuno ista strategija upotrebe agonista LHRH se primenjuje i kod lečenja kancera prostate, gde se produženim izlaganjem ovim agonistima izaziva stalna aktivacija što rezultuje smanjenom osetljivošću gonadotropnih receptora negativnom povratnom spregom, što indirektno za posledicu ima prestanak sinteze androgena u testisima [45,47]. Sa druge strane, antagonisti LHRH blokiraju funkciju oslobađajućih hormona iz hipotalamusa, a time direktno i sintezu androgena [60]. Kako bi se u lečenju pacijenata obolelih od kancera prostate agonistima LHRH prevazišli nedostaci u smislu prvobitnog naglog skoka u produkciji gonadotropina i testosterona, pa time i mnogi neželjeni efekti, često se koristi kombinovana terapija sa antiandrogenima, koja je pokazala dobre rezultate [58,61]. Antiandrogeni ometaju vezivanje prirodnih liganada za AR „takmičeći se“ sa njima za vezujuće mesto, te na taj način sprečavajući njihovu prekomernu biološku aktivnost, koja se javlja kod kancera prostate [47]. S obzirom na to da testosteron i dihidrotestosteron imaju visok afinitet vezivanja prema ovim receptorima, prve generacije antiandrogenih agenasa (flutamid i bikalutamid) nisu pokazale dovoljnu potentnost, pa su razvijani novi lekovi poput enzalutamida sa povećanim antiandrogenim potencijalom [45]. Interesantno je i da estrogeni mogu inaktivirati androgene, i to smanjenjem sekrecije LHRH ili uticajem na funkciju Lajdigovih ćelija [58].

Pored suzbijanja sekrecije gonadotropina i blokiranja receptora antiandrogenima, postoji i treći strategijski pristup lečenju kancera prostate, a to je inhibicija steroidogenih enzima koji učestvuju u sintezi androgena ili njihovoj konverziji u biološki aktivnije forme. Inhibicijom aktivnosti CYP17 abirateronom u velikoj meri se smanjuje nivo cirkulišućih C19 steroida, dok se inhibicijom 5 α -reduktaze finasteridom ili dutasteridom smanjuje specifična konverzija testosterona u pet puta potentniji dihidrotestosteron u prostati [45,61]. Glavne strategije hormonske terapije kod kancera prostate i dojke su prikazane na **Slici 4**.



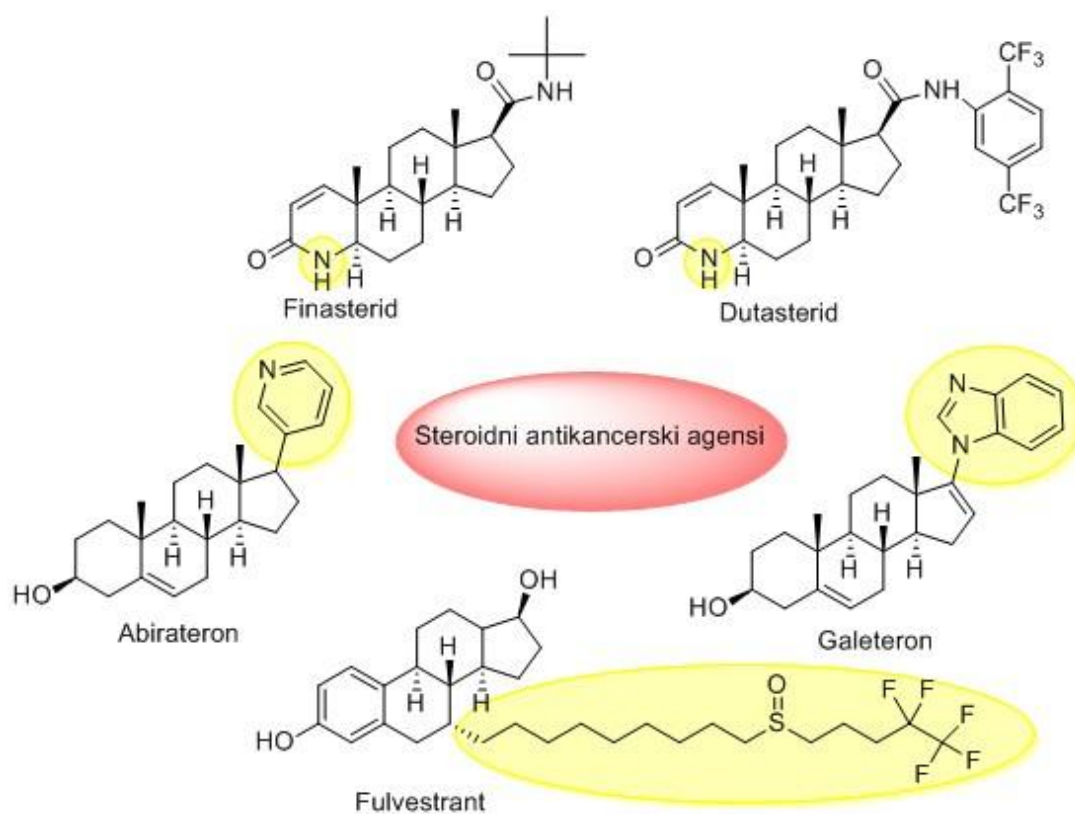
Slika 4. Strategije hormonske terapije kod kancera prostate i dojke.

2.1.6. Derivati steroidnih hormona kao antikancerski agensi

Imajući u vidu strategije hormonske terapije u lečenju kancera dojke i prostate i njihova ograničenja, ne iznenađuje sve veće interesovanje medicinskih hemičara i biohemičara za hemiju steroidnih jedinjenja. Veliki napori ne prestaju da se ulažu u cilju otkrivanja novih antikancerskih agenasa sa povećanom selektivnošću i smanjenom toksičnošću prema zdravim ćelijama [62]. Steroidna jedinjenja su oduvek privlačila pažnju naučnika, s obzirom na to da imaju ulogu u regulaciji mnogih bioloških procesa, što ih čini dobrim kandidatima u lečenju raznih bolesti, uključujući različite vrste kancera [63]. Velika prednost je i njihova hidrofobna priroda koja im omogućava lakši ulazak u ćeliju, nakon čega dolazi do interakcije sa odgovarajućim receptorima [62]. Priroda i položaj različitih funkcionalnih grupa vezanih za kruto steroidno jezgro doprinosi raznovrsnoj biološkoj funkciji steroidnih hormona [63], tako da male modifikacije u strukturi dovode do značajnih razlika u njihovoj biološkoj aktivnosti [62]. Neki od primera steroidnih derivata sa antikancerskim delovanjem su prikazani na **Slici 5**. Na primer, strukturnom modifikacijom estradiola u C-7 položaju uvođenjem alkilsulfinil niza dobijen je fulvestrant, steroidni analog sa antiestrogenom aktivnošću [45]. Modifikacije polarnih funkcionalnih grupa na C-3 i C-17 položajima steroidnih hromona u velikoj meri menjaju njihov afinitet vezivanja za steroidne receptore [64], dok uvođenje hidrofobnih supstituenata dodatno olakšava prolazak kroz

ćelijske membrane i povećava biološku efikasnost steroidnih derivata [62]. Najčešće modifikacije steroida vrše se na A i/ili D prstenu [23,64].

Sinteza heterosteroida, odnosno strukturna modifikacija steroidnih hormona uvođenjem heteroatoma (O, N, S) ili heterocikličnog prstena (pirazol, piridin, pirimidin, piran i drugi) u cilju dobijanja steroidnih derivata sa antikancerskim osobinama dobija sve veći značaj [23,62,65]. Heteroatom može biti ugrađen u steroidno jezgro (nuklearni heterosteroidi) ili može biti deo prstena spojenog sa steroidnim skeletom, vezanog supstituenta ili bočnog niza (ekstranuklearni heterosteroidi) [66]. Uvođenje supstituenata sa atomom azota u vidu amino, nitrilne ili neke druge funkcije u D prsten heterosteroida estranske i androstanske serije doprinosi antiproliferativnoj aktivnosti ovih jedinjenja [62,67]. U heterosteroide spadaju i poznati inhibitori aromataze, eksemestan i formestan, kao i inhibitori 5α -reduktaze, azasteroidi finasterid i dutasterid, kod kojih su ugljenikovi atomi u steroidnom skeletu na položaju 4 zamenjeni azotom [66].



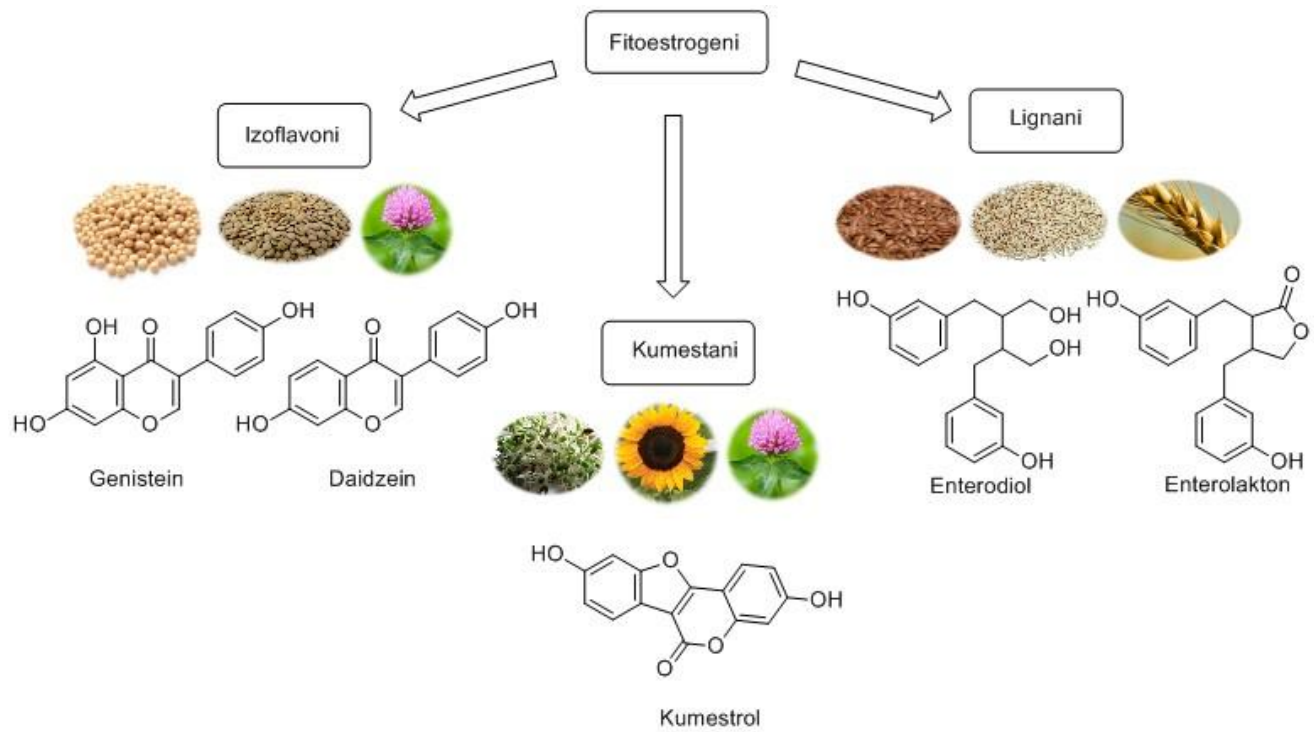
Slika 5. Steroidni derivati kao antikancerski agensi. Žutom bojom obeležene su ključne modifikacije u odnosu na endogene steroide.

Osim jednostavnih supstituenata, uvođenje heterocikličnih sistema vezanih za ili kondenzovanih sa steroidnim skeletom takođe utiče na porast antikancerskog potencijala steroidnog derivata [64]. Heterociklični sistemi poseduju donore i akceptore vodoničnih veza, što ih čini idealnim za formiranje međumolekulskih vodoničnih veza sa ciljnim biomolekulima i poboljšava vezivanje čitavog steroidnog molekula za metu, a može uticati i na njegovu rastvorljivost [62]. Ovi steroidi bi, zapravo, kao hibridna jedinjenja, koja obuhvataju dva bioaktivna molekula u jednom, trebalo da ispoljavaju veću biološku aktivnost u odnosu na molekule od kojih potiču, što je posebno značajno kod terapije kompleksnih bolesti kao što je kancer, gde lekovi sa jednom funkcijom često nisu dovoljno efikasni [63,68]. Iz ove grupe izdvajaju se CYP17 inhibitori abirateron, koji je steroidni egzo-heterocikl i galeteron koji osim inhibicije CYP17 deluje i kao antagonist AR [64,69]. Među heterosteroidima koji obećavaju su i 17-pikolil i 17-pikolinilidenski androstanski derivati koji su pokazali značajnu antiproliferativnu aktivnost prema ćelijskim linijama kancera dojke, prostate i debelog creva [70]. U *in vitro* testu za određivanje 17α -hidroksilazne i $C_{17,20}$ -lijazne aktivnosti CYP17 enzima derivati sa 17-pikolinilidenskim supstituentom su pokazali značajnu inhibiciju, jaču u odnosu na 17-pikolil analoge [71], a dokingom je objašnjena specifična interakcija 17-pikolinilidenskih derivata sa CYP17 enzimom, sličnog afiniteta i geometrije kao za abirateron [69,72]. Dodatno, pojedini steroidni derivati mogu ispoljavati antikancersku aktivnost i učestvovati u hormonski nezavisnim signalnim putevima, inhibicijom angiogeneze ili aktivacijom apoptotskih puteva, što ih čini interesantnim kandidatima u lečenju hormonski nezavisnih kancera [64].

2.1.7. Terapeutska svojstva fitoestrogena

Fitoestrogeni su fenolna jedinjenja poreklom iz biljaka, koja deluju kao estrogeni (nesteroidni estrogeni). Klasifikovani su u tri grupe: izoflavoni, lignani i kumestani (**Slika 6**) [73]. Izoflavoni (genistein, daidzein, formononetin i biohanin A) su najviše zastupljeni u soji, detelini, klicama lucerke, sočivu, pasulju i leblebijama i najbolje su okarakterisani. Lignani su najzastupljeniji u prirodi, i to u lanenim semenkama, žitaricama (raž, ovas, pšenica), sočivu, voću i povrću. Njihovi aktivni metaboliti sa estrogenom aktivnošću, enterolakton i enterodiol, nastaju metaboličkim procesima u organizmu. Izoflavoni i lignani se u biljkama nalaze uglavnom u obliku biološki neaktivnih glikozida (genistin, daidzin), smeštenih u vakuolama, i tek se hidrolizom glikozidnih veza tokom varenja prevode u aktivne oblike. Kumestani

(kumestrol) su najmanje rasprostranjena klasa fitoestrogena u prirodi i do sada su pronađeni u klicama lucerke, detelini i suncokretu [73–75].



Slika 6. Klasifikacija fitoestrogena i dominantni izvori u prirodi.

Ova jedinjenja su strukturno i funkcionalno veoma slična estrogenima sisara zahvaljujući sličnosti u molekularnoj masi, postojanju fenolnog prstena i približno istom rastojanju fenolnih atoma kiseonika kao kod OH grupa estradiola. Fenolni prsten ima centralnu ulogu u vezivanju fitoestrogena za ER, pri čemu dolazi do agonističkog ili antagonističkog efekta [74]. Njihova potentnost je 10^2 do 10^5 puta manja od estrogena [75], ali, bez obzira na to, vezuju se za obe izoforme ER, pri čemu za ER β sa većim afinitetom [74].

Usled opadanja nivoa estrogena tokom menopauze, žene se suočavaju sa vrlo neprijatnim simptomima (talasi vrućine, noćno znojenje, poremećaji sna) koji narušavaju kvalitet njihovog života. Hormonska supstitucionna terapija (*engl.* hormone replacement therapy, HRT) uspešno ublažava ove simptome, međutim nosi sa sobom i ozbiljne zdravstvene rizike od moždanog udara, venskog tromboembolizma i kancera dojke, pa joj je primena ograničena. Činjenica da žene u Aziji, čija ishrana obiluje fitoestrogenima, mnogo ređe prolaze kroz neprijatne simptome menopauze, usmerila je pažnju naučne javnosti na fitoestrogene kao potencijalnu prirodnu alternativu HRT [76]. Prosečan dnevni unos soje žena u Aziji je čak 20-150 puta veći od proseka

u Americi [74]. Menopauzu, kao stanje sa smanjenom koncentracijom estrogena, prati i osteoporoza, odnosno gubitak gustine kostiju i povećan rizik od preloma. Kako estrogeni učestvuju u normalnom metabolizmu kostiju, pretpostavlja se da bi njihovi nesteroidni analozi, strukture slične fitoestrogenima, uz svoje blagotvorne efekte mogli biti alternativa HRT i u tretmanu osteoporoze [77]. Ipriflavon je lek sintetisan na osnovu strukture izoflavona daidzeina, koji ne samo da usporava gubitak koštane mase, nego čak stimuliše i njeno povećanje [75].

Epidemiološke studije su ukazale i na smanjenu stopu oboljevanja od kancera dojke i endometrijuma, kao i kardiovaskularnih bolesti u Aziji, što ponovo ukazuje na zaštitnu ulogu fitoestrogena [73,75]. Pretpostavlja se da oni ispoljavaju antikancerski efekat na nekoliko načina: jedan obuhvata vezivanje za ER i antagonistički efekat, drugi inhibiciju sinteze endogenih estrogena antiaromataznom aktivnošću, a moguće je i ometanje transporta estrogena u organizmu delovanjem fitoestrogena na transportne proteine [73]. U početku se najviše pažnje obraćalo na njihove hormonski posredovane mehanizme delovanja, međutim kasnije su predloženi i nehormonski. Naime, nehormonski mehanizmi delovanja kojima ovi molekuli mogu ispoljiti antikancersku aktivnost obuhvataju: inhibiciju DNK topoizomeraze, sprečavanje angiogeneze, aktiviranje programirane ćelijske smrti i antioksidativnu aktivnost [75]. S obzirom na to da fitoestrogeni imaju strukturne sličnosti sa estrogenima i da se vezuju za njihove receptore, smatra se da mogu povećati rizik od kancera dojke, slično kao i sami estrogeni.

Na pitanje da li fitoestrogeni imaju samo dobre ili i loše efekte na zdravlje žene još uvek nije dobijen precizan odgovor, s obzirom na to da on može zavisiti od mnogo faktora, pa čak i od zastupljenosti specifičnih mikroorganizama u digestivnom traktu ispitanika [77]. Osim toga, i dalje je prisutno mnogo neslaganja između eksperimentalnih i kliničkih ispitivanja, verovatno zbog razlika u dizajnu eksperimenta, populacijama koje se ispituju, stabilnosti fitoestrogena nakon unošenja u organizam i nedostatku odgovarajućih kontrola poput kontrole konzumiranja fitoestrogena iz drugih izvora [73,76].

2.2. Steroidni receptori

Opšte je poznato da steroidni hormoni ispoljavaju svoje delovanje vezivanjem za steroidne receptore koji pripadaju familiji nuklearnih receptora i mogu biti smešteni u citosolu, ređe u jedru, kao i na membrani ciljnih ćelija. Ova familija broji više od 100 različitih vrsta receptora, među kojima estrogeni, androgeni, glukokortikoidni, mineralokortikoidni i progesteronski imaju slične strukturne i funkcionalne karakteristike, formirajući potfamiliju

steroidnih receptora [78,79]. Karakteristična strukturna organizacija steroidnih receptora obuhvata nekoliko funkcionalnih domena sa različitim stepenom očuvanosti. Delujući kao ligandom aktivirani transkripcioni faktori, ovi receptori prenose signal do ciljnih gena na čiju ekspresiju utiču, te time regulišu određene fiziološke procese [28,79]. Usled narušavanja homeostaze njihovog delovanja može doći do kancerogeneze, što ih čini idealnom metom u terapiji kancera dojke, prostate i jajnika i otvara vrata razvoju raznih modulatora njihove aktivnosti [28]. Posebna pažnja usmerena je i na razvoj testova za ispitivanje specifičnih interakcija između steroidnih receptora i malih molekula [80].

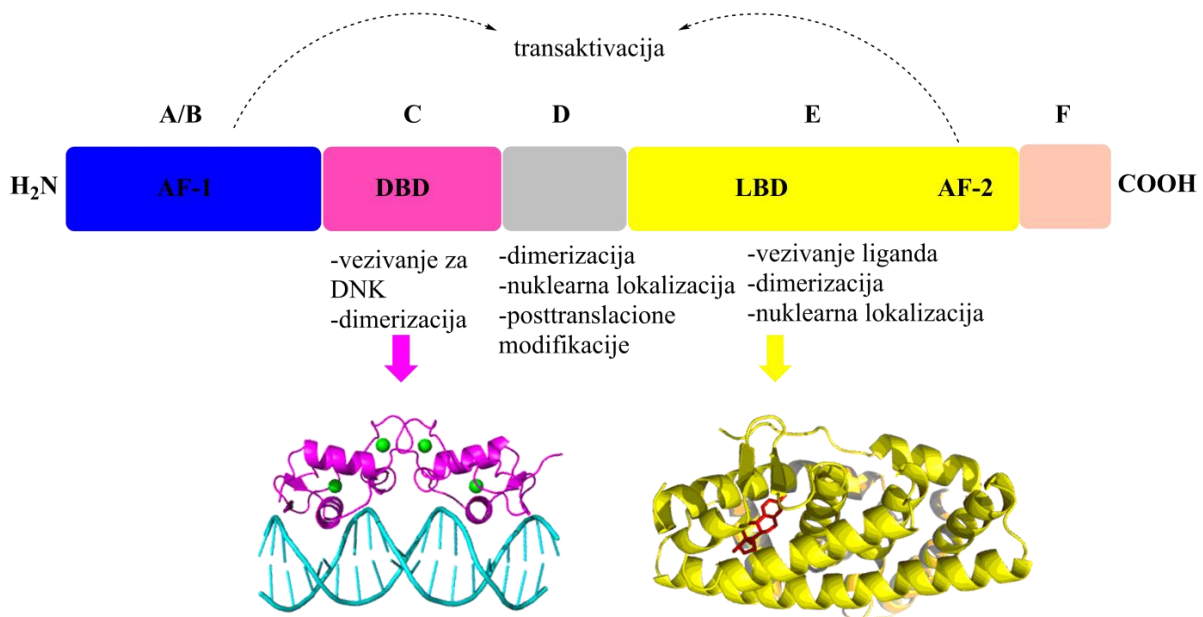
Zbog velikog značaja receptora u hormonskom signalingu, neophodno je poznavanje njihove strukture i funkcije. S obzirom na to da su androgeni i estrogenski receptori u fokusu naših istraživanja, ukratko će biti opisane i odabrane metode za ispitivanje njihovih interakcija sa ligandima, navedene njihove prednosti i nedostaci, sa naglaskom na fluorescentni ćelijski biosenzor u kvascu i *in silico* metode.

2.2.1. Struktura i funkcija steroidnih receptora

Na osnovu homologije aminokiselinske sekvence i specifičnosti interakcije sa DNK, steroidni receptori pripadaju potfamiliji III nuklearnih receptora, koja obuhvata: estrogene receptore α i β , receptore srodne estrogenim (*engl.* estrogen related receptors, ERR) α , β i γ , čiji su ligandi nepoznati, glukokortikoidne, mineralokortikoidne, progesteronske i androgene receptore [79]. Steroidni receptori imaju esencijalnu ulogu u prenosu signala steroidnih hormona i kontroli reproduktivnog, ali i imunskog, kardiovaskularnog i nervnog sistema [29]. Njihov fiziološki efekat ispoljava se u tri faze: vezivanje hormona, interakcija sa DNK i aktivacija ciljnih gena [81]. Mehanizam delovanja je naveden ranije: steroidni receptori su u odsustvu liganda u neaktivnom stanju u kompleksu sa proteinima toplotnog šoka i drugim šaperonima koji disosuju nakon konformacionih promena receptora uzrokovanih vezivanjem liganda, zatim se kompleks receptor-hormon vezuje za specifične sekvence DNK i partnerske koregulatorne proteine u jedru i započinje transkripciju [28]. Kako se pod kontrolom pojedinačnog steroidnog receptora nalazi više gena, ligandi selektivni prema specifičnom genu predstavljaju veliki izazov za istraživače [82].

Poznavanje strukture steroidnih receptora je osnovni preduslov za potpuno razumevanje njihove funkcije [4] i veliki napredak u ovom polju je ostvaren od momenta kada je klonirana prva komplementarna DNK (cDNK) steroidnih receptora, pre više decenija [79]. Međutim, zbog

poteškoća sa kristalizacijom ovih proteina, njihova kompletna trodimenzionalna struktura još uvek nije određena, ali je poznata struktura dva pojedinačna funkcionalna domena [82]. Steroidni receptori su modularni proteini sačinjeni od nekoliko strukturnih i funkcionalnih jedinica, domena, koji se razlikuju po veličini i položaju među različitim vrstama receptora: N-terminalni domen (NTD ili A/B domen), DNK vezujući domen (*engl.* DNA binding domain, DBD ili C domen), region šarke (*engl.* hinge region) (D domen), ligand vezujući domen (*engl.* ligand binding domain, LBD ili E domen) i, kod nekih receptora, na samom kraju C-terminusa F domen (**Slika 7**) [79]. U slučaju međusobnog premeštanja ovih regiona mogu nastati molekuli sa hibridnim funkcijama [28].



Slika 7. Strukturni domeni steroidnih receptora i njihova funkcija: roze bojom prikazan je DBD domen ER α (PDB: 1HCQ) vezan za DNK (plavo), a žutom LBD domen ER α (PDB: 1ERE) sa vezanim estradiolom (crveno).

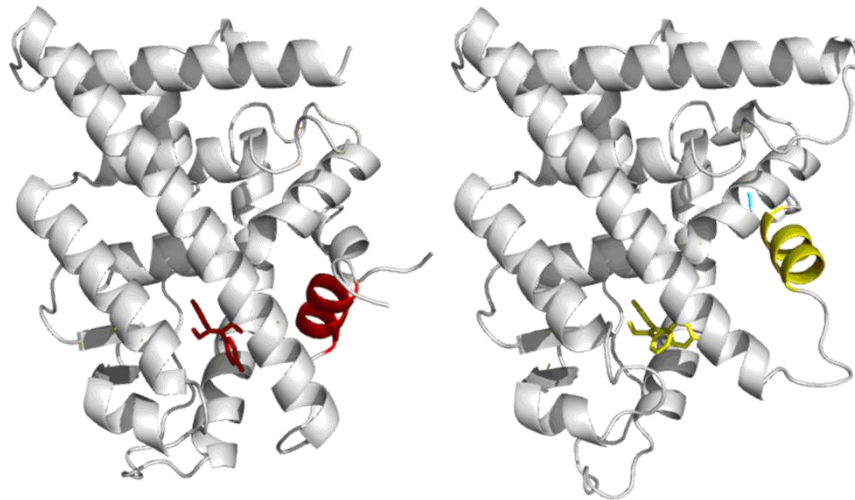
NTD, je visoko varijabilni region o čijoj strukturi se ne zna mnogo [79,83]. Sadrži transaktivacioni domen AF1 (*engl.* activation function) koji je ligand-nezavisan i može na konstitutivan način aktivirati transkripcionu aktivnost steroidnog receptora u odsustvu LBD [84]. Identifikovan je veliki broj koaktivatora, korepresora i drugih koregulatornih proteina koji se vezuju za AF1. Pored toga, NTD je mesto unutar kog dolazi do posttranslacionih modifikacija, poput fosforilacije, koja predstavlja važan regulatorni mehanizam za funkciju steroidnih receptora [79].

Najviše od svih je evoluciono očuvan domen DBD, koji je odgovoran za prepoznavanje i vezivanje specifičnih palindromskih HRE sekvenci, u okviru promotora ciljnog gena [84]. Strukturna organizacija ovog domena obuhvata dva prepoznatljiva motiva cinkovog prsta (*engl.* zinc finger motif), pri čemu svaki sadrži po četiri očuvana ostatka cisteina koji se tetraedarski koordiniraju sa atomima cinka [85], ali ne formiraju trodimenzionalne strukture klasičnih *zinc finger* proteina [28]. Ovaj domen ima dve funkcionalno podeljene jedinice: N-terminalni poddomen, odgovoran za specifično vezivanje DNK sekvenci, i C-terminalni poddomen, manje specifičan u istoj ulozi i uključen u dimerizaciju receptora [85]. Isprva se mislilo da se svi članovi porodice steroidnih receptora vezuju kao homodimeri, međutim kasnije je pokazano da neki od njih mogu formirati ne samo heterodimere, nego mogu da deluju i kao funkcionalni monomeri [83].

Region šarke obuhvata sekvencu od 40-60 aminokiselina koja povezuje DBD i LBD [79]. To je fleksibilan strukturno neuređen region u okviru kog se nalaze: C terminalni produžetak (*engl.* C terminal extension, CTE) DBD-a koji učestvuje u dimerizaciji, mesta posttranslacionih modifikacija i nuklearni lokalizacioni signal (NLS), zadužen za transport u jedro [79,83]. Pasivni transport kroz jedarne pore je moguć za komplekse veličine 20-40 kDa, dok je steroidnim receptorima zbog njihove veličine za transport neophodna pomoć transportnih proteina, karioferina, koji prepoznaju NLS sekvencu [60].

Zbog svoje sposobnosti da aktivira receptor vezivanjem liganada i brojnih koregulatornih proteina, LBD predstavlja aktuelnu metu u procesu otkrivanja lekova [82]. LBD je evoluciono manje očuvan domen od DBD-a, a sličnost u sekvenci uočena je među receptorima koji imaju strukturno slične ligande, npr. steroide [85]. Važna funkcija ovog domena, osim vezivanja liganda i šaperona, je i učešće u homo- i/ili heterodimerizaciji receptora [28]. Selektivnost zavisi od veličine „džepa“ za vezivanje liganda i specifičnih interakcija koje se ostvaruju između aminokiselina ovog domena i A i D prstena steroidnog hormona [84]. LBD se sastoji od 12 α -heliksa i različitog broja β -ploča savijenih u globularnu strukturu. Heliksi su organizovani u takozvani troslojni antiparalelni heliksni „sendvič“ i formiraju centralni hidrofobni „džep“ za vezivanje liganda, čija se veličina može razlikovati od receptora do receptora [82,83]. Nakon što hormon uđe u ovu šupljinu, heliks H12 deluje kao „poklopac“, zatvarajući je i odvajajući od spoljašnje sredine [83]. Premeštanje ovog C-terminalnog heliksa nakon vezivanja agonista iz otvorene u zatvorenu poziciju omogućava vezivanje koaktivatora za ovaj domen i aktivaciju

transkripcije (**Slika 8. levo**) [4,83]. U okviru LBD-a se nalazi i drugi mali ali važan transaktivacioni domen, AF2, koji, za razliku od AF1, deluje ligand-zavisno i u većini slučajeva aktivacioni potencijal steroidnog receptora se u potpunosti postiže zajedničkim delovanjem AF1 i AF2 domena, glavnih meta u interakciji sa specifičnim transkripcionim faktorima i koregulatornim proteinima [28,83]. Osim toga, AF2 učestvuje i u N/C interakcijama između NTD i LBD, ključnim za sveukupnu funkciju nekih steroidnih receptora [79]. Vezivanje koaktivatora i korepresora za AF2 se postiže preko LXXLL motiva (L-leucin, X-bilo koja aminokiselina) njihovog polipeptidnog lanca [28]. Heliks H12 takođe posreduje u ovom vezivanju, menjajući položaj kao odgovor na vezivanje molekula u „džepu“. Prilikom vezivanja antagonista heliks H12 prolazi kroz konformacionu promenu čime se vezivanje koaktivatora blokira, a time i transkripciona aktivnost (**Slika 8. desno**) [4,82].



Slika 8. Promena položaja heliksa H12 u LBD ER α nakon vezivanja agonista dietilstilbestrola (levo, PDB: 3ERD) i antagonista 4-hidroksitamoksifena (desno, PDB: 3ERT). Položaj heliksa H12 obeležen crvenom bojom omogućava vezivanje koaktivatora, dok je žutom bojom obeležen položaj istoimenog heliksa kada su mesta za vezivanje koaktivatora blokirana.

2.2.1.1. Estrogeni receptor

Glavni posrednik u delovanju estrogena je ER. Kod sisara se unutarćelijski ER dominantno javlja u dve izoforme, ER α i ER β , kodirane odvojenim genima, *ESR1* i *ESR2*, lociranim na hromozomima, 6q25.1 i 14q23.2, respektivno [59,86]. ER β izoforma je otkrivena gotovo 40 godina nakon otkrića ER α , što je značajno promenilo razumevanje signalinga putem ER [5]. Za obe izoforme receptora identifikovano je još po nekoliko splajsnih varijanti, tri kod ER α i četiri kod ER β , koje nastaju u većini slučajeva usled brisanja egzona, što rezultuje skraćenim (*engl.* truncated) proteinima, kojima nedostaju pojedini segmenti i u većini slučajeva

smanjenom transkripcionom aktivnošću [86,87]. ER α je protein molekulske mase 66 kDa, izgrađen od 595 aminokiselina, dok je ER β veličine 54 kDa i gradi ga 530 aminokiselina [59]. Ovi receptori imaju različitu raspodelu u tkivima, pri čemu je ER α najviše eksprimiran u reproduktivnim tkivima (uterusu, teka ćelijama jajnika, dojka, stromi prostate, Lajdigovim ćelijama testisa, epididimisu), bubrezima, belom adipoznom tkivu i jetri, a ER β u granulosa ćelijama jajnika, epitelu prostate, testisima, debelom crevu, centralnom nervnom sistemu, kardiovaskularnom sistemu, plućima i koštanoj srži [59,87]. Signalni put estrogena i odgovor u ćeliji koji izazivaju je rezultat ravnoteže između ekspresije i aktivnosti obe izoforme ER u ciljnim tkivima. Aktivnost ER je, osim u razvoju i regulaciji reproduktivnog sistema, važna i za kontrolu različitih funkcija kardiovaskularnog, skeletnog, imunskog i centralnog nervnog sistema [59,88]. Signaling putem ER ima ulogu i u razvoju različitih patoloških stanja: kancera (dojke, jajnika, endometrijuma, debelog creva), metaboličkih, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih poremećaja, endometrioze, inflamacije, osteoporoze i gojaznosti [87,89].

ER, kao i ostale steroidne receptore, karakteriše standardna multidomenska struktura sa različitim stepenom homologije među izoformama [88]. Najveći procenat homologije između ER α i ER β se javlja kod DBD - čak 97%, zatim LBD, a najmanji kod NTD, samo 16% [87]. AF1 domen se najviše razlikuje i pretpostavlja se da upravo on doprinosi različitoj aktivnosti među izoformama, pri čemu je manja aktivnost uočena kod ER β [89–91]. DBD se sastoji iz dve podjedinice: proksimalne, koja prepoznaje DNK, i distalne, uključene u dimerizaciju [89]. Formiranje kompleksa ER sa Hsp90 u odsustvu liganda sprečava vezivanje neaktivnog receptora za DNK, dok nakon vezivanja liganda ovaj šaperon disosusuje i receptori formiraju funkcionalne homo- ili heterodimere, koji se potom vezuju za specifične elemente odgovora na estrogene (*engl.* estrogen response elements, ERE) sa sličnim afinitetom među izoformama [5,89,90]. Osim na ovaj način, direktnim vezivanjem za DNK, transkripcija može biti aktivirana i indirektno, preko proteina familije AP1 (*engl.* activating protein 1) ili Sp1 (*engl.* specificity protein 1) kao transkripcionih faktora [5]. ER nakon aktivacije ligandom postaje meta vezivanja kompleksa koaktivatora, od kojih neki pripadaju familijama koaktivatora steroidnih receptora (*engl.* steroid receptor coactivator, SRC), histonskih acetilaza (CBP/p300, *engl.* CREB-binding protein; E1A-associated protein p300) i histonskih metil transferaza (*engl.* coactivator-associated arginine methyltransferase 1, CARM1) [89].

U tkivu dojke ER α se nalazi u epitelijalnim ćelijama, i to dominantno u jedru i u nižim koncentracijama u citoplazmi, mitohondrijama i na membrani, dok je ER β , pored epitelijalnih, zastupljen i u stromalnim ćelijama na sličnim lokacijama. Za razliku od ER β , dominantna nuklearna lokalizacija ER α izoforme nije statična i može da se promeni kao odgovor na različite faktore kao što su medicinski tretmani antiestrogenima ili ekspresija faktora rasta, dovodeći do premeštanja ER α u citoplazmu, snižavanja genomske funkcije i rezistentnosti na endokrinu terapiju [91,92]. Kod zdravog tkiva dojke ER β je dominantni oblik (80%) dok je kod tumorskog to ER α [5,87]. ER α i ER β imaju različite uloge u nastanku i napredovanju kancera dojke, prvi proliferativnu, a drugi supresivnu [93]. Pretpostavlja se da glavnu ulogu u kancerogenezi dojke ima prekomerna proliferacija ćelija stimulisana signalingom putem ER α , čime raste rizik od replikacionih grešaka i nastanka mutacija koje za posledicu imaju ometanje normalnih ćelijskih procesa (ćelijskog ciklusa, apoptoze i popravke DNK) ili oštećenja DNK genotoksičnim produktima koji uzrokuju mutacije [5,86,89]. Identifikovano je i nekoliko jednonukleotidnih polimorfizama ER α gena, koji se dovode u vezu sa povećanim rizikom od ove bolesti [86]. Sa druge strane, metilovani promotorski region ER β identifikovan u tumorskim tkivima je moguće objašnjenje za njegovu smanjenu ekspresiju ili čak izostanak ekspresije kod kancera dojke [5,87,94]. *In vitro* studije su pokazale da nakon ekspresije ER β u ER α + ćelijama kancera dojke (MCF-7) dolazi do apoptoze i inhibicije ćelijske proliferacije [5,87,93]. Kod većine tipova kancera dojke eksprimirane su obe izoforme ER, zatim slede oni kod kojih je eksprimirana samo jedna, i na kraju samo 9% ćelija različitih tipova kancera dojke ne eksprimira ni jednu izoformu ER i smatra se hormonski nezavisnim tipom kancera. Osim ekspresije ER, složenoj heterogenoj prirodi kancera dojke doprinosi i ekspresija progesteronskih receptora [91]. Osvrtom na navedene činjenice prepoznaje se značaj ER kao mete u terapiji kancera dojke i mogućnost delovanja SERM i SERD agenasa koja je ranije opisana. Za vezivanje molekula za ER je uglavnom neophodno prisustvo funkcionalnih grupa koje sadrži estradiol, aromatičnog A prstena i hidrosilne grupe u položaju C-3, dok antagonisti često, osim toga, sadrže i dugačke supstituente u centralnom delu molekula, koji direktno utiču na položaj H12, blokirajući vezivanje koaktivatora [82].

ER signaling može biti uključen i u kancerogenezu drugih reproduktivnih organa, poput jajnika i prostate. Kancer jajnika u čak 2/3 slučajeva odlikuje povećana ekspresija ER α i/ili ER β , pri čemu je ER α u najvećoj meri eksprimiran u slučaju kancera epitelijalnog i stromalnog

porekla, a ER β kod onih poreklom od granuloznih ćelija. Slično kao kod kancera dojke, i kod kancera jajnika je uočena obrnuta korelacija između ekspresije ER β i napredovanja bolesti [86,87]. U kancerogenezi prostate gen za ER α ima onkogenu ulogu. ER α učestvuje u proliferaciji ćelija kancera, dok je ekspresija ER β smanjena, verovatno usled povećane metilacije promotora, a u slučaju povećane ekspresije ER β promoviraju se apoptoza. Takođe, imajući u vidu da selektivni agonisti ER β mogu smanjiti proliferaciju epitelijalnih ćelija prostate, raste interesovanje za ovu izoformu kao novu metu u lečenju kancera prostate [87,95]. Zaštitna uloga ER β je uočena i kod kancera debelog creva, čemu ide u prilog i podatak da muškarci, kod kojih je signaling putem ER β , zbog niže koncentracije estrogena, manje aktivan, češće obolevaju od ove bolesti. ER β je prisutan i u zdravom i malignom tkivu debelog creva, ali je u malignom njegova koncentracija znatno niža i smanjuje se sa napredovanjem bolesti. Antiproliferativni efekti SERM-a omogućuju novi pristup lečenju kancera ovog nereproduktivnog tkiva [86,96].

2.2.1.2. Androgeni receptor

Androgeni hormoni specifičnim vezivanjem za AR učestvuju u androgenim, anaboličkim i drugim metaboličkim i hematološkim procesima (eritropoeza, sinteza proteina koji učestvuju u transportu holesterola, kontrola sinteze pojedinih faktora zgrušavanja krvi). Ovi receptori su eksprimirani u mnogim tkivima sisara, što ih povezuje sa brojnim fiziološkim sistemima: endokrinim, reproduktivnim, kardiovaskularnim, centralnim nervnim, gastrointestinalnim, metaboličkim, respiratornim, mišićno-skeletnim, imunskim i hematopoetskim [78,97]. Visoka ekspresija AR uočena je u epididimisu, prostati, testisima, jajnicima, dojčkama, uterusu, nadbubrežnim žlezdama, skeletnim mišićima i bubrezima, dok ostala tkiva imaju nizak ili umeren nivo ekspresije [78,98].

AR gen je lociran na X hromozomu, gde kodira protein veličine 110 kDa, izgrađen od 919 aminokiselina. Sadrži 8 egzona, koji kodiraju domene ključne za funkciju ovog receptora: NTD, DBD, LBD i region šarke. Organizacija ovih jedinica ima mnogo sličnosti sa organizacijom u ostalim članovima familije i ovde će biti naglašene samo pojedine razlike [60]. Najveći udeo, čak 60% celog proteina obuhvata NTD. Njegova struktura nije u potpunosti poznata, pa su mnogi mehanizmi regulacije i dalje nerazjašnjeni [99]. Pojedine studije su pokazale da dužina ponavljanja tripleta nukleotida CAG (C-citozin, A-adenin, G-guanin) u ovom regionu može biti povezana sa rizikom od kancera prostate, pri čemu je manji broj ponavljanja uočen kod muškaraca podložnijih bolesti. Preko ovog domena AR intereaguje sa mnogim

koregulatornim partnerima-proteinima p160 familije, TATA vezujućim proteinom (*engl.* TATA box binding protein, TBP) i transkripcionim faktorom IIF [60]. LBD AR je glavna meta u terapiji kancera prostate. Za razliku od ostalih steroidnih receptora, sadrži 11 heliksa jer je H2 izostavljen, odnosno zamenjen dugačkim fleksibilnim segmentom, dok je numeracija zadržana [60,99]. Među steroidnim receptorima, AR je jedinstven i po tome što, osim vezivanja koaktivatora preko LXXLL motiva, njegov NTD sadrži slične FXXLF i WXXLF motive, koji su esencijalni za specifičnu N/C interakciju (interakciju između N- i C-terminusa) sa LBD [99]. Poznavanje strukture DBD i LBD domena AR je umnogome olakšalo razumevanje mehanizma delovanja ovih receptora, iako trodimenzionalna struktura celog proteina još uvek nije poznata [60].

AR može biti aktiviran širokim spektrom liganada, od prirodnih hormona preko faktora rasta i peptida do sintetskih molekula [98]. Glavni fiziološki agonisti AR su cirkulišući testosteron i u prostati sintetisan dihidrotosteron, mada AR može biti aktiviran i prekursorima u sintezi endogenih androgena i adrenalnim androgenima, ali se oni vezuju sa nižim afinitetom [100,101]. Nakon vezivanja liganda transkripciona aktivacija AR je omogućena vezivanjem za specifične elemente odgovora na androgene (*engl.* androgen response elements, ARE) u promotorskom regionu ciljnih gena, na primer *PSA* gena koji kodira specifični antigen prostate (*engl.* prostate specific antigen, PSA) [60]. Kod pacijenata obolelih od kancera prostate povećanje koncentracije serinske proteaze PSA u serumu ukazuje na povećanu aktivnost AR, što ga čini idealnim tumorskim markerom za dijagnostifikovanje i praćenje toka ove bolesti [99].

Uzajamno delovanje AR i androgena kontroliše odnos između ćelijske proliferacije i ćelijske smrti i ima ključnu ulogu u razvoju i napredovanju kancera prostate. Zapravo, više od 10% otkrivenih mutacija na *AR* genu se dovodi u vezu sa predispozicijom za oboljevanje od kancera prostate. U fazi dok je bolest androgen-zavisna delovanjem antagonista (antiandrogena) moguće je poremetiti signaling putem AR, po principu kompeticije ovih jedinjenja sa androgenima za vezujuća mesta na AR, čime se inibira njihova aktivnost. Na osnovu strukture antiandrogeni se mogu podeliti na steroidne (spironolakton, ciproteron acetat, oksendolon) i nesteroidne (flutamid, bikalutamid i nilutamid) [60].

Dešava se da se nakon primene androgen-deprivacione terapije (ADT) kod pacijenata razvije oblik kancera prostate rezistentan na kastraciju, koji je otporan na antiandrogene i druge slične medicinske tretmane, što obično dovodi do smrtnog ishoda [99,100]. U ovom slučaju

pacijenti imaju visok nivo ekspresije AR i signalni put ostaje aktivan uprkos zanemarljivo niskom nivou androgena, pa se postavlja pitanje kako je to moguće [100]. Naime, kod CRPC „okidač“ signalinga putem AR mogu biti mutacije koje uslovljavaju povećanu osetljivost receptora na izuzetno nizak nivo androgena, ligand-nezavisna aktivacija receptora, promene u ekspresiji i načinu vezivanja koaktivatora kao i neki hormonski nezavisni mehanizmi [60,99]. Pretpostavka je da se ligand-nezavisan način aktivacije odvija preko različitih faktora rasta koji učestvuju u fosforilaciji AR ili interakciji sa koaktivatorima, kao i preko interleukina, čiji je povećan cirkulišući nivo identifikovan kod obolelih od CRPC [97]. U vezu sa poremećenom funkcijom ovih receptora se, osim reproduktivnih poremećaja, dovode i različiti kardiovaskularni, neurološki i poremećaji imunskog sistema [78].

Sindrom neosetljivosti na androgene (*engl.* androgen insensitivity syndrome, AIS) je stanje koje nastaje kao posledica delimičnog ili potpunog gubitka funkcije AR usled mutacija unutar AR gena, a rezultira nesposobnošću ćelija da odgovore na androgene, bez obzira na njihovu koncentraciju u krvi. Osoba sa ovim poremećajem polne diferencijacije ima muški kariotip, ali ženski fenotip [60,97]. Nedostatak androgena kod muškaraca, koji karakterišu veoma niske koncentracije testosterona, predstavlja poremećaj koji se javlja usled nedostatka liganda izazvanog narušavanjem hipotalamusno-hipofizno-gonadalne osovine, a ne usled poremećaja u funkcionisanju samog receptora [97]. Redak recesivni neurodegenerativni poremećaj čiji uzrok se dovodi u vezu sa funkcionalnošću AR gena je poznat kao Kenedijeva bolest ili spinobulbarna mišićna atrofija. Usled višestrukih ponavljanja CAG tripleta u delu AR gena koji kodira transaktivacioni domen dolazi do proširenog poliglutaminskog trakta (polyQ) na amino-terminusu receptora, nepravilnog savijanja proteina i formiranja agregata, čime se povećava toksičnost u motornim neuronima i kod pacijenta dolazi do slabljenja mišića i gubitka mišićne mase. Kod zdravih osoba javlja se 11-31 tripleta, a u slučaju ovog poremećaja čak 40-62 [97,102].

Pored pomenutih antiandrogena, selektivni modulatori androgenih receptora (*engl.* selective androgen receptor modulators, SARM), od kojih je većina nesteroidne strukture, su razvijeni u cilju prevazilaženja nedostataka upotrebe testosterona tokom supstitucione terapije, koja se primenjuje kod muškaraca koji usled sniženog nivoa ovog hormona imaju izražene simptome hipogonadizma. Na ovaj način prevaziđena je ograničena bioraspoloživost testosterona nakon unošenja u organizam oralnim putem, nemogućnost razdvajanja androgenih od

anaboličkih efekata i unakrsna aktivnost sa drugim steroidnim receptorima. Novija istraživanja bave se efikasnošću ovih supstanci u lečenju osteoporoze i sarkopenije [78,98], gde bi idealan SARM trebalo da selektivno aktivira AR u kostima i mišićima, bez aktiviranja AR u prostati i seminalnim vezikulama [98]. Takođe, zbog anaboličkih efekata, korišćenje SARM može biti zloupotrebjeno u sportu u cilju poboljšanja fizičke spremnosti takmičara [78].

2.2.2. Odabrane metode za ispitivanje interakcija između steroidnih receptora i njihovih liganada

Veliki interes vlada za razvojem jednostavnih, visoko specifičnih i osetljivih bioloških testova za određivanje afiniteta vezivanja prirodnih ili sintetičkih jedinjenja za steroidne receptore, čija je primena usmerena ka pronalaženju kandidata za lečenje hormonski zavisnih bolesti i stanja, kao i ispitivanju biološke aktivnosti biljnih ekstrakata, metabolita steroida i ksenoestrogena iz životne sredine [103]. Za razliku od specifičnih imunoloških metoda koje se koriste u kliničkim laboratorijama za merenje koncentracije određenog hormona korišćenjem specifičnih antitela, biološkim testovima koji će ovde biti opisani je moguće ispitati biološku aktivnost bilo kog nepoznatog jedinjenja [104].

Transkripcioni testovi su vrlo popularni. Zasnivaju se na potencijalu ispitivanog jedinjenja da izazove transkripcionu aktivnost steroidnih hormona vezivanjem za steroidne receptore koji mogu biti eksprimirani u ćelijskim linijama sisara ili ćelijama kvasca [103]. Transkripcioni testovi u humanim ćelijskim linijama mogu biti zasnovani na stabilnoj ili prolaznoj transfekciji, imaju veću osetljivost nego kvaščevi i mogućnost identifikacije jedinjenja za čiju aktivnost je neophodan humani metabolizam [104,105]. Međutim, kompleksni metabolički putevi u ćelijama sisara mogu predstavljati i problem zbog razgradnje ispitivanog jedinjenja do neaktivnih produkata. U tom slučaju prednost imaju kvasci čija metabolička aktivnost je različita od humane, tako da je efekat ispitivanog jedinjenja posledica njegove originalne aktivnosti i to je jedan od razloga zbog kojih se transkripcioni testovi radije izvode u ovakvom sistemu. Dodatni razlozi za favorizovanje ćelija kvasaca kao model-sistema u transkripcionim testovima su brži rast, jeftiniji medijumi bez steroidnih hormona, često neophodnih za stimulisanje rasta ćelija sisara *in vitro*, i robustnost. Ćelije kvasca mogu tolerisati pojedine toksine u određenim koncentracijama, različite rastvarače i sporedne produkte nastale tokom sinteze jedinjenja u laboratoriji, što omogućava testiranje odabranih jedinjenja bez dodatnog prečišćavanja [103,104]. Veoma je značajno i to što kvasci ne eksprimiraju endogene

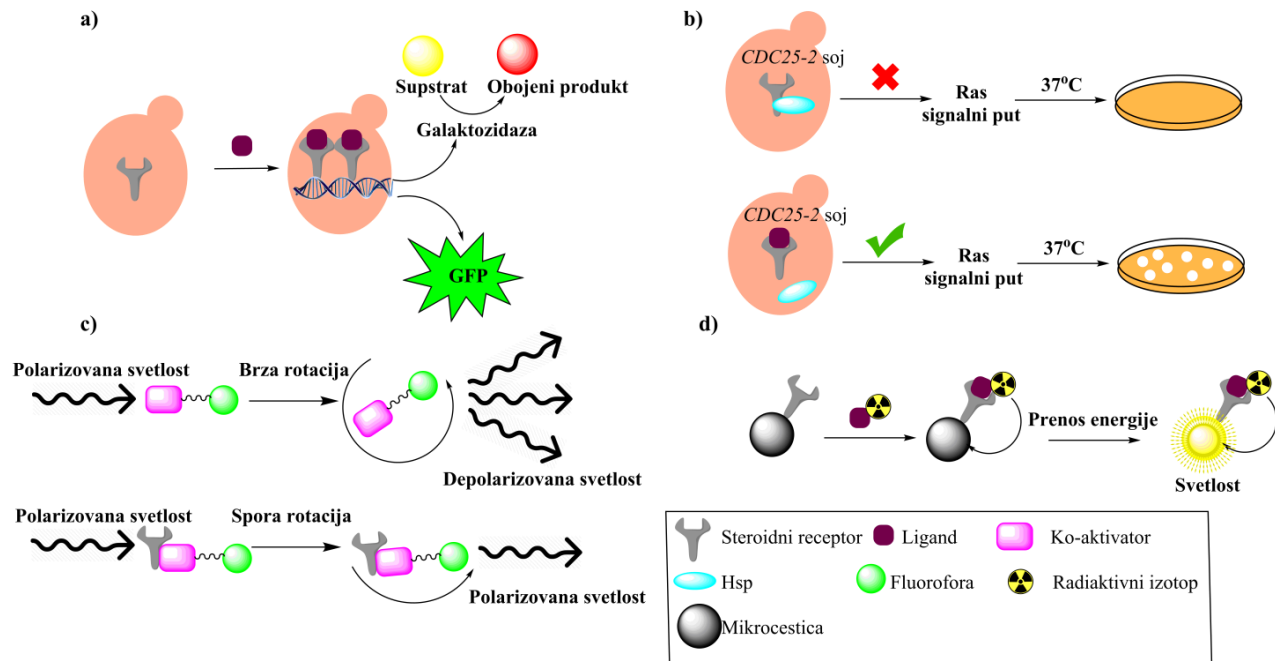
steroidne receptore, čime je smanjena neželjena unakrsna aktivnost sa drugim signalnim putevima, što bi moglo uticati na rezultate vezivanja ispitivanih jedinjenja [104].

Estrogeni i androgeni skrining testovi u kvascu (*engl.* yeast estrogen screen, YES; yeast androgen screen, YAS) su visoko specifični transkripcioni testovi, koji se zasnivaju na aktivaciji ER α ili AR nakon vezivanja liganda, translociranju kompleksa u jedro i aktivaciji ekspresije reporter gena kao što je lacZ, koji kodira β -galaktozidazu, i/ili gena koji kodira zeleni fluorescentni protein (*engl.* green fluorescent protein, GFP) (**Slika 9.a**). Ovi konstrukti su integrisani u genom kvasca posebnim plazmidima, a stepen ekspresije reporter gena je u korelaciji sa potencijalom ispitivanog jedinjenja da se veže za receptor i aktivira transkripciju. Ekspresija GFP proteina se kvantifikuje merenjem fluorescencije u živim, celim ćelijama, što ovaj test čini veoma jednostavnim i brzim, dok merenje aktivnosti β -galaktozidaze zahteva dodatne korake: dodatak hromogenog supstrata β -galaktozidaze i liziranje ćelija radi spektrofotometrijske kvantifikacije nastalog produkta [11,103,104]. Nedostatak opisanih testova je taj, što je za detekciju merljivog signala neophodno kompletiranje svih koraka nakon vezivanja liganda uključujući premeštanje u jedro, vezivanje za DNK i transkripciju, čime se mogu propustiti jedinjenja koja se vezuju za steroidne receptore, ali nisu efikasna u ostalim fazama neophodnim za aktivaciju reporter gena [106].

Kohler i saradnici su razvili netranskripcioni test za identifikaciju vezivanja liganda za ER, koji se zasniva na ponovnom uspostavljanju funkcije narušenog esencijalnog signalnog puta rasta ćelija nakon vezivanja liganda za ER, kod *Saccharomyces cerevisiae* CDC25-2 soja (**Slika 9.b**). Ovaj soj nosi mutaciju na genu odgovornom za ćelijski ciklus i aktivaciju Ras proteina, što rezultuje nesposobnošću kvašćevih ćelija da rastu na povišenim temperaturama. Nakon transformacije, eksprimirani humani Ras protein spojen sa LBD ER je u odsustvu liganda najverovatnije sterno inhibiran Hsp proteinom. Nakon vezivanja liganda, Hsp disosuje i dolazi do aktivacije Ras proteina i cAMP zavisnih kaskada, što omogućava preživljavanje ćelija na povišenim temperaturama [106].

Fluorescentni polarizacioni test je razvijen kako bi se omogućilo ispitivanje interakcija između steroidnih receptora i koaktivatora. Naime, ovaj test se zasniva na promeni ravni polarizovane svetlosti emitovane od strane fluoroforom obeleženog koaktivatora u kompleksu sa steroidnim receptorom (**Slika 9.c**). U odsustvu vezivanja, fluoroforom obeležen koaktivator, s obzirom na to da se radi o malom molekulu, brzo rotira i nakon pobuđivanja polarizovanom

svetlošću (koja osciluje u jednoj ravni) emituje depolarizovanu svetlost (osciluje u više ravni). Nasuprot tome, nakon vezivanja za steroidni receptor, kompleks steroidni receptor-fluorescentno obeležen koaktivator je veći i sporije rotira, emitujući polarizovanu svetlost koja se detektuje [105]. Osim za vezivanje koaktivatora, Zhang i saradnici su razvili ovaj test i za ispitivanje interakcija ER sa ERE. ERE su obeležili fluoresceinom i na prethodno opisan način, nakon specifičnog vezivanja receptora (ili receptora sa koaktivatorom), zbog veličine, kompleks zadržava istu ravan tokom pobuđivanja i emisije, a emitovana svetlost je polarizovana [107]. Nedostaci ove metode su: pozadinska fluorescencija, koja može poticati od rastvarača, liganda ili drugih komponenata u reakcionoj smeši, kao i nemogućnost razlikovanja agonista i antagonista [13,105].



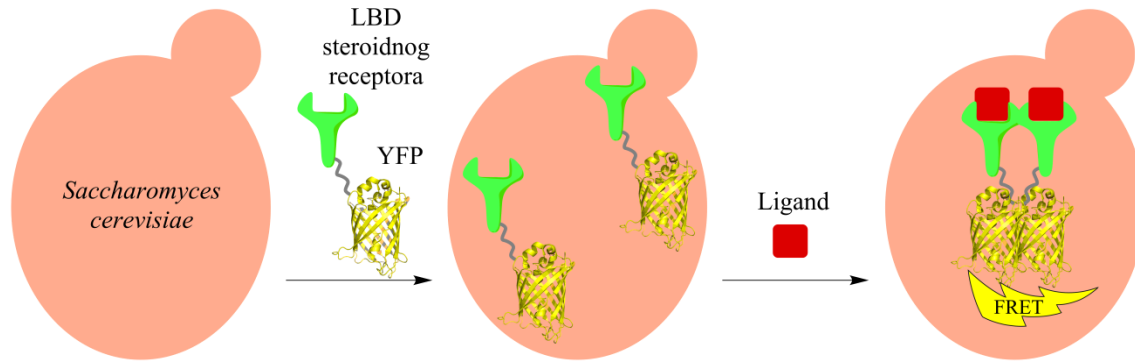
Slika 9. Metode za ispitivanje steroidni receptor-ligand interakcija: a) Transkripcioni YES/YAS test b) Netranskripcioni test zasnovan na uspostavljanju funkcionalnog signalnog puta rasta nakon vezivanja liganda za receptor c) Fluorescentni polarizacioni test d) SPA test.

Radioaktivne metode su među prvim korišćenim metodama za merenje afiniteta vezivanja između liganda i steroidnih receptora. Veoma su osetljive, a mogu biti zasnovane na saturacionom ili kompetitivnom vezivanju. Kod prvog pristupa se određuje udeo receptora koji može biti specifično vezan radioaktivno obeleženim ligandom, na osnovu razlike njegovog ukupnog i nespecifičnog vezivanja. Kompetitivni testovi se zasnivaju na „takmičenju“ između radioaktivno obeleženog prirodnog liganda i neobeleženog ispitivanog jedinjenja za vezujuće mesto na receptoru, pa je moguće odrediti relativni afinitet ovog vezivanja. Što je viši afinitet

vezivanja ispitivanog jedinjenja za dati receptor, biće manje vezanog radioaktivno obeleženog liganda. Kod ove metode neizostavan korak je razdvajanje vezane od slobodne frakcije i merenje radioaktivnosti jedne od njih. Kod steroidnih hormona radioaktivno obeležavanje se često vrši zamenom H-3 atoma njegovim izotopom, tricijumom [108] i u poređenju sa fluorescentnim markerima, radioligandi su sličniji prirodnim ligandima. Od razvijenih radioaktivnih metoda u ovoj oblasti test blizine scintilacije (*engl.* scintillation proximity assay, SPA) može biti primenljiv za testiranje velikog broja potencijalnih liganada odjednom (*engl.* high throughput screening, HTS) [13]. Ovaj test je zasnovan na emitovanju signala nakon specifičnog vezivanja radioaktivno obeleženog liganda za mikroskopske čestice koje sadrže vezan odgovarajući receptor i scintilant. Usled blizine scintilanta i radioaktivno obeleženog liganda nakon formiranja kompleksa sa receptorom dolazi do prenosa energije sa obeleženog molekula na scintilant, čijom stimulacijom se oslobađaju fotoni, što se detektuje scintilacionim brojačem (**Slika 9.d**), dok u odsustvu vezivanja ne dolazi do emisije fotona. U odnosu na tradicionalne radioaktivne metode ovde nije neophodan dodatni korak fizičkog odvajanja faza za detekciju [13,105,109]. Generalno, glavni nedostaci radioaktivnih metoda su visoka cena, opasnost po zdravlje prilikom rukovanja sa radioaktivnim materijalom, odlaganje radioaktivnog otpada, potreba za specijalizovanom opremom i posebnim licencama [13,105]. Na kraju, iako *in vitro* testovi imaju brojne prednosti i neizostavna su uvertira *in vivo* studijama, ipak ih ne mogu zameniti [103].

2.2.2.1. Fluorescentni test u kvascu

Kako bi prevazišli ograničenja postojećih testova, Muddana i Peterson su za testiranje liganada steroidnih receptora razvili netranskripcioni fluorescentni ćelijski senzor u kvascu. Test je baziran na ekspresiji LBD steroidnih receptora ER α , ER β , AR ili GR, spojenog kratkim aminokiselinskim fragmentom (*engl.* linker) sa žutim fluorescentnim proteinom (*engl.* yellow fluorescent protein, YFP) u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*. Nakon vezivanja liganda za eksprimirani domen steroidnog receptora dolazi do konformacione promene, odnosno dimerizacije receptora i približavanja dva molekula YFP-a do rastojanja neophodnog za nastanak fizičkog fenomena, fluorescentnog rezonantnog transfera energije (*engl.* fluorescence resonance energy transfer, FRET) (**Slika 10**) [80].



Slika 10. Princip fluorescentnog ćelijskog senzora.

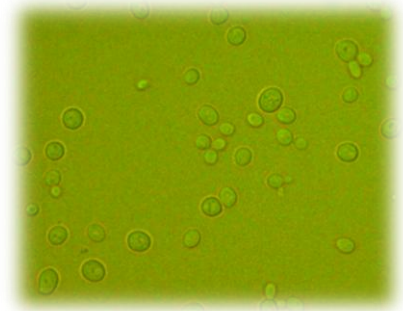
FRET mehanizam obuhvata transfer energije međumolekulskim dipol-dipol interakcijama sa jedne fluorofore na drugu, a zavisen je od rastojanja. Donorska fluorofora je pobuđena i apsorbuje energiju, dok se na akceptorsku energija prenosi. Da bi došlo do FRET-a i da bi merenja bila efikasna, rastojanje između dva molekula treba da bude 2-6 nm, što ga čini vrlo osetljivim indikatorom, idealnim za ispitivanje raznih bioloških fenomena u živim ćelijama, poput molekulskih interakcija (protein-ligand, protein-protein, itd) [110,111].

Kod fluorescentnog testa u kvascu ispitivanje protein-ligand interakcija je omogućeno indirektno preko protein-protein interakcija, koje je moguće vizuelizovati zahvaljujući prisustvu fluorofora. Imajući u vidu da je dimerizacija receptora proces zavisen od vezivanja liganda za LBD, Muddana i Peterson su pretpostavili da je intenzitet emitovane fluorescencije srazmeran relativnom afinitetu vezivanja liganda za odgovarajući receptor. Tretiranje rekombinantnih ćelija kvasaca poznatim prirodnim i sintetskim agonistima i antagonistima steroidnih receptora rezultovalo je dozno zavisnim fluorescentnim signalom, koji su detektovali na nekoliko načina: kvalitativno, fluorescentnom mikroskopijom i kvantitativno, protočnom citometrijom i ispitivanjem fluorescencije ćelijskog ekstrakta fluorimetrijski u mikrotitar pločama. Efekte ovog testa su uporedili sa efektima dobijenim u transkripcionom dvohibridnom testu u kvascu, od kog je u nekim slučajevima bio i osetljiviji [80]. Postojeći fluorescentni ćelijski biosenzor je poslužio kao osnova za početak izrade ove doktorske disertacije, čiji je prvi specifičan cilj bio usmeren na optimizaciju ovog testa i proširenje njegove primene na testiranje sintetičkih steroidnih derivata i fitoestrogena, prirodno zastupljenih u biljkama.

2.2.2.1.1. Kvasac kao model organizam

Kvasac je uveden kao eksperimentalni model organizam početkom XX veka, od tada je konstantno proučavan i poklonjena mu je velika pažnja, s obzirom na njegov ogroman potencijal.

Mnogi istraživači ga, zahvaljući građi ćelije i osnovnim ćelijskim mehanizmima, smatraju idealnim sistemom za biološka ispitivanja [112]. Najbolje proučen jednoćelijski eukariot je kvasac *Saccharomyces cerevisiae* (Slika 11), čiji je genom sekvenciran 1996. godine i kojim se lako manipulira. U odnosu na bakterije, kvasci imaju veću genetičku kompleksnost i značajne tehničke prednosti, što ih čini moćnijim model-sistemom u odnosu na prokariotske organizme. Mehanizmi osnovnih ćelijskih procesa poput replikacije, transkripcije, translacije i popravke DNK kod viših organizama i kvasaca imaju mnogo sličnosti. Osim toga, treba naglasiti i da su kvasci neizostavni model organizmi i za izučavanje regulacije lipidnog i proteinskog metabolizma kod eukariota. Mnogi geni i proteini uključeni u ove biološke procese su evoluciono i funkcionalno očuvani od kvasaca do sisara, što otvara mogućnosti ispitivanju gena poreklom iz različitih eukariota, uključujući i čoveka, u kvascu [25,112,113]. Sve navedeno ga čini veoma popularnim i omiljenim model sistemom za ispitivanje eukariotske ćelije i osnovnih pitanja u ćelijskoj biologiji [25].



Slika 11. Ćelije *Saccharomyces cerevisiae*.

Nasuprot mnogim drugim mikroorganizmima, ćelije kvasca mogu biti haploidne i diploidne, pri čemu su prve najčešće ovalnog oblika, a druge elipsoidnog [25]. Prečnik ćelija *Saccharomyces cerevisiae* je u rasponu 1-10 μM . Okružuje ih debeli ćelijski zid [112], a poseduju i mnogo organela, uključujući mitohondrije, peroksizom i jedro, gde je hromozomska DNK upakovana slično kao kod sisara [113]. Ovaj jednostavni model organizam karakteriše brz rast u definisanom medijumu, zatim jednostavno i ekonomično gajenje u laboratoriji, lakoća zasejavanja i izolacije mutanata. Prednosti su, takođe, i to, što prilikom rada sa njima nisu potrebne posebne mere zaštite istraživača, budući da nisu patogeni [25], i što im je prosečno generacijsko vreme samo 90 minuta, čime se brzo obezbeđuje velika populacija za analizu [113].

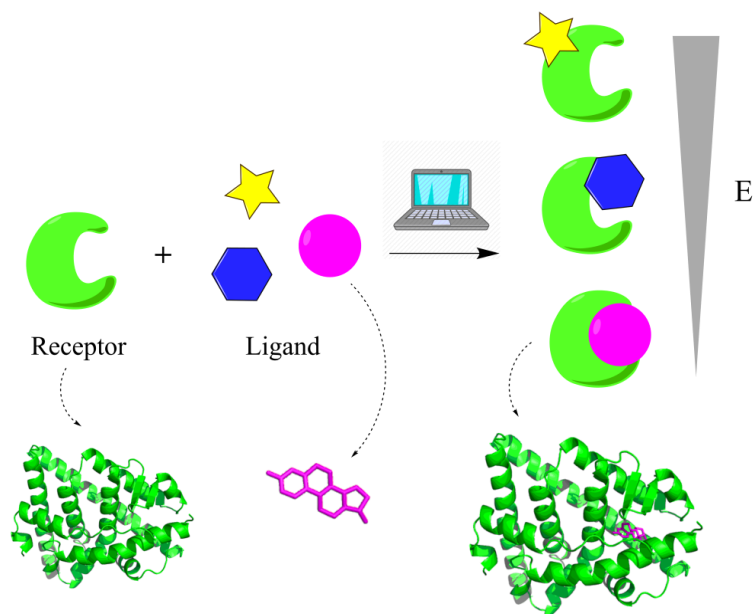
Dodatno, lakoća manipulacije genetskim sistemom kvasca doprinela je detaljnom proučavanju njegovih osnovnih funkcija korišćenjem biohemijskih pristupa i metoda molekularne biologije. Veliki napredak doneo je razvoj metode transformacije, čineći kvasce domaćinima pogodnim za kloniranje željenih gena, pa tako odgovarajući plazmidi mogu biti uneti u kvašćeve ćelije kao replikujući molekuli ili mogu biti integrisani u genom. Danas je

dostupan širok spektar protokola za genetsku manipulaciju kvasaca, kao i veliki broj sojeva koji poseduju auktotrofne markere, marker za rezistentnost ili određenu mutaciju [25,112].

2.2.2.2. *In silico* predviđanje protein-ligand interakcija

U oblasti otkrivanja lekova ispitivanje protein-ligand interakcija je od neprocenjivog značaja za rasvetljavanje mnogih bioloških procesa i, osim eksperimentalnih, velika pažnja je posvećena i kompjuterskom pristupu, tj. *in silico* metodama [114]. S obzirom na to da su *in vitro* i *in vivo* eksperimenti vremenski i materijalno zahtevni i ponekad neizvodljivi za ispitivanje velikog broja uzoraka, *in silico* analiza je unela pravu revoluciju u ovoj oblasti [115]. Kompjutersko predviđanje može biti zasnovano na strukturi liganda (*engl.* ligand-based) ili na strukturi ciljnog proteina (*engl.* structure-based, target-based), u zavisnosti od dostupnih informacija o strukturi makromolekulske mete (često se naziva receptor) i malog molekula (liganda), a mogu i da se kombinuju [114,116,117]. Prvo se primenjuje kada struktura biomolekula nije poznata, pri čemu se nepoznati ligand poredi sa bazom poznatih liganada ciljane mete, uz pretpostavku da strukturno slični ligandi ispoljavaju slične biološke odgovore [114,118]. Drugi pristup polazi od poznate strukture biomolekula, dobijene eksperimentalnim putem ili kompjuterski homolognim modelovanjem i ima za cilj identifikaciju potencijalnih liganada i načina njihovog vezivanja za datu metu [114].

Jedna od najčešće upotrebljivanih i najpopularnijih *in silico* metoda za ispitivanje biomolekulskih interakcija zasnovanih na strukturi mete je molekularni doking. Doking analizom je moguće predvideti potencijalne orijentacije i konformacije liganda u kompleksu sa biomolekulom uz ključne interakcije i odrediti slobodnu energiju njihovog vezivanja (Slika 12). Cilj je identifikovati potencijalni ligand i njegovu



Slika 12. Princip molekularnog dokinga. E na slici označava energiju vezivanja.

energetski najpovoljniju konformaciju (niže vrednosti slobodne energije vezivanja označavaju veći afinitet i obrnuto) kroz ciklične procese upotrebom odgovarajućih algoritama i matematičkih funkcija vrednovanja (*engl.* scoring functions) [119,120]. Postavljanje liganda u odgovarajuće mesto vezivanja primenom algoritama nije jednostavan zadatak, s obzirom na to da čak i veoma jednostavni molekuli poseduju veliki broj konformacionih stepena slobode [121,122]. Algoritmi se kombinuju sa funkcijama vrednovanja dizajniranim za predviđanje afiniteta vezivanja liganda za receptor, koje kroz dalje faze postaju sve kompleksnije [121]. Kako je broj pretpostavljenih načina vezivanja virtuelno neograničen, algoritmi treba da budu brzi i efikasni u pretrazi ispitivanog konformacionog prostora, a navedeni problemi se pojednostavljaju na dva načina: uvođenjem ograničenja poput rigidnosti receptora, pri čemu su ostaci unutar proteina fiksirani i nefleksibilni, i ograničavanjem unutrašnje geometrije liganda, čime se smanjuje konformacioni prostor; kao i pojednostavljenjem funkcija vrednovanja [119]. Efikasnost dokinga se takođe povećava i poznavanjem položaja vezujućeg mesta pre same simulacije [118]. Najčešće se izvodi re-doking, odnosno uklanjanje liganda iz postojećeg poznatog receptor-ligand kompleksa, a zatim vraćanje u pokušaju ponovnog dobijanja prvobitnog vezivanja, pri čemu se uspešnost prati na osnovu vrednosti RMSD (*engl.* root-mean-square deviation) [122]. Dostupno je mnogo akademskih i komercijalnih softverskih paketa za predviđanje protein-ligand interakcija, među kojima se ističe i široko upotrebljava AutoDock, koji je besplatan i otvorenog pristupa, kao i njegov naslednik AutoDockVina, kojim se lakše manipuliše i brži je [119].

Glavne prednosti *in silico* metoda su pouzdanost i mogućnost preliminarnog testiranja čitavih biblioteka liganada, uz uštedu vremena i finansija, a rezultat je dobijanje obimnih baza podataka. Osim smanjene upotrebe reagensa, prednost *in silico* testova je i ta što izostaje i često etički problematična potreba ispitivanja na životinjama [120,123]. Treba naglasiti i to da je *in silico* metodama moguća procena afiniteta vezivanja liganda za odgovarajući receptor čak i pre njegove sinteze, kao i drugih svojstava, poput toksičnosti delovanjem na CYP450 enzime koji učestvuju u metabolizmu različitih egzogenih materija, kada eksperimentalni podaci još nisu dostupni [120,122]. Međutim, u cilju potvrde biološke aktivnosti virtuelna ispitivanja moraju biti praćena i eksperimentalnim [120]. Molekularni doking pored višestrukih prednosti ima i određena ograničenja u smislu krutosti receptora (rigidni doking), pa se za realniju konformacionu analizu teži fleksibilnom dokingu i molekularnoj dinamici. Potencijalni problemi

ovih testova su još i otežano predviđanje interakcija liganda i receptora zbog prisustva molekula rastvarača, kao i entropijski efekti, koje nije jednostavno obuhvatiti algoritmom [118–120,124].

2.3. Aromataza

Aromataza ima ključnu ulogu u biokonverziji androgena do estrogena, tačnije u aromatizaciji A prstena androgena, nakon višestruke oksidacije. Jedini je poznati enzim koji ima ovu sposobnost. Član je CYP450 familije enzima i poseduje za njih karakterističnu hem grupu. Dominantna mesta sinteze ovog enzima su jajnici, placenta i adipozno tkivo, a lokacija u ćelijama endoplazmatični retikulum. Za njenu potpunu katalitičku aktivnost neophodno je prisustvo proteinskog partnera, citohrom P450 reduktaze (CPR), što predstavlja dodatni izazov prilikom optimizacije bioloških testova za ispitivanje potencijalnih inhibitora. Zajedno sa ER, aromataza je glavni „okidač“, kako fiziološke, tako i patofiziološke uloge estrogena, te stoga, zahvaljujući specifičnosti delovanja, njena inhibicija predstavlja odličan ciljani pristup u lečenju kancera dojke [15,125,126]. Poznavanje kristalne strukture aromataze je značajno olakšalo razumevanje specifičnosti i mehanizma delovanja ovog enzima na molekularnom nivou [127]. U daljem tekstu navedene su strukturne i funkcionalne karakteristike ovog steroidogenog enzima, njegov potencijalni mehanizam delovanja, načini inhibicije, kao i odabrane metode za ispitivanje aktivnosti, sa fokusom na rekombinantnu ekspresiju, i vezivanja liganda za aromatazu, zahvaljujući fluorescenciji Trp ostatka u aktivnom centru enzima i promeni spinskog stanja Fe iz hem grupe.

2.3.1. Struktura i funkcija aromataze

Jedinstveni predstavnik CYP450 familije enzima, aromataza (estrogen sintaza ili estrogen sintetaza), katalizuje aromatizaciju šestočlanog A prstena C19 androgenih prekursora, androstendiona, testosterona i 16 α -hidroksitestosterona, pri čemu, nakon uklanjanja oksidovane C-19 angularne metil grupe, nastaju C18 steroidi – estrogeni, sa karakterističnim aromatičnim A prstenom i hidroksilnom grupom u položaju C-3: estron, estradiol i estriol, respektivno. *CYP19A1* gen lociran na hromozomu 15q21.1 je zaslužan za kodiranje ovog enzima sačinjenog od 503 aminokiseline i hem prostetične grupe [127,128]. Hem kofaktor sadrži porfirinski sistem visoko konjugovanih prstenova sa atomom gvožđa u centru, čija se oksidaciona stanja i spin mogu menjati (Fe²⁺/Fe³⁺) [129]. Aromataza je protein, usidren u membranu endoplazmatičnog retikuluma preko svog amino terminusa [130,131]. Kao i većina CYP450 enzima, i aromataza za potpunu funkcionalnu aktivnost zahteva funkcionalno povezivanje sa flavoproteinom CPR koji

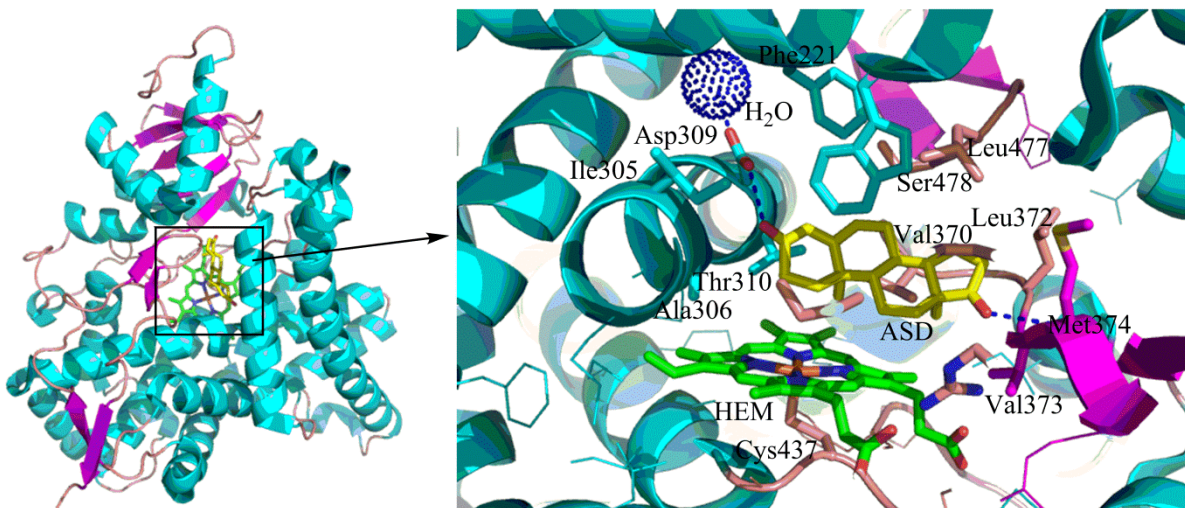
sadrži FAD i FMN prostetične grupe i prenosi elektrone sa redukovanoj koenzima NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) na aromatazu [132]. Primarna mesta ekspresije aromataze kod ljudi su ćelije reproduktivnih tkiva, uključujući granulosa ćelije jajnika, sinciotrofoblaste placente, epitelijalne ćelije i preadipocite dojke, Lajdigove ćelije testisa, zatim ćelije adipoznog tkiva, mozga, kostiju i fibroblaste kože [125,126]. U poređenju sa zdravim ćelijama, u ćelijama kancera je detektovan nekoliko puta viši nivo informacione RNK aromataze, kao i eksprimiranog proteina [125].

Kod žena u reproduktivnom periodu glavni izvor estrogena predstavlja aromataza iz funkcionalnih jajnika, dok se neznatna količina sintetise i u perifernim tkivima, gde deluje parakrino i autokrino. Međutim, nakon atrofije jajnika, posle menopauze, aromataza se sintetise samo u perifernim tkivima, poput adipoznog, u kostima, mozgu, koži i vaskularnom endotelu. Estrogeni nastali u ovim ekstragonadnim tkivima deluju lokalno na parakrin ili intrakrin način, dok deo krvlju stiže i do ostalih ciljnih tkiva. Iako u ovim tkivima ekspresija aromataze nije visoka, kao ni ukupna količina sintetisanih estrogena, njihova lokalna koncentracija je visoka, čime postižu značajan (pato)fiziološki efekat kroz takozvani koncept lokalne biosinteze estrogena [126,128,133]. Osim u reprodukciji i polnoj diferencijaciji, aromataza učestvuje i u metabolizmu kostiju i ima neuroprotektivnu ulogu [134]. Interesantno je i da su, zahvaljujući aromatazi iz placenti, i fetus i majka zaštićeni od viška androgena, odnosno maskulinizacije [135].

CYP19A1 gen je organizovan u 10 egzona, od kojih je egzon I odgovoran za kodiranje devet promotora koji regulišu kompleksnu tkivno specifičnu ekspresiju aromataze, dok su egzoni II-X translirajući i kodiraju protein. Za funkciju aromataze najveći značaj imaju egzoni V i IX, odgovorni za kodiranje katalitičke podjedinice i regiona za vezivanje hem kofaktora, respektivno [129]. Kod zdravih žena adipozno tkivo dojke eksprimira aromatazu u maloj meri preko promotora PI.4, dok su promotori PI.3 i PII gotovo neaktivni. Nasuprot tome, tokom malignih promena aktivnost glavnog promotora koji je dominantan u zdravom tkivu je zamenjena povećanom aktivnošću promotorskih regiona PII, PI.3 i PI.7, pa je povećana i ekspresija enzima. Kao rezultat zamene promotora menja se i način regulacije biosinteze estrogena [125,126]. Osim kancera dojke, aromataza se dovodi u vezu i sa sindromom policističnih jajnika, kancerom endometrijuma i nekim neurodegenerativnim poremećajima, koji mogu biti posledica

jednonukleotidnih polimorfizama na *CYP19A1* genu [134]. Sa druge strane, smanjena produkcija ili aktivnost aromataze se retko javljaju [125].

Ghosh i saradnici su 2009. godine uspešno odredili trodimenzionalnu strukturu humane placentalne aromataze u kompleksu sa njenim prirodnim supstratom, androstendionom (**Slika 13. levo**) i time olakšali razumevanje odnosa strukture i funkcije, kao i poslednjeg koraka u mehanizmu delovanja, jedinstvenog za ovaj enzim. Za razliku od drugih CYP450 enzima koji nisu visoko specifični prema supstratu, kod aromataze je identifikovano postojanje visoko specifičnog „džepa“ za vezivanje androgena, koji je manji u odnosu na „džepove“ mnogih predstavnika ove familije enzima. Elementi sekundarne strukture obuhvataju 12 α -heliksa i 10 β -ploča savijenih na način karakterističan za CYP450 proteine. Aktivni centar aromataze okružuju polarni i hidrofobni aminokiselinski ostaci, odgovorni za različite tipove interakcija sa prirodnim supstratom (**Slika 13. desno**).



Slika 13. Trodimenzionalna struktura aromataze sa uvećanim prikazom aktivnog centra i aminokiselinskim ostacima ključnim za interakcije sa prirodnim supstratom androstendionom (ASD) i hem kofaktorom (PDB: 3EQM).

Met374 gradi vodoničnu vezu sa 17-keto grupom androstendiona, koja je na bliskom rastojanju i sa Arg115, koji dominantno učestvuje u elektrostatičkim interakcijama, ali je prema mišljenju ovih autora i formiranje vodonične veze između Arg115 i 17-keto grupe androstendiona takođe moguće. Protonovani oblik Asp309 gradi vodoničnu vezu sa 3-keto grupom supstrata i molekulom vode i ima centralnu ulogu u pretpostavljenom mehanizmu delovanja aromataze. Visoko očuvan Cys437 učestvuje u vezivanju hema, delujući kao peti ligand u koordinativnom vezivanju atoma gvožđa, pored 4 atoma azota iz porfirina. Pored navedenih veza, brojne su i Van der Valsove interakcije [127,136]. Lo i saradnici su potvrdili

ulogu Asp309 mutacijom aspartata u asparagin, koji može da učestvuje u građenju vodonične veze zahvaljujući amidnoj grupi, ali ne i u enzimskoj reakciji zbog nemogućnosti manipulacije protonima, te je rezultat katalitički neaktivan enzim [130].

2.3.2. Mehanizam delovanja aromataze

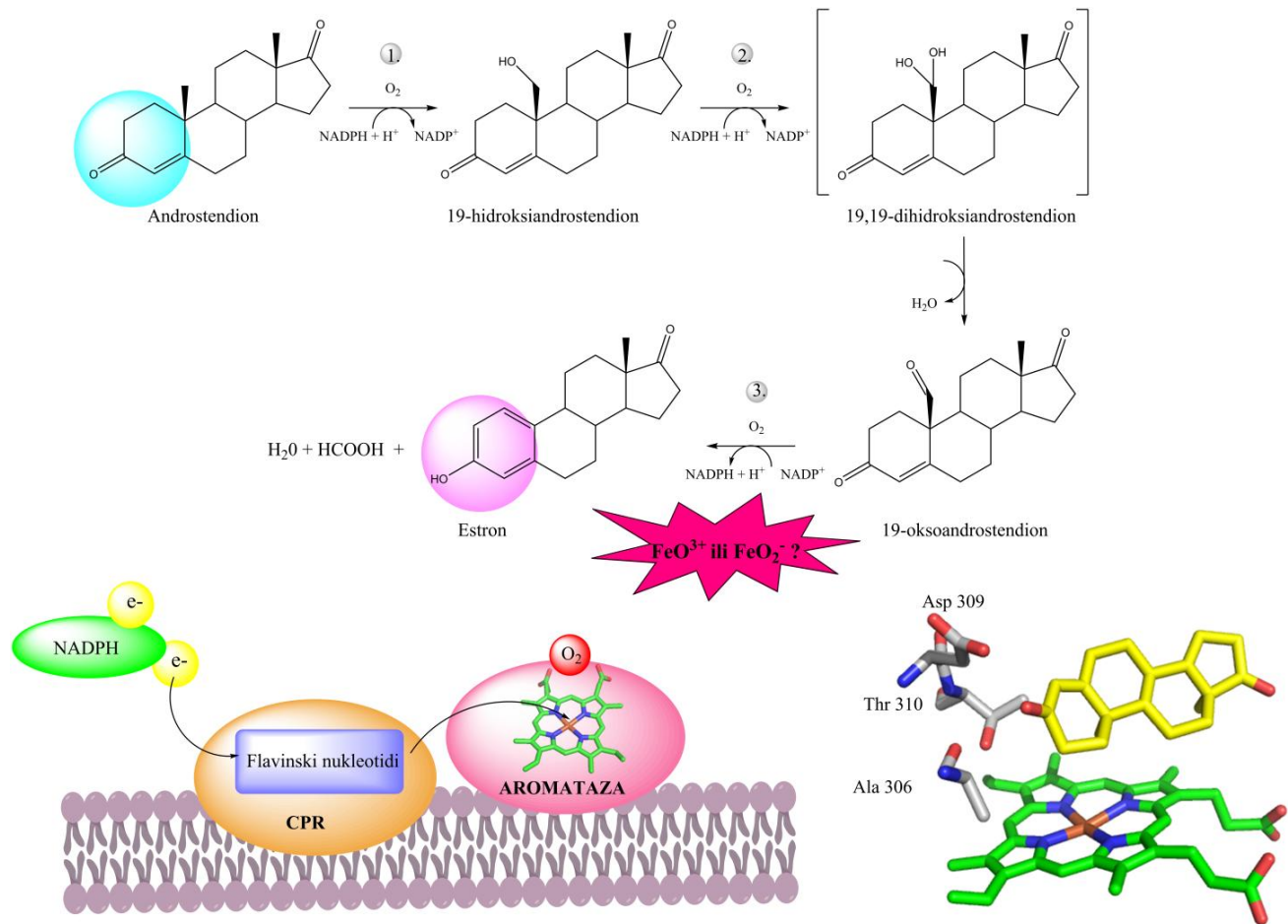
Reakcija katalizovana aromatazom obuvata tri faze, od kojih svaka zahteva po 1 mol NADPH i 1 mol O₂, kao i povezivanje sa CPR, komponentom kompleksa koja posreduje u prenosu elektrona sa donora na akceptor. Ono što aromatazu izdvaja od drugih članova CYP450 enzima je neuobičajeno raskidanje C19-C10 veze [137]. Konverzija androgena u estrogene se odvija i pri veoma niskim, nanomolarnim koncentracijama supstrata, što je posebno značajno kod lokalne sinteze u perifernim tkivima [138]. Aromataza formira kompleks sa transmembranskim proteinom CPR, sačinjenim od domena za vezivanje FAD i FMN, domena koji ih povezuje i regiona za vezivanje koenzima. Elektroni putuju od NADPH preko flavinskih nukleotida do hema, te na kraju do supstrata. Aromataza i CPR intereaguju preko hidrofobnih membranskih ostataka, a moguće su i interakcije između pozitivno i negativno naelektrisanih aminokiselinskih ostataka [132].

S obzirom na to da aromataza ispoljava najveći afinitet prema androstendionu [6], reakcija aromatizacije će biti objašnjena na primeru ovog molekula (**Slika 14**). Prvi korak podrazumeva uvođenje hidroksilne grupe u položaj C19, pri čemu nastaje 19-hidroksiandrostendion. Druga faza je takođe hidroksilacija u istom položaju i rezultuje nastankom 19,19-dihidroksi intermedijera, tj. *gem*-diola, čijom dehidracijom nastaje aldehid 19-oksoandrostendion. Poslednji korak obuhvata uklanjanje aldehidne grupe u vidu mravlje kiseline, praćeno aromatizacijom, a kao krajnji produkt nastaje estron [6,131]. Sethumadhavan i saradnici su pokazali da se usled narušenog odnosa količine CPR i aromataze u korist aromataze, reakcija ne odvija do kraja, pa može doći do nakupljanja 19-hidroksi i 19-oksoandrostendiona, koje je moguće izolovati [139]. Iako se intenzivno proučava, mehanizam aromatizacije androgena nije u potpunosti rasvetljen i najveće nedoumice unosi treći korak, pa je u literaturi moguće pronaći nekoliko predloženih mehanizama koji su, u zavisnosti od reaktivnih vrsta koje učestvuju (FeO₂⁻ ili FeO³⁺) podeljeni u dve grupe. Prvi elektron iz elektronskog para NADPH prenet preko CPR na aromatazu redukuje Fe³⁺ iz hem grupe do Fe²⁺, što je praćeno i vezivanjem O₂, pri čemu nastaje oksid Fe²⁺ kompleks, koji se preuzimanjem drugog elektrona prevodi u perokso Fe³⁺ intermedijer (FeO₂⁻) i dalje može podleći protonovanju i nastanku hidroperokso

Fe^{3+} intermedijera ili još jednom protonovanju i raskidanju O-O veze uz produkciju visoko reaktivnih vrsta (FeO^{3+}). Gantt i saradnici su izolovali perokso Fe^{3+} intermedijer aromataze, što sugerše njegovu ulogu u nukleofilnom napadu na C-19 [140].

Ghosh i saradnici su objavili da su aminokiselinski ostaci direktno uključeni u mehanizam delovanja aromataze: Ala306, Thr310 i Asp309. Oni su pretpostavili da aminokiselinski par Ala306 i Thr310 u blizini androstendiona svojim nukleofilnim karakterom učestvuje u eliminaciji H atoma sa 2β položaja androstendiona tokom 2,3 enolizacije. Nukleofilni karakter Ala306 je izražen zahvaljujući katalitičkom dejstvu molekula vode smeštenog između Thr310 i peroksi intermedijera (FeO_2^-). Uporedo teče i elektrofilni napad protonovanog bočnog niza Asp309 na 3-keto grupu supstrata. Predložena teorija u navedenom radu je da je eliminacija H atoma sa 1β položaja bliskog hemu najverovatnije posledica nukleofilnog napada Fe^{3+} peroksi (FeO_2^-) grupe na C-19 aldehidnu, pri čemu nastaju mravlja kiselina i estron [127].

Yoshimoto i Guengerich su 2014. godine opovrgnuli teoriju o nukleofilnom napadu FeO_2^- reaktivnih vrsta na C-19 aldehidnu grupu prilikom eliminacije H atoma sa 1β položaja. Oni su, na osnovu rezultata dobijenih u eksperimentima sa obeleženim kiseonikom, izneli teoriju da tu funkciju vrše FeO^{3+} vrste. Prečišćenom enzimu su dodali 19-deutero-19-oksoandrostendion i $^{18}\text{O}_2$, te, nakon analize dobijenih produkata masenom spektrometrijom, zaključili da nije došlo do ugrađivanja ^{18}O u mravlju kiselinu, što bi trebalo da se desi da je u pitanju mehanizam posredovan FeO_2^- jonom [137].

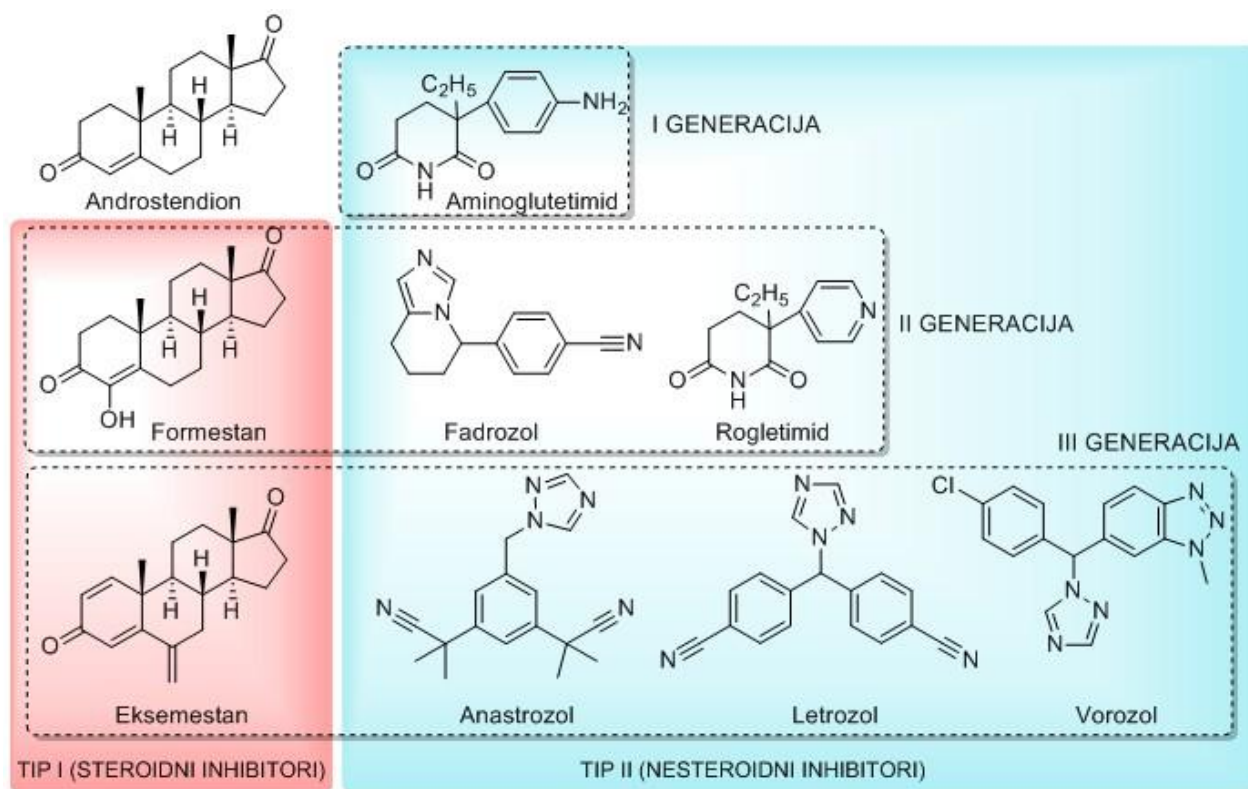


Slika 14. Pretpostavljeni mehanizam delovanja aromataze sa ilustracijom aromataza-CPR kompleksa i za mehanizam ključnih aminokiselinskih ostataka na bliskoj udaljenosti od supstrata.

2.3.3. Inhibicija aromataze

Inhibiranje proliferacije ćelija kancera dojke zavisnih od snabdevanja estrogenima kod žena u postmenopauzi, koje i čine najveću rizičnu grupu, osim ER antagonistima, može se postići i blokiranjem sinteze estrogena inhibitorima aromataze, imajući u vidu da se u tom periodu biosinteza estrogena dominantno odvija van polnih žlezda [15,141]. Ovaj terapijski pristup je efikasan isključivo kod žena sa smanjenom ili blokiranom funkcijom jajnika, dok se kod žena pre menopauze veoma retko primenjuje (samo uz inhibiciju oslobađanja gonadotropina) [142]. Ako se izuzme primarna primena, inhibicija aromataze može biti delotvorna i u lečenju endometrijalnog kancera, kancera jajnika [136], zatim ginekomastije, bolesti prostate, benignih tumora dojke [143], tumora Lajdigovih ćelija i preuranjenog puberteta [144].

Postoji nekoliko strategija u inhibiciji aromataze. Na osnovu strukturnih osobina i mehanizma dejstva, inhibitori aromataze se dele na steroidne (tip I) i nesteroidne (tip II), a prema redosledu odobravanja za kliničku upotrebu i pojavljivanja na tržištu na inhibitore prve, druge i treće generacije (**Slika 15**). Inhibitori tipa I su strukturno uglavnom veoma slični prirodnom supstratu aromataze, androstendionu. Vezuju se za aktivni centar enzima i prevode u reaktivne intermedijere, koji zajedno sa nukleofilnim grupama enzima grade kovalentnu vezu, nepovratno inhibirajući aromatazu sopstvenim delovanjem [15,143,145], zbog čega su poznati pod imenom „suicidni“, ireverzibilni ili „inhibitori zasnovani na mehanizmu“, jer menjaju mehanizam delovanja aromataze [6]. Upoređivanjem strukture i potentnosti različitih inhibitora utvrđeno je da su zbog veličine i kompaktnosti aktivnog centra aromataze u većini slučajeva dozvoljene samo male strukturne modifikacije u odnosu na prirodne supstrate, kako bi vezivanje i potencijal inhibitora bili što jači. Naime, čestu metu modifikacija predstavlja C-19 položaj zbog direktnog učešća u mehanizmu delovanja aromataze. Takođe i A i B prstenovi okupiraju pažnju istraživača, pa je tako uvođenjem 7 α -aril [6] ili 6 β -alkoksi/alkiniloksi grupa, koje se lako uklapaju u hidrofobni „džep“ aromataze, ostvarena inhibicija [136,144]. Ovaj tip inhibitora karakteriše visoka selektivnost i dugotrajna inhibicija (čak i nakon uklanjanja iz organizma) uz „oporavak“ sistema jedino sintezom novog enzima [6,133,143]. Selektivan inhibitor aromataze bi trebalo da poseduje hidrofobne grupe, koje će intereagovati sa alifatičnim ostacima aktivnog centra, kao i akceptor, koji će učestvovati u vodoničnom vezivanju sa ostatkom S478, ključnim u prve dve faze mehanizma delovanja, fazama hidrosilacije. Nedostaci steroidnih inhibitora su lako podleganje metaboličkim promenama delovanjem enzima iz iste familije [143] i uticaj na endokrini sistem tj. hormonska aktivnost zbog sličnosti sa strukturom androgenog supstrata [133]. Inhibitori tipa II su kreirani po uzoru na strukture pojedinih antifungalnih agenasa, inhibitora CYP450 enzima [144]. Uglavnom u svojoj nesteroidnoj strukturi sadrže heteroatome, najčešće N u okviru imidazolnog ili triazolnog sistema, pomoću kog se koordinativno vezuju za Fe iz hem prostetične grupe enzima. Imajući u vidu da i ostali CYP450 enzimi imaju hem grupu, nepoželjno nespecifično vezivanje nije retko kod ove klase inhibitora. Osim razlike u specifičnosti delovanja, nesteroidni inhibitori, za razliku od suicidalnih, inhibiraju enzim povratno (reverzibilno) i pokazali su veću potetnost [15,143,145].



Slika 15. Klasifikacija inhibitora aromataze; Androstendion-supstrat aromataze.

Generalni nedostatak svih inhibitora aromataze je taj što usled smanjenja koncentracije estrogena mogu dovesti do gubitka koštane mase, talasa vrućine i drugih simptoma hipoprodukcije estrogena. Kod prve generacije inhibitora najveći problem je bila unakrsna interakcija sa drugim putevima steroidogeneze, što je kod druge poboljšano, ali se javilo ograničenje u vezi sa slabom bioraspoloživosti leka nakon oralne administracije. Treća generacija inhibitora je prevazišla pomenute nedostatke i rezultovala vrlo specifičnim i potentnim klinički odobrenim inhibitorima [143]. Jedini steroidni predstavnik treće generacije odobren za kliničku upotrebu je eksemestan, dok su ostali nesteroidne strukture. Lombardi i di Salle su predložili nekoliko sintetskih pristupa u sintezi eksemestana, rukovodeći se ranijim otkrićima da je najveća inhibicija aromataze uočena kod derivata androstendiona sa 3-keto grupom i dvostrukom vezom u položaju 1,4 i/ili 6, te su uveli dodatnu dvostruku vezu i metilensku grupu na C-6 položaju androstendiona [146,147]. Mehanizam delovanja eksemestana je postuliran kao suicidalna inhibicija, zahvaljujući izostanku H-1 β atoma u strukturi zbog 1,2 dvostruke veze, usled čega ne dolazi do završne eliminacione reakcije kojom se regeneriše

enzim, tako da on praktično ostaje kovalentno vezan za inhibitor, čime je ireverzibilno inaktiviran [146].

Sve popularniji pristup lečenju hormonski zavisnih bolesti je kombinacija inhibicije dva ciljna enzima istovremeno. U slučaju ER+ kancera dojke dvojni inhibitori aromataze i steroid sulfataze, enzima koji katalizuje konverziju sulfonovanih steroida u biološki aktivne, su se pokazali vrlo uspešnim. Efikasni dvojni inhibitori su nastali uvođenjem aril-sulfamatne farmakofore u poznate inhibitore aromataze ili obrnuto, uvođenjem heterocikličnog prstena koji se vezuje za hem u poznate inhibitore steroid sulfataze [148].

Kako priroda često nađe put u tretmane različitih bolesti, i ovde treba uzeti u obzir antiaromataznu aktivnost jedinjenja prirodnog porekla, koji, iako manje potentni od sintetskih, imaju manje neželjenih dejstava. Fitoestrogeni mogu ispoljiti antiaromataznu aktivnost na dva načina-inhibicijom samog enzima ili uticajem na ekspresiju *CYP19A1* gena kao i kombinacijom oba pristupa. Flavonoidi, izoflavonoidi i stilbestani su klase biomolekula biljnog porekla koje su pokazale umerenu do jaku inhibitornu aktivnost prema aromatazi delujući putem oba mehanizma [18].

2.3.4. Odabrane metode za ispitivanje aktivnosti aromataze

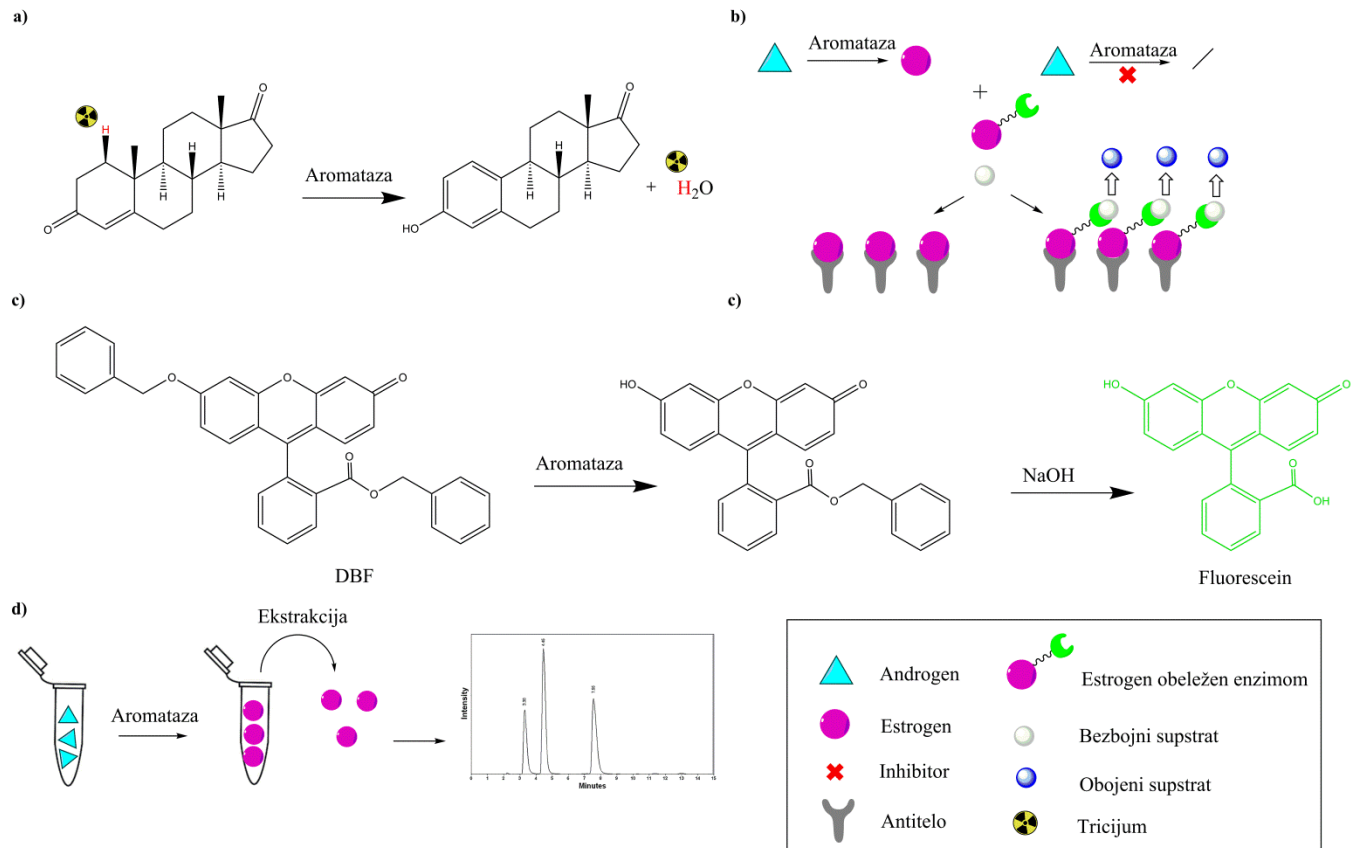
Eksperimentalne metode za određivanje aktivnosti aromataze su od esencijalnog značaja za ispitivanje njenih inhibitora sa potencijalnim terapijskim svojstvima i ovde će biti opisano nekoliko različitih metodoloških pristupa radi boljeg razumevanja razvoja i optimizacije metode koja je bila predmet ove doktorske disertacije.

Lephart i Simpson su razvili brz i jednostavan *in vitro* radioaktivni test za ispitivanje aktivnosti aromataze zasnovan na oslobađanju vode obeležene tricijumom (**Slika 16.a**). Voda obeležena tricijumom se oslobađa stereospecifičnom apstrakcijom ^3H atoma sa 1β položaja radioaktivnog supstrata, [$1\beta\text{-}^3\text{H}$] androstendiona, u poslednjoj fazi reakcije katalizovane dejstvom aromataze, istovremeno sa nastankom estrogenog produkta. Nakon razdvajanja faza aktivnim ugljem ili drugim adsorbensom radioaktivnost vodene faze se detektuje scintilacionim brojačem i proporcionalna je stepenu konverzije androgena u estrogene, tj. aktivnosti aromataze [18]. Ovaj test pokazuje izvesne nedostatke kada se primenjuje na sisteme u ćelijama ili tkivima, jer delovanjem pojedinih enzima može takođe doći do oslobađanja vode i lažno povišene aktivnosti aromataze. U cilju prevazilaženja ovog problema i bojazni da se ne ugrađuje svaki 1-H atom supstrata u oslobođeni molekul vode, Tanwell i saradnici su predložili detekciju glavnog

estrogenog produkta radioimunološkim testom umesto detekcije vode, kao sporednog produkta. Međutim, radioaktivne metode imaju bezbednosno ograničenje zbog korišćenja i odlaganja štetnog radioaktivnog materijala, te se javila potreba za unapređivanjem istraživanja razvojem alternativnih neradioaktivnih metoda [149].

Matsui i saradnici su za ispitivanje inhibitora aromataze primenili neradioaktivan kompetitivan enzimski imunoadsorpcioni test (*engl.* enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) (**Slika 16.b**). Osnova ove imunološke metode je visoko specifična interakcija između antitela i antigena koja se detektuje spektrofotometrijski, zahvaljujući konverziji bezbojnog supstrata u obojeni produkt dejstvom enzimskog markera. Estrogen nastao delovanjem aromataze i markerom obeležen estrogen se „takmiče“ za vezivanje za antitela usmerena ka ovom hormonu. Ukoliko je aromataza aktivna, za antitela će se u većoj meri vezivati njen prirodni produkt, neobeleženi estrogen, dok će se u suprotnom, u slučaju inhibicije aromataze, više vezivati enzimom obeleženi estrogen. Intenzitet apsorbance kod ovog testa je obrnuto srazmeran koncentraciji nastalog estrogena, odnosno aktivnosti aromataze [150].

Stresser i saradnici su radioaktivnost zamenili fluorescencijom, razvojem testa koji je ponovljiv, jednostavan, jeftin i pogodan za testiranje velikog broja uzoraka odjednom. Delovanjem aromataze dolazi do debenzilovanja dibenzilfluoresceina (DBF) i nastanka fenolnog intermedijera, koji se u baznoj sredini kovertuje u fluorescentni produkt, fluorescein (**Slika 16.c**) [151] sa talasnom dužinom ekscitacije 485 nm, a emisije 530 nm. Intenzitet rezultujuće fluorescencije je direktno srazmeran aktivnosti aromataze [21]. S obzirom na to da DBF nije prirodan supstrat, ovaj test takođe ima ograničenja, pa je ipak predložena upotreba prirodnih supstrata i metode izolacije produkata hromatografskim tehnikama [152] (**Slika 16.d**). Nakon inkubacije smeše aromataze, supstrata i koenzima sledi ekstrakcija steroidnih produkata organskim rastvaračem, hromatografsko razdvajanje i finalna karakterizacija i kvantifikacija [19,153]. Na kraju, za ispitivanje inhibitora aromataze Zhou i saradnici su transfekcijom MCF-7 ćelija ekspresionim vektorom koji sadrži cDNK humane aromataze generisali novu ćelijsku liniju sa povećanom ekspresijom ovog enzima, MCF-7aro [20], dok su Li i saradnici generisali transgenog AROM+ miša [154].



Slika 16. Metode za određivanje aktivnosti aromataze: a) Radioaktivni test oslobađanja tricijumom obeležene vode b) Kompetitivni ELISA test c) Fluorescentni test sa DBF kao supstratom d) Metoda izolacije produkta.

2.3.4.1. Rekombinantna ekspresija aromataze

Kao izvor aromataze u eksperimentima često se koriste placentalni mikrozomi (humani, svinjski, goveđi), granuloza ili folikularne ćelije jajnika različitih organizama i ćelijske linije adrenokortikalnog (H295R) ili horiokarcinoma (JEG-3) [153,155]. Prednost ćelijskih linija sisara u odnosu na humane placentalne mikrozome je što nisu potrebna posebna odobrenja etičke komisije i što omogućavaju dobijanje podataka o uticaju ispitivanog jedinjenja na ekspresiju aromataze, dok su nedostaci prisustvo drugih metabolišućih CYP450 enzima i potencijalna citotoksičnost jedinjenja koja se testiraju [153]. Zahvaljujući poznavanju cDNK humane placentalne aromataze, alternativan izvor aromataze predstavlja rekombinantna ekspresija u različitim sistemima-ćelijama insekata (Hi5 i Sf9), kvasaca ili bakterija, pri čemu je najviši nivo ekspresije uočen u prvom ekspresionom sistemu. Enzimi ekspimirani na ove načine su pokazali veću aktivnost u odnosu na one iz humanih placentalnih mikrozoma [153,155]. Komercijalno dostupan rekombinantni protein olakšava i ubrzava eksperiment, ali iz ekonomskih razloga mnogi istraživači se ipak opredeljuju da kloniraju, ekspimiraju u odgovarajućem domaćinu i

prečiste željeni protein. Tehnologija rekombinantne DNK je unela ogroman napredak u biološka istraživanja. Ona obuhvata skup eksperimentalnih metoda kojima se kreira, a potom umnožava željeni rekombinantni molekul u izabranom prokariotskom ili eukariotskom domaćinu. Prva faza predstavlja kloniranje željenog gena ubacivanjem u odgovarajući vektor, zatim sledi unošenje i umnožavanje rekombinantnog DNK molekula u izabranom model organizmu, pa indukcija ekspresije kloniranog gena, pri čemu se sintetiše željeni rekombinantni protein. Nakon heterologne ekspresije, izolovanja i prečišćavanja, protein je spreman za različite biohemijske studije: ispitivanje aktivnosti, vezivanja liganda, inhibitora itd. [156,157].

Kada je reč o heterolognoj ekspresiji aromataze u bakterijama, otežavajuća okolnost je hidrofobni karakter i nestabilnost ovog membranskog proteina, zbog čega je u toku prečišćavanja neophodno koristiti deterdžente, kao i prirodni supstrat, koji bi stabilizovao njegovo pravilno savijanje. Kagawa i saradnici su u cilju povećanja rastvorljivosti i stabilnosti enzima modifikovali N terminalni deo sekvence aromataze, odgovoran za vezivanje (usidravanje) za membranu (*engl.* anchoring) [158]. Sličnim pristupom, Nardo i saradnici su zamenili 39 N-terminalnih aminokiselinskih ostataka sa 10 hidrofilnih, pozitivno naelektrisanih, ekspresiju ovako modifikovane aromataze izvršili u *Escherichia coli* DH5 α soju i uspešno dizajnirali i razvili protokol za prečišćavanje stabilne aromataze u odsustvu liganda [159]. S obzirom na to da *Escherichia coli* ne sadrži CPR, mnoge istraživačke grupe radije vrše rekombinantnu ekspresiju CYP450 enzima u *Saccharomyces cerevisiae*, domaćinu koji sadrži ovaj sistem za transfer elektrona, dok je endogeni nivo CYP450 enzima kvasca-domaćina zanemarljiv [160,161]. Aktivnost heterologno eksprimiranih CYP450 enzima u kvascu se pokazala niskom zbog ograničene količine kvaščeve CPR i citohroma b5. Međutim, ovaj problem je prvobitno prevaziđen koekspresijom oba enzima na istom plazmidu, što zahteva novo kloniranje za svaki CYP450-CPR par. Da bi to prevazišle, grupe predvođene Truan-om i Urban-om su kreirale set sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* sa pojačanom ekspresijom kvaščeve ili humane CPR, integracijom specifičnih sekvenci u genom WN domaćina. Osim inducibilnih promotora, integrisane su i sekvence pozadinskih oksido-redukcionih proteina, neophodnih za prenos elektrona sa supstrata na CYP450 enzime. Aktivnost različitih CYP450 enzima u ovim modifikovanim sojevima je značajno povećana u poređenju sa divljim tipom zahvaljujući optimizovanoj redoks okolini, a velika olakšica je i to što kod ovakvog sistema nisu neophodne dodatne enzimske komponente i koraci prečišćavanja [162,163].

2.3.5. Odabrane metode za detekciju vezivanja liganada za CYP450 enzime

Vezivanje liganada indukuje konformacione promene enzima, omogućujući širok opseg metoda za izučavanje ovih interakcija praćenjem promena u fleksibilnosti proteina [159]. Za ispitivanje ovih interakcija u slučaju CYP450 enzima dostupne su različite eksperimentalne biohemijske i biofizičke metode [164]. Izučavanje načina vezivanja liganada za enzime ove familije daje odgovor na pitanje kakva je specifičnost liganada za odgovarajući enzim, da li je vezivanje kooperativno, kojim mehanizmom deluje ispitivano jedinjenje, a omogućava i bolje razumevanje funkcije samog enzima i njegovih ligand-vezujućih domena [165], kao i načina inhibicije [166].

CYP450 enzimi, kao hem-tiolatni proteini, imaju prednost u odnosu na druge enzime kada je izbor metoda u pitanju, zahvaljujući spektroskopskom potencijalu hem prostetične grupe. Naime, nakon vezivanja liganada može doći do promene spinskog stanja Fe iz hem grupe, što značajno utiče na funkciju enzima i detektibilno je različitim spektroskopskim metodama [167]. Dva klasična načina ponašanja liganada u interakciji sa CYP450 enzimom su istiskivanje ili zamena aksijalnog molekula vode, vezanog za Fe hema u odsustvu supstrata [168]. ApSORPCIONA spektroskopija je brza i jednostavna spektroskopska metoda, te se stoga često koristi u ispitivanju samih hemoproteina, kao i pojedinačnog vezivanja liganada za njih. Elektronskom paramagnetnom rezonancom (EPR) se takođe pouzdano određuje elektronsko okruženje hema [165] i promene spinskog stanja Fe uzrokovane interakcijom enzima i liganada. U kombinaciji obe navedene metode se koriste kada se radi o kompleksnijem višestrukome vezivanju liganada [167,169]. Pomoću EPR je u novijim studijama pokazano da, osim dva klasična načina vezivanja liganada za CYP450 enzime, postoje i slučajevi gde ligand ostvaruje vodoničnu vezu sa aksijalnim molekulom vode [168]. Strukturne karakteristike hema i njegovih aksijalnih liganada mogu se odrediti i Ramanovom spektroskopijom. Mak i saradnici su primenom ove metode ispitali vezivanje androgenih intermedijera za aromatazu u cilju dešifrovanja njenog zagonetnog mehanizma delovanja [170].

Sa druge strane, kada se interakcija liganada i CYP450 enzima ne ispoljava promenom spinskog stanja, neophodna je metoda zasnovana na drugačijem principu, a opet jednostavna, brza, selektivna i ekonomski prihvatljiva. Ako se izuzmu *in silico* metode, takva je fluorescentna spektroskopija. Ova metoda je bazirana na fluorescentnim osobinama liganada ili ostataka Trp i/ili Tyr u aktivnom centru CYP450 enzima, čija fluorescencija je osetljiva na promene okoline koje

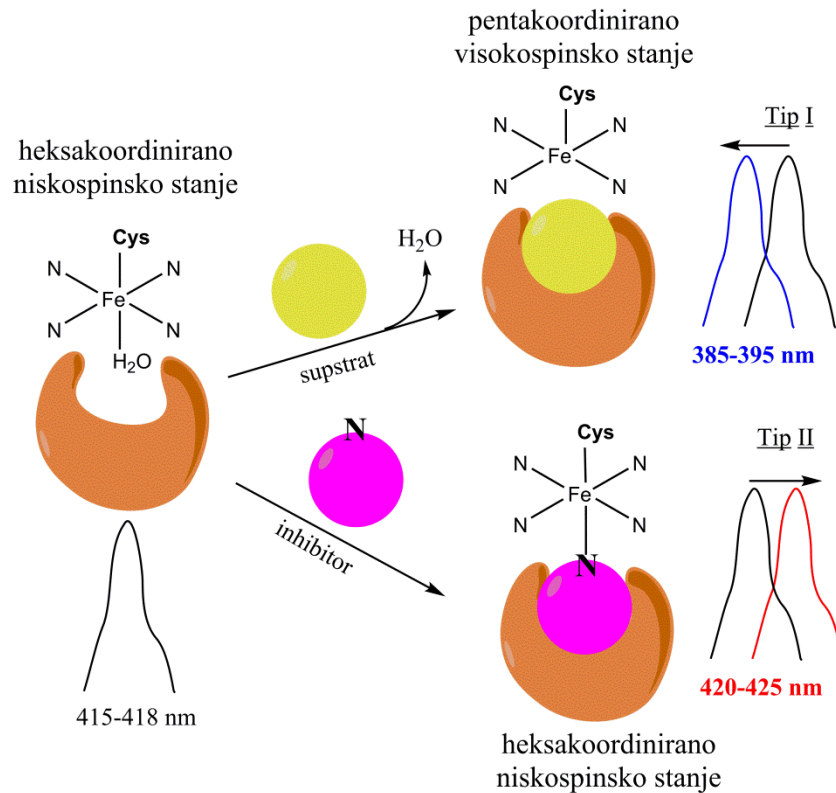
su posledica vezivanja supstrata za enzim [165,171]. Apsorpciona i fluorescentna spektroskopija, osim preliminarne identifikacije potencijalnih liganada, omogućavaju određivanje njihovog afiniteta vezivanja preciznim određivanjem konstanti disocijacije (K_d) titracijom [165]. Još jedna vrlo moćna tehnika za praćenje protein-ligand interakcija, nuklearna magnetna rezonantna spektroskopija (NMR), zasnovana je na praćenju hemijskih pomeranja (*engl.* chemical shift) atoma određenih aminokiselinskih ostataka u magnetnom polju. Oprema za ovu tehniku je veoma skupa i priprema uzorka zahteva obeležavanje proteina izotopima nekih atoma [165]. Osim navedenih metoda koristi se i infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (*engl.* Fourier-transform infrared spectroscopy, FTIR) kojom je moguće pratiti promene elemenata sekundarne strukture CYP450 enzima nakon vezivanja liganda [159].

2.3.5.1 Apsorpciona spektroskopija

Zahvaljujući prisustvu hem prostetične grupe i njenim apsorpcionim osobinama kod CYP450 enzima apsorpciona spektroskopija se nameće kao jednostavna metoda za određivanje interakcija sa ligandima [164]. Grupe predvođene Maurelli-em, Nardo-m i Baravelle-om su na taj način obezbedile eksperimentalne dokaze vezivanja supstrata, androstendiona, i inhibitora, anastrozola i sildenafilila, za aromatazu [134,159,169,172]. Metoda se zasniva na promeni oksidacionog i koordinacionog stanja Fe iz hema nakon interakcije sa ligandom, što se detektuje na osnovu promene talasne dužine apsorpcionog maksimuma, tj. Soretovog pika, karakterističnog pika koji se javlja u plavoj oblasti spektra. Sam naziv familije enzima, CYP 450, potiče upravo od talasne dužine karakteristične za apsorpcioni maksimum njegovog redukovano oblika u kompleksu sa CO, 450 nm. U odsustvu liganda u oksidovanom stanju apsorpcioni maksimum je u opsegu 415-418 nm, a u redukovanom 407-409 nm [164].

U zavisnosti od načina vezivanja liganda za enzim, tipične promene spektra do kojih dolazi se označavaju kao promene tipa I i tipa II (**Slika 17**) [165]. Kod promena tipa I vezivanje supstrata u aktivnom centru istiskuje molekul vode (šesti ligand), pri čemu Fe iz hem grupe postaje pentakoordinirano, prelazi iz niskospinskog u visokospinsko stanje i u apsolutnom spektru dolazi do značajnog pomeranja Soretovog pika u levo, na 385-395 nm [164,165]. Ovaj oblik enzima je dostupan za delovanje reduktaze i početak reakcije aromatizacije. Pored vezivanja supstrata, do nagomilavanja visokospinske forme može doći i usled vezivanja nekih inhibitora koji blokiraju aktivni centar, ali bez direktnog kontakta sa Fe [166]. Za analizu i poređenje se češće umesto apsolutnog koristi diferencijalni spektar, koji predstavlja razliku

između apsopcionog spektra enzima u odsustvu i nakon vezivanja liganda, jer je osetljiviji i može pružiti uvid i u vezivanja liganada sa niskim afinitetom [168,173]. Diferencijalni spektar ovakvog načina vezivanja karakteriše maksimum na oko 390 nm i minimum na približno 418 nm [165].



Slika 17. Princip određivanja CYP450-ligand interakcija apsorpcionom spektroskopijom.

Sa druge strane, do pomeranja apsorpcionog maksimuma u desno, ka crvenom delu spektra, na 420-425 nm dolazi usled vezivanja jedinjenja koja uglavnom imaju inhibitorni potencijal [164]. U strukturi često sadrže atom azota (u okviru imidazolne, triazolne ili piridinske funkcionalne grupe), preko kog se vezuju koordinativno za Fe iz hem grupe ili indirektno preko molekula vode [164,166]. Vezivanjem za Fe umesto šestog liganda stabilizuju njegovo heksakoordinirano niskospinsko stanje i onemogućuju delovanje CPR [166], kao i vezivanje kiseonika, inhibirajući na taj način enzim i sprečavajući početak reakcije aromatizacije [173]. U ovom slučaju minimum diferencijalnog spektra se javlja na oko 410 nm, a maksimum na oko 434 nm [166]. Pojedini ligandi ovog tipa mogu delovati i kao supstrati [173]. Osim pomenutih spektralnih promena, postoje i izuzeci koji se ne uklapaju u ovu poddelu, poput supstrata reverznog tipa I, koji ima diferencijalni spektar obrnut diferencijalnom spektru tipa I, sa

minimumom na 390 nm umesto maksimuma, dok ostatak spektra liči na onaj kod tipa II, osim što je pomeren ka crvenoj oblasti [166,168]. Ovom tipu često pripadaju ligandi koji ne sadrže N, već neki drugi heteroatom [168].

2.3.5.2. Fluorescentna spektroskopija

Kada u izolaciji CYP450 enzima preovlada visokospinski oblik ili kada vezivanje liganda nema uticaja na hem, umesto apsorpcione može se primeniti još osetljivija fluorescentna spektroskopija upotrebom fluorescentnog liganda ili određivanjem unutrašnje fluorescencije proteina [165]. Unutrašnjoj, sopstvenoj fluorescenciji proteina doprinose aromatične aminokiseline, u najvećoj meri tirozin i triptofan, zahvaljujući delokalizovanim π -elektronima benzenovog i indolnog prstena, respektivno. Na talasnoj dužini od 280 nm obe aminokiseline su pobuđene, dok se selektivna ekscitacija samo Trp ostataka, koji pokazuju veći intenzitet fluorescencije, postiže na 295 nm, a emisija na 350 nm [174]. Fenilalanin ima slabiji signal, pa nije pogodan za eksperimentalno određivanje, a fluorescencija tirozina može biti smanjena zbog interakcija sa nekim grupama peptidnog lanca [175].

Fluorescentni emisioni spektar triptofana je veoma osetljiv na promene u okolini, do kojih dolazi usled konformacionih promena proteina, vezivanja liganda, promena u organizaciji podjedinica ili denaturacije i odvijanja proteina [175]. Fluorescentna spektroskopija je neizostavna metoda u studijama koje se bave vezivanjem liganada zbog svoje velike osetljivosti, robustnosti i neinvazivnog karaktera [175,176]. Fluorescencija Trp je osetljiva na polarnost okolnih grupa: kod savijenog proteina ovi ostaci smešteni su u hidrofobnoj unutrašnjosti, njihov intenzitet fluorescencije je visok, a emisioni spektar pomeren ka nižim talasnim dužinama [174,175]. Fluorescentni emisioni spektar Trp ostataka u aktivnom centru je pomeren za 10-20 nm ka nižim talasnim dužinama u odnosu na one na površini proteina [177]. Suprotno, usled promena u strukturi proteina nakon vezivanja liganda ili iz drugog razloga, ove aminokiseline izlaze na površinu i više nisu zaklonjene od rastvarača, što uzrokuje gašenje fluorescencije (*engl.* fluorescence quenching) [174,175]. Eksperimentima u kojima se prati gašenje fluorescencije, osim dostupnosti Trp ostataka [178] i strukturnih promena u proteinu [179], moguće je odrediti i afinitet ispitivanog liganda za vezujuće mesto [165]. Prednost ove metode je što kod proteina koji poseduju Trp ostatak u strukturi, posebno u aktivnom mestu, nije neophodno dugotrajno fluorescentno obeležavanje kao kod drugih fluorescentnih tehnika, a izostaje i problematična pozadinska fluorescencija koja može poticati od različitih komponenata i/ili metabolita kada se

radi sa ćelijskim linijama [176]. Ova metoda je pogodna za analiziranje velikog broja uzoraka, što je još jedna njena prednost [177].

Procentualno membranski proteini sadrže više ostataka Trp u odnosu na one u citoplazmi [176]. Aromataza sadrži pet ostataka Trp u svojoj strukturi, od kojih je jedan Trp224 u aktivnom centru i učestvuje u Van der Valsovim interakcijama sa supstratom. Nardo i saradnici su ispitali vezivanje androstendiona i anastrozola za aromatazu fluorescentnom spektroskopijom, uporedili oblik fluorescentnog emisionog spektra divljeg tipa aromataze i mutiranog Trp224Phe, pri čemu je prvi pokazao značajne promene nakon interakcije sa supstratom ili inhibitorom, za razliku od mutiranog, upućujući na značaj Trp224 ostatka u vezivanju liganada [159].

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije predstavljaju steroidni receptori i steroidogeni enzim aromataza, kao aktuelne mete u lečenju hormonski zavisnih bolesti i stanja. Fokus disertacije bio je na razvoju i optimizaciji bioloških testova za identifikaciju liganada odabranih steroidnih receptora i aromataze, kao i za ispitivanje aktivnosti ovog enzima, a sve u cilju otkrivanja farmakološki potentnih jedinjenja.

Prvi specifičan cilj bio je usmeren na razvoj i optimizaciju visoko specifičnog, ponovljivog i široko primenljivog testa za ispitivanje afiniteta vezivanja prirodnih i sintetskih liganada za steroidne receptore korišćenjem kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, model organizma sa ogromnim potencijalom. Ovim testom bi se eliminisali zagađenje okoline i opasnost po zdravlje usled upotrebe radioaktivnih supstrata. Velike prednosti kvasca, kao model sistema za ispitivanje procesa u eukariotskim ćelijama su, osim brzog i jednostavnog gajenja u laboratoriji, još i to, što u kvascima ne postoje nuklearni receptori i aromataza, niti se sintetišu estrogeni hormoni, što ga čini „čistim“ sistemom za planirana istraživanja. Osnovna ideja je bila unaprediti fluorescentni ćelijski test koju su razvili Muddana i Peterson [80] povećanjem njegove osetljivosti i selektivnosti, a primenu proširiti na ispitivanje afiniteta vezivanja novosintetisanih steroidnih derivata [180] i fitoestrogena za odabrane steroidne receptore. Takođe, imajući u vidu da mnoge biljke obiluju fitoestrogenima, jedan od zadataka bi bio usmeren na primenu optimizovanog testa u proceni estrogenog potencijala ekstrakata odabranih biljnih vrsta. Da bi se upotpunili rezultati, pojedina jedinjenja koja bi u fluorescentnom testu pokazala značajnu biološku aktivnost dalje bi bila podvrgnuta ispitivanju antiproliferativnog potencijala prema odabranim ćelijskim linijama humanih kancera, kao i kontrolnoj zdravoj ćelijskoj liniji. Dodatno, radi preciznijeg utvrđivanja strukturne osnove vezivanja, odnosno položaja molekula u aktivnom centru proteina, planirana je i *in silico* analiza kompleksa protein-ligand. Korelacijom rezultata različitih testova zamisao je bila omogućiti bolje razumevanje mehanizma delovanja ispitivanog jedinjenja.

Imajući u vidu važnost inhibicije aromataze u tretmanu estrogen-zavisnog kancera dojke i drugih reproduktivnih tkiva, drugi specifičan cilj doktorske disertacije bio je usmeren na razvoj i optimizaciju testa za ispitivanje aktivnosti ovog enzima i identifikaciju potencijalnih liganada među jedinjenjima iz baze modifikovanih steroida. S obzirom na to da je za aktivnost aromataze, kao CYP450 enzima, neophodno prisustvo NADPH-zavisne CPR, prvobitna ideja je bila

eksprimirati humanu aromatazu u kvascu sa pojačanom ekspresijom reduktaze, pri čemu bi bio korišćen jedan model sistem. Međutim, zbog potencijalnih problema sa respiracijom ovih sojeva, alternativni cilj bi bio razvoj testa za određivanje aktivnosti aromataze, pri čemu bi kao izvor enzima bila korišćena rekombinantna aromataza iz *Escherichia coli*, dok bi reduktaza bila izolovana iz domaćina *Saccharomyces cerevisiae*. Pored potvrde enzimske aktivnosti u ovom kuplovanom sistemu, cilj bi bio optimizovati i uslove pod kojima bi se moglo proceniti vezivanje potencijalnih liganada za aromatazu, a nakon toga, kombinacijom ovih testova, identifikovati nove inhibitore.

4. EKSPERIMENTALNI DEO

U Eksperimentalnom delu ove doktorske disertacije opisane su biohemijske i molekularno-biološke metode korišćene tokom razvoja testova za identifikaciju i kvantifikaciju vezivanja liganada za steroidne receptore, kao i za merenje aktivnosti aromataze bez i uz prisustvo inhibitora. Pored uspešno optimizovanih protokola navedeni su i pojedini koji nisu dali očekivane rezultate, ali su doprineli boljem razumevanju optimalnih uslova za izvođenje testa. Zajedno sa eksperimentalnim procedurama, ovo poglavlje daje informacije i o sojevima bakterija i kvasaca koji su korišćeni kao model organizmi, medijumima za njihov rast, vektorima, kao i informacije o panelu ispitivanih jedinjenja. Radi bolje preglednosti podataka sastav reakcionih smeša i čvrstih i tečnih medijuma je prikazan u formi tabela.

4.1. Sojevi bakterija i kvasaca i plazmidni konstrukti

Laboratorijski soj *Escherichia coli* DH5 α korišćen je za transformaciju, umnožavanje i prečišćavanje plazmidne DNK, kao i za ekspresiju CYP450 enzima, aromataze, pod kontrolom Tac promotora. Za optimizaciju fluorescentnog ćelijskog biosenzora korišćen je *Saccharomyces cerevisiae* FY250 soj i plazmidni konstrukti sa odgovarajućom LBD-YFP sekvencom dobijeni na poklon od dr Blake-a Petersona (Univerzitet u Kansasu, Kansas), dok je *Saccharomyces cerevisiae* sojeve sa optimizovanim redoks okolinama pogodne za ekspresiju CYP450 proteina, W(R), W(hR) i BY2R, i vektore za ekspresiju u navedenim kvascima, pYeDP60 i pYeDP60 His, ljubazno ustupio dr Gilles Truan (Nacionalni institut primenjenih nauka u Tuluzu, Francuska). Plazmidne konstrukte za heterolognu ekspresiju aromataze u *Escherichia coli* su velikodušno poklonili dr Gianfranco Gilardi (Univerzitet u Torinu, Italija) (pCWori+ Arom) i dr Norio Kagawa (Univerzitet u Nagoji, Japan) (2cAr-pET), dok je dr Anđelka Ćelić (Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet) uspešno izvršila kloniranje gena za aromatazu iz vektora koji je poklonio dr Kagawa u vektor za ekspresiju u kvascima (pRS425-Arom). U **Tabeli 2.** su navedeni sojevi i plazmidni konstrukti korišćeni u toku izrade ove doktorske disertacije, kao i osnovni podaci o njima.

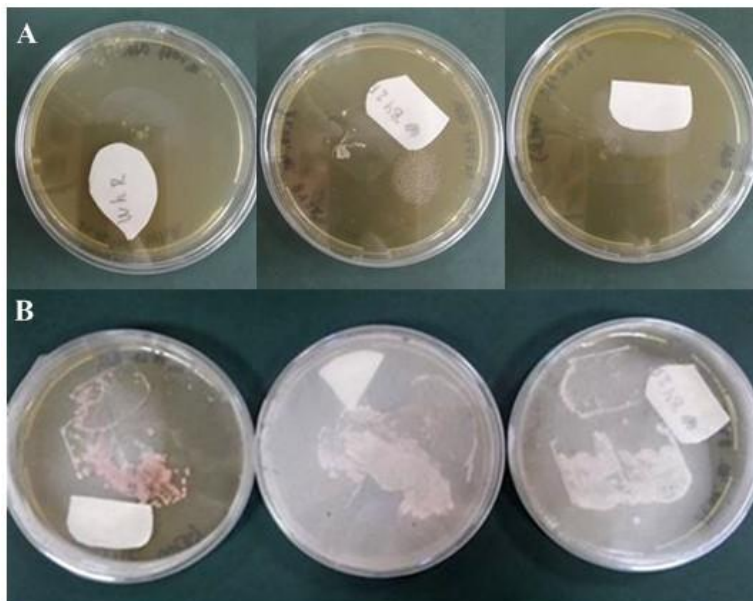
Tabela 2. Opšte informacije o korišćenim bakterijskim/kvašćevim sojevima i plazmidnim konstruktima.

Soj	Genotip	Napomena	Plazmidni konstrukt	Rezistentnost	Selektivni marker	Napomena
<i>Escherichia coli</i>						
DH5 α	<i>F⁻ ϕ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 en dA1 hsdR17(r\bar{K}, m\bar{K}⁺) phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1)</i>	/	2cAr-pET (pET-17b)	Ampicilin	/	T7 promotor 4xHis tag
			pCWori+ Arom	Ampicilin	/	Tac promotor 4xHis tag
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>						
FY250	MAT α , <i>ura3-52</i> , <i>his32Δ00</i> , <i>leu2Δ1</i> , <i>trp1Δ6</i>	/	pRF4-6- hER α LBD- EYFP	Ampicilin	<i>TRP1</i>	GAL1 promotor
W(R)	<i>ura3</i> , <i>his3</i> , <i>ade2</i> , <i>trp1</i> , <i>leu2</i>	Kvašćeva CPR pod kontrolom GAL10-CYC1 hibridnog promotora	pRF4-6- hER β LBD- EYFP	Ampicilin	<i>TRP1</i>	GAL1 promotor
W(hR)	<i>his3</i> , <i>ade2</i> , <i>trp1</i> , <i>leu2</i>	Humana CPR pod kontrolom GAL10-CYC1 hibridnog promotora	pRF4-6-hAR LBD-EYFP	Ampicilin	<i>TRP1</i>	GAL1 promotor
BY2R	<i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>met15</i>	Kvašćeva CPR pod kontrolom GAL10-CYC1 hibridnog promotora, dodatna kopija divljeg tipa kvašćeve CPR u genomu	pRS425-Aro	Ampicilin	<i>LEU2</i>	GAL1 promotor

4.1.1. Ekstrakcija plazmida i kvasaca sa papira

Kako je većina sojeva kvasaca i plazmida dobijena na poklon od drugih istraživačkih grupa i transportovana na papiru, bilo je neophodno izvršiti njihovu ekstrakciju. Sterilisanim makazama je isečeno označeno mesto nanošenja plazmida i izvršena ekstrakcija sa 30 μ l EB pufera (za sastav pogledati **Tabelu 13**) ili sterilne H₂O, 1 h na sobnoj temperaturi. Sadržaj je zatim centrifugiran 3 min na 13400 x g i izvršena je transformacija DH5 α bakterija ekstrahovanim plazmidom da bi se obezbedile dovoljne količine za buduće eksperimente. Kvasci

su takođe dopremljeni na papiru, umotani u sterilnu aluminijumsku foliju. Zona papira sa ćelijama je isečena u sterilnim uslovima i postavljena na prethodno temperirane YPD podloge (za sastav pogledati **Tabelu 3**) uz nanošenje nekoliko kapi sterilne H₂O kako bi se osigurao kontakt ćelija sa hranljivom podlogom. Tokom trodnevne inkubacije na 30°C svakog dana je sterilnom pincetom papir pažljivo premešten na drugo mesto na podlozi u cilju širenja kolonija (**Slika 18**). Sposobnost ovih sojeva da vrše oksidativnu fosforilaciju je ispitana zasejavanjem ćelija na iste podloge, ali sa glicerolom kao izvorom ugljenika umesto glukoze, s obzirom na to da je ćelijama sa oštećenjem ovog metaboličkog puta onemogućen rast na nefermentabilnom izvoru ugljenika.



Slika 18. Ekstrakcija *Saccharomyces cerevisiae* W(hR), BY2R i W(R) sojeva sa papira prvog (A) i trećeg (B) dana inkubacije na 30°C na YPD podlogama.

4.2. Medijumi i podloge za rast bakterija i kvasaca

Nutritivni zahtevi bakterija i kvasaca za rast su vrlo jednostavni. Minimalni elementi obuhvataju izvor ugljenika u obliku različitih šećera, čijim metabolizmom se oslobađa energija u vidu adenozin trifosfata (ATP), i izvor azota, kao prekursora sinteze aminokiselina, uz dodatak ostalih komponenata, poput različitih vrsta soli. Osim u kulturama u tečnom medijumu, ovi mikroorganizmi se lako uzgajaju i u Petri posudama na površini polučvrstih podloga od polisaharida, agara [181].

Tokom kultivacije bakterija i kvasaca korišćeni su sterilisani medijumi i hranljive podloge, opisane u **Tabeli 3**. Kao izvor azota upotrebljeni su tripton, dobijen digestijom kazeina,

i pepton, proteinski hidrolizat iz mesa, dok je ekstrakt kvasca bogat kompleksom vitamina B takođe dodat u cilju stimulacije rasta ćelija bakterija i kvasaca. Pored kompletnih medijuma i podloga sa svim neophodnim hranljivim materijama, selektivni medijumi i podloge su u slučaju gajenja bakterija podrazumevali dodavanje odgovarajućeg antibiotika kojim bi se izvršila selekcija rasta isključivo bakterijskih ćelija koje su usvojile plazmidni konstrukt sa genom za rezistentnost, a u slučaju kvasaca odsustvo specifične/ih aminokiseline/a u zavisnosti od selektivnog markera. Čvrste podloge su napravljene na vrlo sličan način kao medijumi, uz dodatak agara koji je potom zagrejan, izliven u Petri posude i ostavljen da se ohladi i očvrstne. Kao izvor ugljenika prilikom gajenja kvasaca, u zavisnosti od ispitivanih uslova, dodavane su glukoza, rafinoza ili galaktoza u koncentraciji od 2% (20 g/l).

Tabela 3. Sastav kompletnih i selektivnih medijuma/podloga za rast bakterija i kvasaca.

Naziv komponente	<i>Escherichia coli</i>			<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
	LB ¹ medijum	LB agar	TB ² medijum	YPD ³ medijum	YPD agar	SD ⁴ medijum	SD agar
	Koncentracija (g/l)						
Tripton	10	10	12				
Ekstrakt kvasca	5	5	24	10	10		
NaCl	5	5					
Agar		15			20		20
Ampicilin (po potrebi)	(0,1)	(0,1)					
Pepton				20	20		
Glicerol			5				
KH ₂ PO ₄			2,31				
K ₂ HPO ₄			12,54				
Glukoza (Dekstroza)				20	20		
Kvaščeva azotna osnova bez aminokiselina ⁵						6,7	6,7
Suplement ⁶						1,92	1,92

¹ *engl.* Lysogeny Broth

² *engl.* Terrific Broth

³ *engl.* Yeast extract-Peptone-Dextrose

⁴ *engl.* Synthetic Drop-out

⁵ *engl.* Yeast nitrogen base without amino acids

⁶ *engl.* Yeast synthetic Drop-out medium supplements without trp/leu/his/leu, trp (odgovarajući suplementi koji sadrže sve aminokiseline osim naznačene (trp/leu/his/leu, trp))

4.3. Ispitivana jedinjenja

Testovima koji su razvijeni tokom izrade ove doktorske disertacije ispitana je biološka aktivnost širokog spektra steroidnih jedinjenja sintetisanih na Katedri za organsku hemiju Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu. Njihova glavna strukturna karakteristika je postojanje steroidnog skeleta sa različitim modifikacijama, u većini slučajeva na A i/ili D prstenu. Osim velikog broja

steroidnih, prema aromatazi je ispitan i afinitet vezivanja dva nesteroidna jedinjenja, sintetisana u okviru iste katedre i projekta koji povezuje sintezu i biološka ispitivanja. Ispitivana jedinjenja su u **Tabelama 4-11.** grupisana na osnovu sličnosti u strukturi i navedeni su radovi u kojima je objavljena njihova sinteza i karakterizacija. Kao referentna jedinjenja u različitim testovima korišćeni su estradiol (E2), estron (E1), androstendion (ASD), testosteron (T), dihidrotestosteron (DHT), tamoksifen (TMX), formestan (FOR), eksemestan (EXM), doksorubicin (DOX) i sildenafil (SIL), čije su strukture prikazane u **Tabeli 12.**

Tabela 4. D-seko androstanski i estranski derivati.

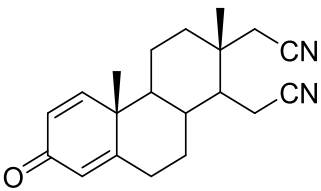
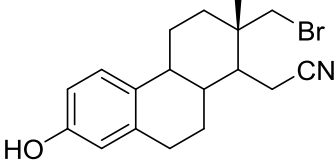
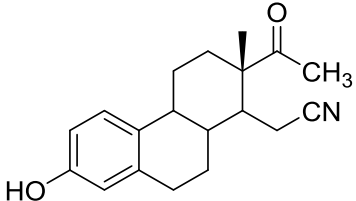
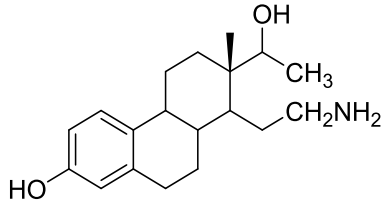
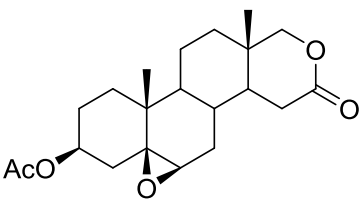
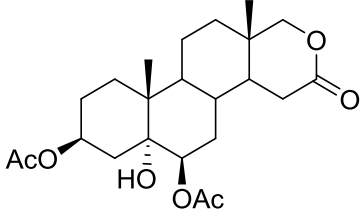
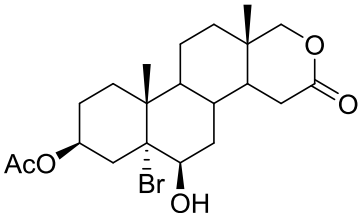
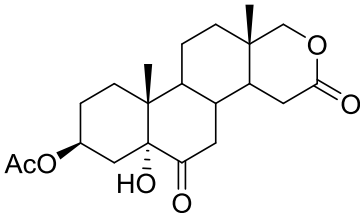
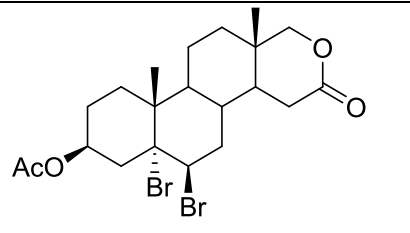
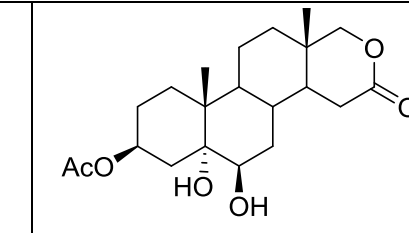
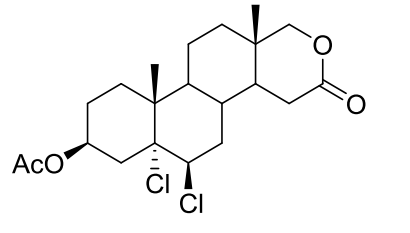
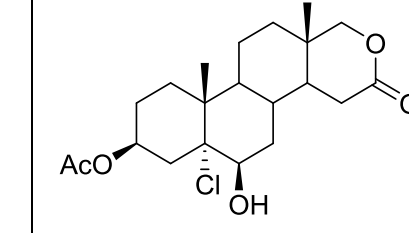
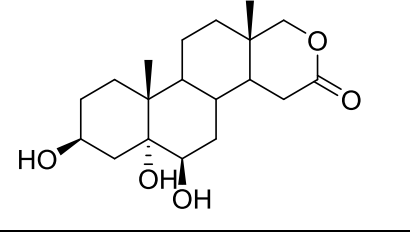
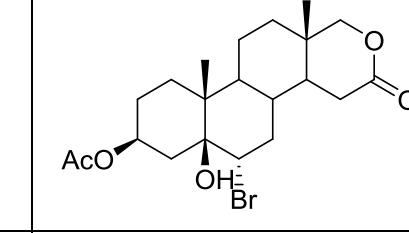
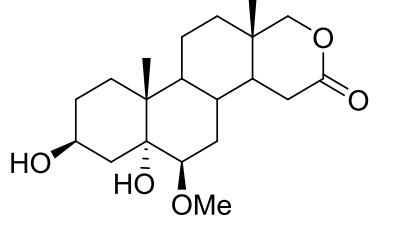
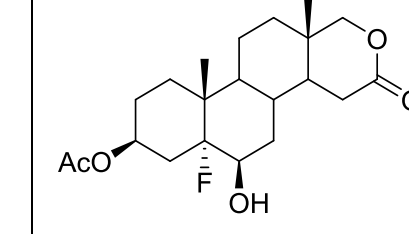
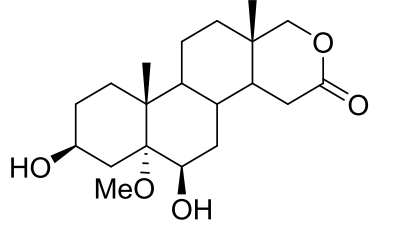
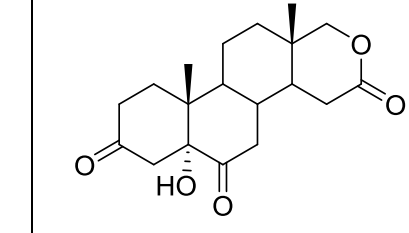
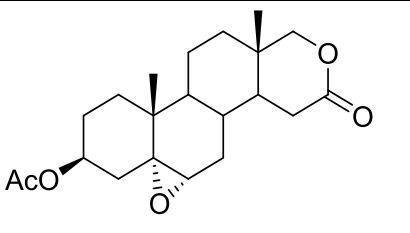
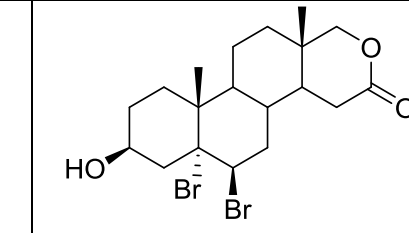
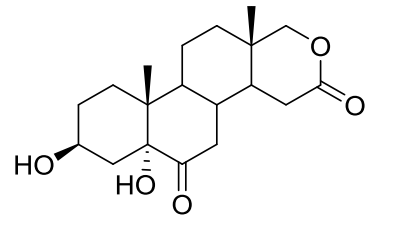
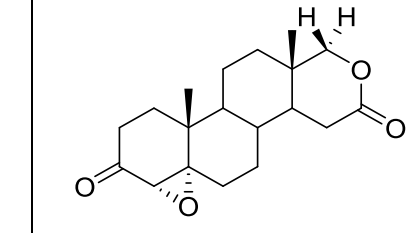
Broj	Struktura	Ref.	Broj	Struktura	Ref.
1		[67]	2		[182, 183]
3		[184]	4		[184]

Tabela 5. Steroidni D-homolaktoni.

Broj	Struktura	Ref.	Broj	Struktura	Ref.
5		[185]	6		[186]
7		[185]	8		[187, 188]

9		[185]	10		[187]
11		[187]	12		[187]
13		[187]	14		[186]
15		[187]	16		[187]
17		[187]	18		[187]
19		[187, 189]	20		[187]
21		[187]	22		[190]

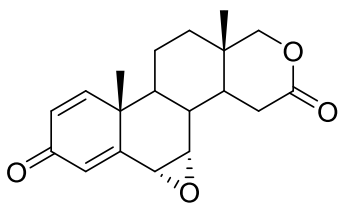
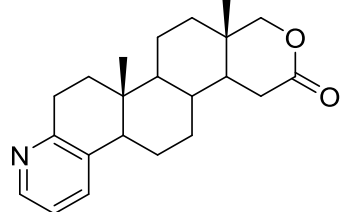
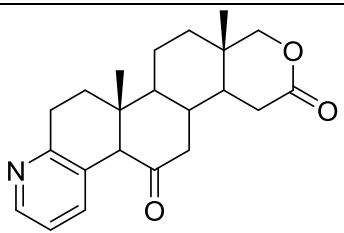
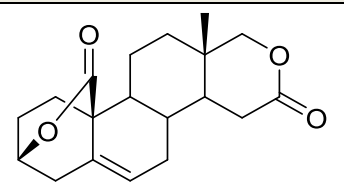
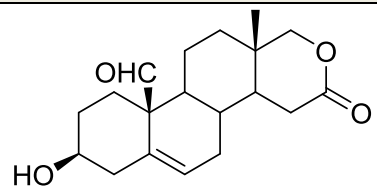
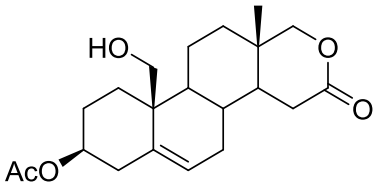
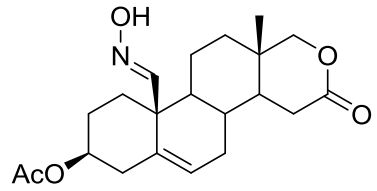
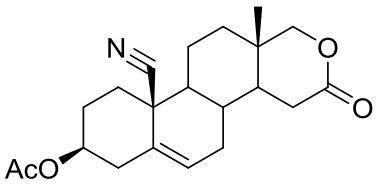
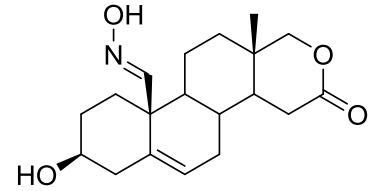
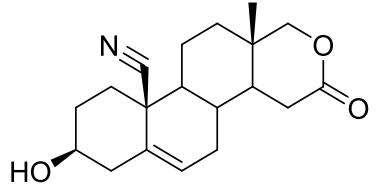
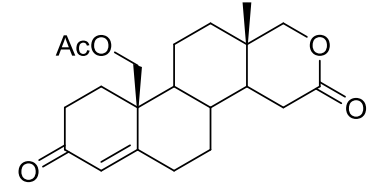
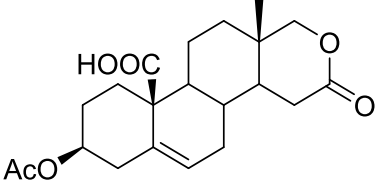
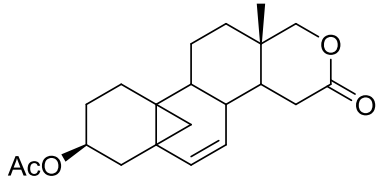
23		[190]	24		[191]
25		[191]			

Tabela 6. D-homolaktoni sa modifikacijama C-19.

Broj	Struktura	Ref.	Broj	Struktura	Ref.
26		[187]	27		[187]
28		[187]	29		[187]
30		[187]	31		[187]
32		[187]	33		[187]
34		[187]	35		[187]

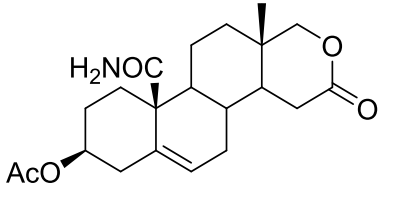
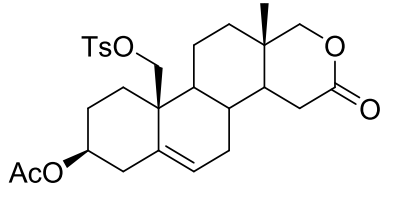
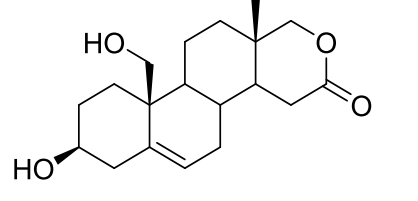
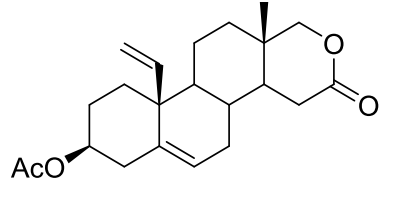
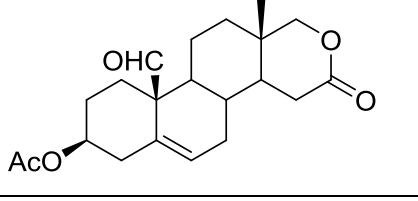
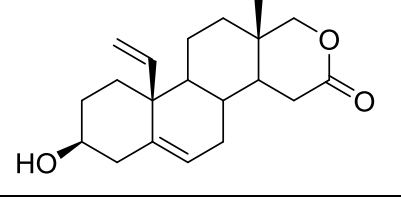
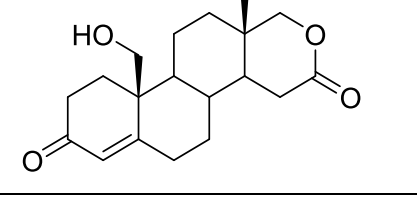
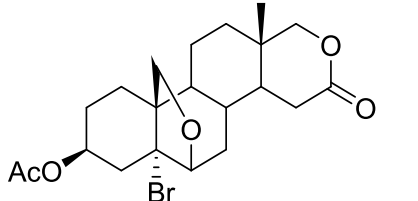
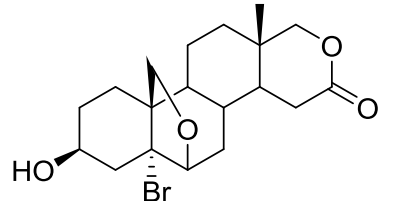
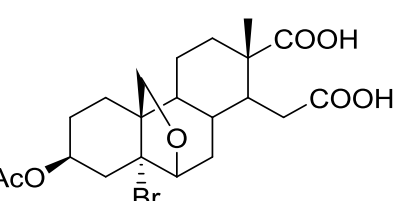
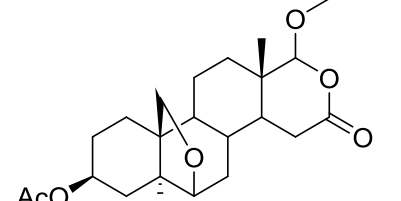
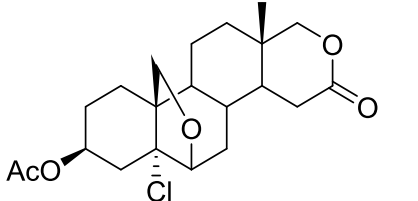
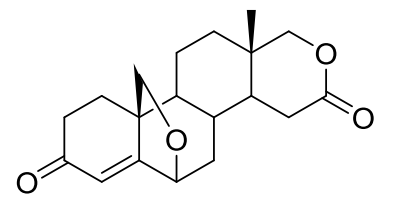
36		[187]	37		[187]
38		[187]	39		[187]
40		[187]	41		[187]
42		[187]			

Tabela 7. 6,19-epoksi-D-homolaktoni (izuzev **45**, koji je dikarboksilna kiselina).

Broj	Struktura	Ref.	Broj	Struktura	Ref.
43		[187]	44		[187]
45		[187]	46		[187]
47		[187]	48		[187]

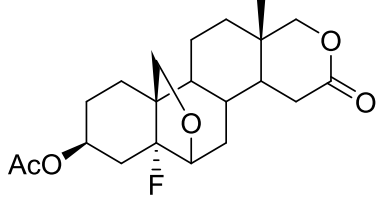
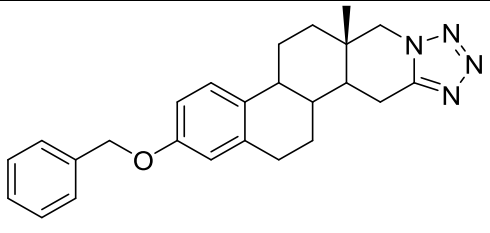
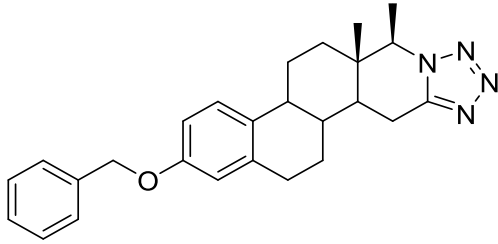
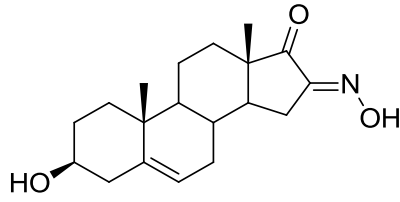
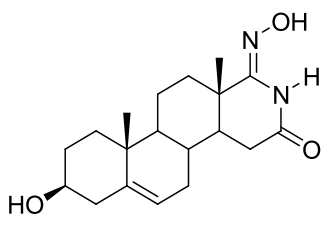
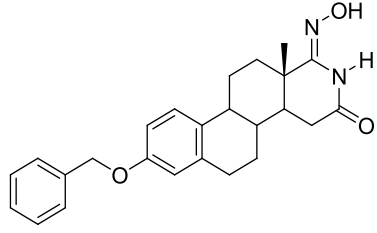
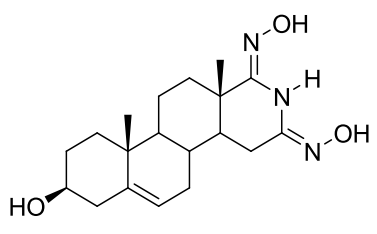
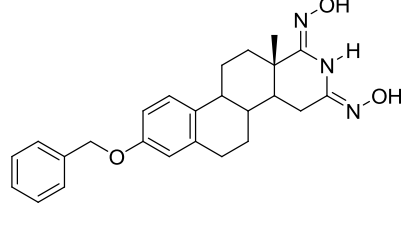
49		[187]	
----	---	-------	--

Tabela 8. Steroidni tetrazoli i oksimi i nesteroidni tetrazoli.

Broj	Struktura		Ref.		
50			[192]		
51			[192]		
52			[192]		
Broj	Struktura	Ref.	Broj	Struktura	Ref.
53		[192]	54		[192]
55		[192]	56		[192]

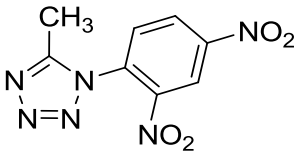
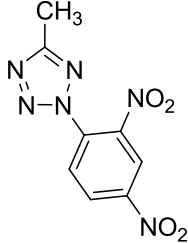
57		A. Oklješa, neobjavljeni rezultati	58		A. Oklješa, neobjavljeni rezultati
----	---	--	----	---	--

Tabela 9. A-supstituisani ferocenilmetil estranski derivati.

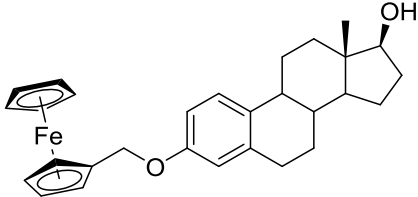
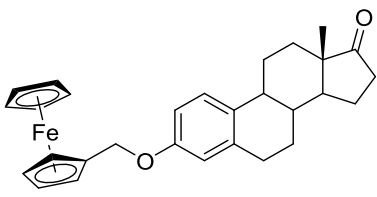
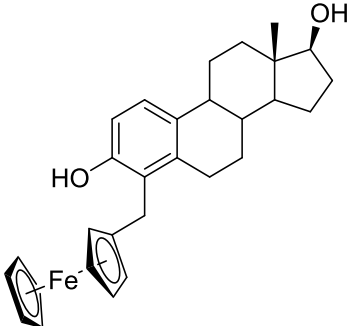
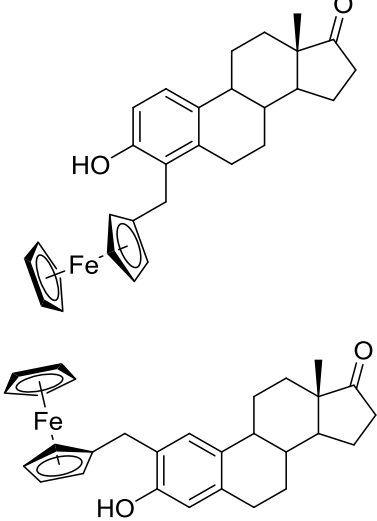
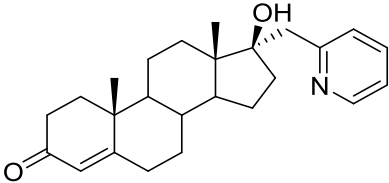
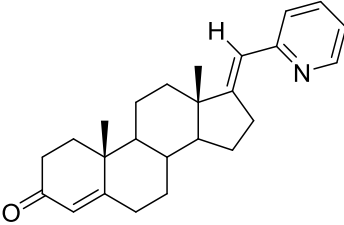
Broj	Struktura	Ref.	Broj	Struktura	Ref.
59		[193]	60		[193]
61		[193]	62		[193]

Tabela 10. 17 α -pikolil i 17E-pikolinilidenski derivati androstana.

Broj	Struktura	Ref.	Broj	Struktura	Ref.
63		[70]	64		[70]

65		[191]	66		[191]
67		[194]	68		[70]
69		[194]	70		[190]
71		[70]			

Tabela 11. 16,17-seko-dinitrili androstanske i estranske serije.

Broj	Struktura	Ref.	Broj	Struktura	Ref.
72		[67]	73		[67]
74		[67]	75		[195]

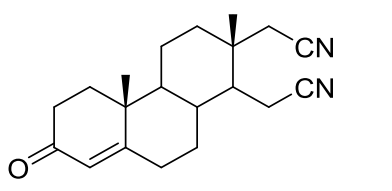
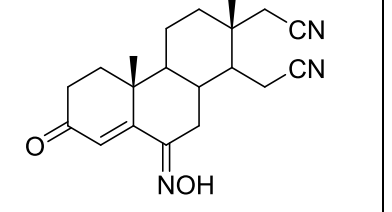
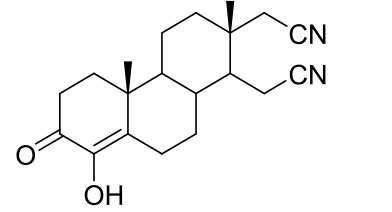
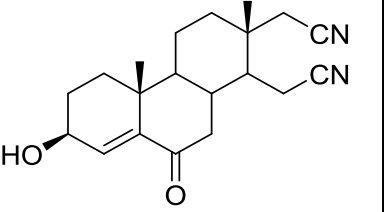
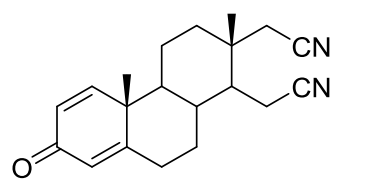
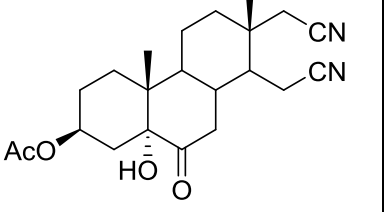
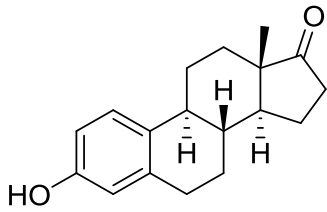
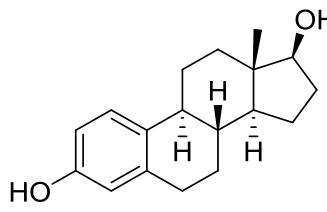
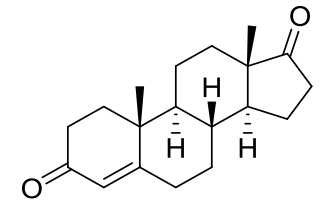
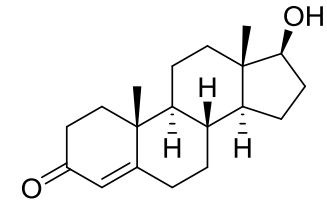
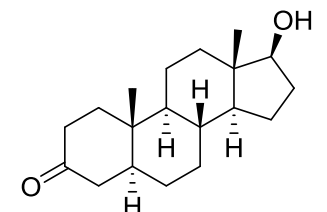
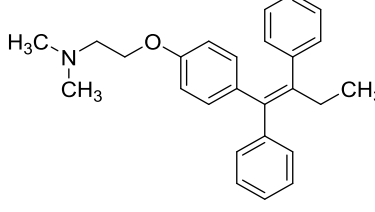
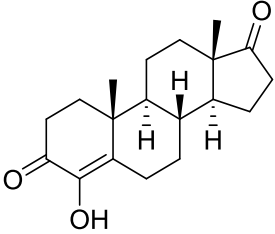
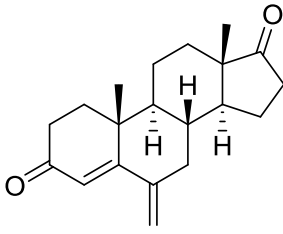
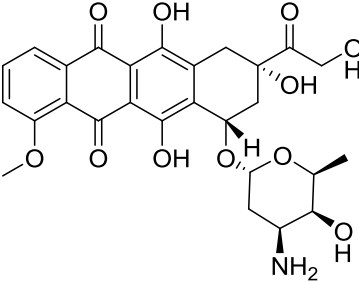
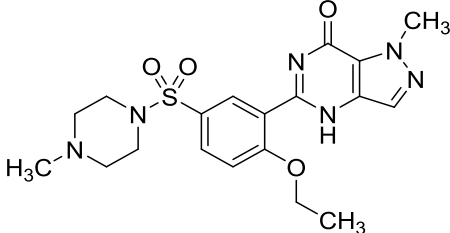
76		[67]	77		[195]
78		[67]	79		[195]
80		[67]	81		[195]

Tabela 12. Referentna jedinjenja.

Oznaka	Struktura	Oznaka	Struktura
E1		E2	
ASD		T	
DHT		TMX	

FOR		EXM	
DOX			
SIL			

4.4. Dobijanje kompetentnih bakterija

U višefaznom procesu molekularnog kloniranja željena DNK se izoluje iz organizma u kom se prirodno nalazi i unosi u domaćina (skoro uvek bakterije), čijim se jednostavnim laboratorijskim uzgajanjem i umnožavanjem dobija veliki broj klonova unetog fragmenta DNK. Ovom tehnikom se formira rekombinantni DNK molekul i umnožava iz ograničene količine početnog materijala [156,157]. Da bi se poboljšala efikasnost usvajanja strane DNK, koje se u normalnim okolnostima praktično ne odvija, bakterije je neophodno podvrgnuti određenim fizičkim ili hemijskim metodama koje povećavaju tu sposobnost, čineći ih kompetentnim [157]. Hemijske metode podrazumevaju tretiranje ćelija solima dvovalentnih ili jednovalentnih metala (kalcijum-hloridom, rubidijum-hloridom, itd). Mehanizam kojim se utiče na efikasnost usvajanja egzogene DNK kalcijum-hloridom još uvek nije poznat, ali se pretpostavlja da kalcijum-hlorid omogućava spajanje DNK sa ćelijskom membranom i dovodi do stvaranja pora na membrani, koje olakšavaju ulazak DNK [156,157,196]. Fizičke metode se zasnivaju na elektroporaciji, odnosno tretiranju ćelija kratkotrajnim pulsevima struje visokog napona, koji čine ćelijsku membranu propusnom, čime omogućavaju ulazak molekula DNK [156,197]. Nasuprot

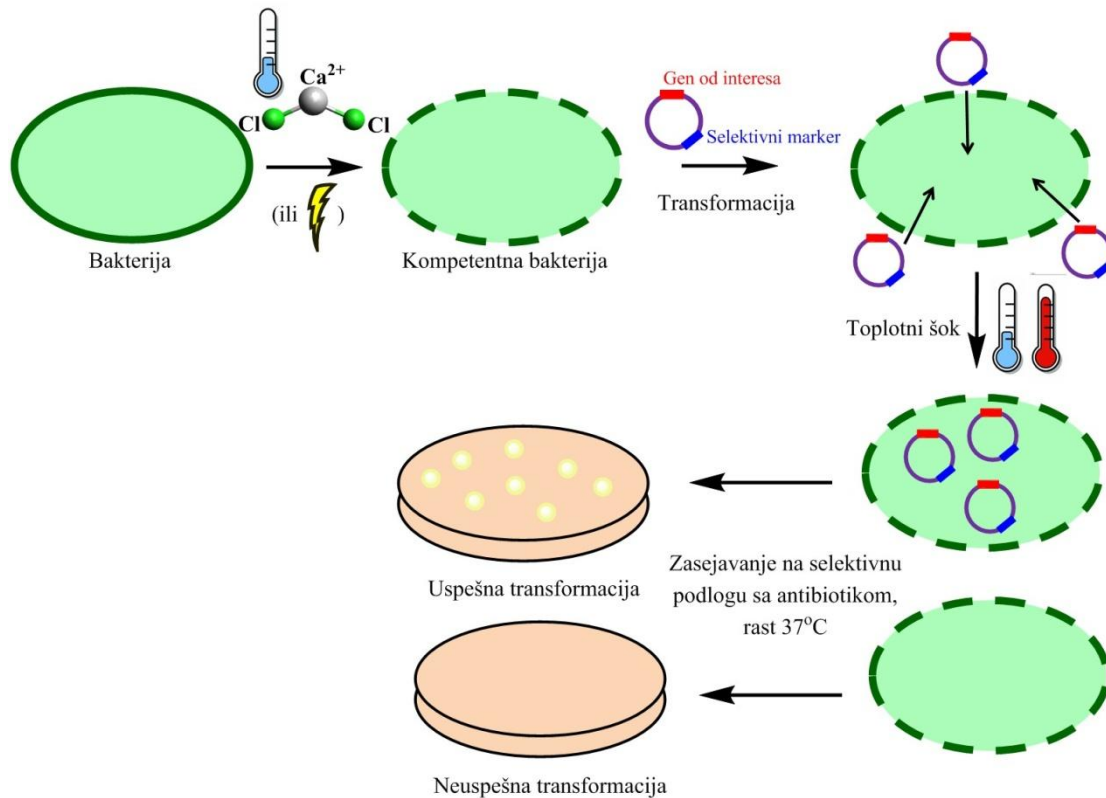
komercijalno dostupnim kompetentnim ćelijama različitih nivoa efikasnosti, mnogi istraživači se ipak opredeljuju da samostalno kreiraju hemijski kompetentne sojeve, kao i mi u ovom radu.

Bakterijske ćelije *Escherichia coli* DH5 α soja su iz glicerolskog osnovnog ili štok rastvora (*engl.* stock solution), čuvanog na -80°C, zasejane na LB agar podloge i inkubirane preko noći na 37°C. Sledećeg dana je izvršena inokulacija 5 ml LB medijuma kolonijom sa sveže zasejane podloge i kultura je gajena do zasićenja oko 16 h u inkubatoru Biosan orbital shaker-incubator ES-20/60 na 37°C pri brzini od 120 obrtaja/min. Zasićena bakterijska kultura je razblažena 100 puta u 50 ml svežeg LB medijuma i inkubirana pod istim uslovima do dostizanja optičke gustine (*engl.* optical density, OD) od oko 0,35 na 600 nm. Bakterijski rast je praćen spektrofotometrijski na Thermo Nicolet Evolution 100 UV-VIS spektrofotometru. Bakterije su zatim inkubirane na ledu 30 min, nakon čega su raspoređene u 8 tubica od 1,5 ml i centrifugirane u 4 ciklusa po 10 min pri brzini 5900 x g u centrifugi ohlađenoj na 4°C. Posle uklanjanja supernatanta talozi koji sadrže bakterije su inkubirani 15 min na ledu, zatim pažljivo pipetom rastvoreni u 1,5 ml prethodno ohlađenog 0,1 M CaCl₂ i suspenzija je ostavljena na ledu 30 min. Na kraju je izvršeno još jedno centrifugiranje 5 min na 5900 x g i 4°C. Bakterijski talozi su veoma nežno, zbog povećane osetljivosti bakterija, rastvoreni u 375 μ l hladnog rastvora 0,1 M CaCl₂, 15% glicerol. Ovako pripremljene hemijski kompetentne bakterije su alikvotirane i čuvane na -80°C do transformacije [198].

4.5. Transformacija bakterija

Molekularno kloniranje obuhvata eksperimentalne metode kojima se fragment DNK klonira u odgovarajući nosač, vektor, koji mu zahvaljujući prisustvu ORI sekvence (*engl.* origin of replication, mesto početka replikacije) omogućava replikaciju unutar domaćina. Pored toga, vektori sadrže i druge ključne elemente neophodne za održavanje i funkcionisanje rekombinantnog molekula DNK unutar domaćina, kao što su marker za selektivnu propagaciju ćelija, zatim promotor za pokretanje ekspresije gena i druge. Plazmidi su, kao samostalno replikujući cirkularni dvolančani molekuli, među najčešće korišćenim vektorima u molekularnom kloniranju. Rekombinantni molekul DNK se unosi u ćeliju domaćina u procesu koji se naziva transformacija. Da bi se ustanovilo koje ćelije su uspešno usvojile stranu DNK, neophodno je postojanje odgovarajućeg selektivnog markera, koji će omogućiti preživljavanje uspešno transformisanim ćelijama na selektivnim podlogama, a u slučaju bakterija uglavnom se radi o genu za rezistentnost na antibiotik [156,157]. Transformacija u bakterijama, osim na

takozvani veštački posredovan način podvrgavanjem različitim laboratorijskim uslovima, može se, ali retko, odvijati i prirodnim putem usvajanjem DNK iz njihove okoline [196]. Uobičajena tehnika u molekularnoj biologiji, korišćena i u ovoj tezi za kreiranje transformanata DH5 α soja, je transformacija bakterijskih ćelija metodom toplotnog šoka (Slika 19) gde se kompetentne ćelije izlažu stresu kratkotrajnim promenama temperature od 0 do 42°C, čime se menja propustljivost membrane dodatno stimulišući usvajanje molekula DNK [199,200].



Slika 19. Princip transformacije kompetentnih bakterija metodom toplotnog šoka.

Kompetentne bakterijske ćelije *Escherichia coli* DH5 α soja su sa -80°C odmrznute na ledu, a za to vreme su ohlađene 1,5 ml tubice. Broj tubica je određen na osnovu broja željenih transformacija, uz obaveznu pozitivnu i negativnu kontrolu. Željena plazmidna DNK je dodata u zapremini 1-5 μ l, u zavisnosti od koncentracije. Kada se radi o transformaciji plazmida nepoznate koncentracije moguće je dodati i nešto veću zapreminu (10-ak μ l), mada to može predstavljati „mač sa dve oštrice“, s obzirom na to da se zapremina reakcije povećava. Kao pozitivna kontrola obično se koristi 1 μ l plazmidne DNK poznate koncentracije, za koju je ranije utvrđen broj transformanata, tako da se može odrediti efikasnost transformacije koju radimo, dok se kao negativna kontrola obično koristi ista zapremina sterilne vode, odnosno pufera u kojem je

rastvorena plazmidna DNK kojom transformišemo. U sve tubice je zatim dodato po 90 µl kompetentnih bakterija i izvršeno blago mešanje pipetom zbog njihove povećane osetljivosti. Nakon 40 min inkubacije na ledu bakterije su izložene toplotnom šoku naglim zagrevanjem u vodenom kupatilu na 42°C u trajanju od 45 sekundi, a potom su vraćene još 2 min na led. U cilju „oporavka“ bakterija i generisanja rezistentnosti na antibiotik u svaku tubicu je dodato po 900 µl LB medijuma, prethodno zagrejanog na 37°C, nakon čega su tubice inkubirane 1 h na 37°C. U sterilnim uslovima 200 µl suspenzije bakterija je zasejano na selektivne podloge sa odgovarajućim antibiotikom. U ovoj doktorskoj disertaciji svi ispitivani plazmidi su nosili rezistentnost na ampicilin, pa je korišćen LB agar sa 100 µg/ml ampicilina. U slučaju unapred očekivane smanjene efikasnosti transformacije, ćelije su pre zasejavanja koncentrovane 5 puta. Podloge sa zasejanim bakterijama su inkubirane 16-18 h na 37°C i očekivano je da se kolonije pojave na podlogama zasejanim uspešno transformisanim bakterijama, a da podloga sa negativnom kontrolom ostane prazna.

4.6. Prečišćavanje plazmidne DNK

Birnboim i Doly su prvi razvili proceduru za alkalnu ekstrakciju plazmidne DNK liziranjem ćelija u prisustvu NaOH i natrijum dodecil sulfata (*engl.* sodium dodecyl sulfate, SDS) [201], koja se i danas najčešće upotrebljava. U ovom radu umnožena plazmidna DNK iz DH5α ćelija je takođe prečišćena standardnim protokolom liziranja u alkalnoj sredini (alkalne lize), dok su kao matrice za vezivanje DNK tokom prečišćavanja korišćeni silika-gel granulacije 10-40 µ ili komercijalno dostupne (QIAprep® Spin) kolonice [202].

Dan pre izolacije plazmidne DNK sterilnom tehnikom rada inokulirana je tečna bakterijska kultura sveže transformisanom bakterijskom kolonijom u 10 ml LB medijuma u prisustvu 100 µg/ml ampicilina. Ćelije su gajene u inkubatoru na 37°C i 180 obrtaja/min, ne duže od 16-18 h, da bi se izbegla prekomerna bakterijska produkcija enzima β-laktamaze, a time i degradacija ampicilina i neselektivan rast ćelija koje nemaju usvojen plazmid. Nakon završetka inkubacije 5-6 ml kulture ćelija je sakupljeno centrifugiranjem 5 min na 9300 x g. Talog bakterija je resuspendovan u 250 µl P1 rastvora (**Tabela 13**), koji pored TrisHCl sadrži i etilendiamintetrasirćetnu kiselinu (EDTA), koja štiti plazmidnu DNK tako što helira dvovalentne jone, čime inhibira aktivnost DNaza. Osim toga, u sastav P1 rastvora ulaze i RNaze kojima se razgrađuje kontaminirajuća RNK, koja ometa prečišćavanje plazmidne DNK. Ćelije su lizirane dodavanjem 250 µl P2 rastvora, koji sadrži 200 mM NaOH i 1% SDS, i invertovanjem tubice

nekoliko puta, pri čemu je već golim okom vidljivo povećanje viskoznosti uzorka, koje je posledica oslobađanja DNK iz ćelija. Sledeća faza je bila dodavanje 350 µl kiselog N3 rastvora za neutralizaciju i taloženje kontaminirajućih makromolekula, poput proteina i RNK. Invertovanjem tubice nekoliko puta formiran je beo precipitat, koji je istaložen centrifugiranjem na 4°C, 9300 x g, 10 min. Od ovog koraka se pomenuta dva protokola za prečišćavanje plazmidne DNK razlikuju. U prvom, koji predstavlja metodu osmišljenu u okviru naše laboratorije („in house“) supernatant je pažljivo prenet u tubicu sa 40 µl 100 mg/ml silika-gela, dok je kod drugog protokola prema uputstvu proizvođača [202] nanet na centar membrane kolonice. Kako bi se DNK vezala za matricu, tubica je invertovana 5 min, a kolonica ostavljena na sobnoj temperaturi i potom su obe centrifugirane na 9300 x g, 1 min. Supernatant, odnosno protočna frakcija (*engl.* flow through) kod kolonice su uklonjeni i izvršeno je ispiranje sa dve porcije po 500 µl PE rastvora. Tubica je ostavljena nekoliko min na sobnoj temperaturi da se osuši od zaostalog EtOH, a kolonica je iz istog razloga centrifugirana dodatno 1 min. Za eluiranje DNK sa nosača u oba slučaja dodato je po 50 µl EB rastvora i tubica je zagrejana u vodenom kupatilu 5 min, na 65°C. Kolonica pod koju je postavljena čista tubica ostavljena je 1 min na sobnoj temperaturi. Na kraju je izvršeno poslednje centrifugiranje tokom 1 min, na 9300 x g i supernatant, odnosno protočna frakcija u slučaju kolonice su prebačeni u čiste tubice i plazmidna DNK je skladištena na -20°C. Koncentracija i čistoća plazmidne DNK je određena korišćenjem Nanodrop BioSpec-nano Shimadzu aparata. Nakon završetka prečišćavanja, ostatak prekonocne bakterijske kulture je zamrznut u 15% glicerolu na -80°C.

Tabela 13. Sastav rastvora za prečišćavanje plazmidne DNK.

P1	P2	N3	PE	EB
50 mM TrisHCl pH 7,5 10 mM EDTA pH 8,0 100 µg/ml RNaza	200 mM NaOH 1% SDS	4,2 M GuHCl 0,9 M CH ₃ COOK pH 4,8	10 mM TrisHCl pH 7,5 80% EtOH	10 mM TrisHCl pH 7,5

4.6.1. Restrikciona digestija

Restrikcioni enzimi prepoznaju i specifično seku dvolančanu DNK u okviru jedinstvenih nukleotidnih sekvenci (4-8 nukleotida), koje se nazivaju mestima prepoznavanja (restrikciona mesta) u procesu poznatom kao restrikciona digestija. Njihovo otkriće 70-ih godina XX veka predstavlja jedan od suštinskih napredaka u tehnologiji rekombinantne DNK. Danas je identifikovan i dostupan veliki broj restrikcioni endonukleaza, uglavnom iz bakterija,

grupisanih u tri velike klase, od kojih se enzimi iz klase II najčešće koriste u molekularnom kloniranju, tj. prebacivanju željenog inserta DNK iz jednog vektora u drugi [157,203].

S obzirom na to da je veličina plazmida i inserta DNK bila poznata, restrikciona digestija je izvršena u cilju verifikacije plazmidnog konstrukta, a prisustvo i veličina restrikcionihi fragmenata (linearizovanog plazmida i željenog inserta DNK) su potvrđeni elektroforezom na agaroznom gelu u prisustvu DNK markera. Odabir restrikcionihi enzima koji selektivno seku plazmid, ali ne i cDNK aromataze je bitan ukoliko se planira dalje manipulisanje sa datim genom (insertom DNK). Tada je moguće konsultovati online program NEB cutter [204] koji na osnovu unete sekvence (**Slika 20**) teorijski određuje za koje su restrikcione enzime prisutna mesta prepoznavanja, kao i za koje enzime nisu (**Slika 21**). Baravalle i saradnici su klonirali cDNK rekombinantne rastvorljive aromataze (rArom) u pCWori+ vektor između restrikcionihi mesta *NdeI* i *HindIII* [205], pa smo i mi koristili iste restrikcione enzime da bismo proverili da li su insert i vektor odgovarajućih veličina.

Nakon što je odlučeno da restrikciona digestija bude izvršena sa ovim restrikcionihi endonukleazama, na osnovu informacija dostupnih od proizvođača odabran je pufer za reakciju u kom oba enzima poseduju najveću aktivnost (100%), optimalna temperatura za njeno izvođenje i temperatura za inaktivaciju enzima. Da bi se izbeglo nespecifično sečenje u uslovima koji nisu optimalni (*engl.* star activity), vodilo se računa da finalna koncentracija glicerola (u kom se čuvaju enzimi) u reakcionoj smeši ne premaši 5%. Tokom rukovanja restrikcionihi endonukleazama sve vreme se radilo na ledu. U ohlađenu tubicu je dodato 4,5 µl sterilne H₂O, 8 µl prečišćene plazmidne DNK, 1,5 µl 10x koncentrovanog SB pufera [206] i po 0,5 µl restrikcionihi enzima *NdeI* (20 000 U/ml) i *HindIII* (5000 U). Inkubacija je izvršena tokom 2 h u vodenom kupatilu na 37°C uz povremeno invertovanje tubice. Nakon završene restrikcione digestije enzimi su inaktivirani 15 minuta na 65°C u termobloku Biometra TSc Thermo Shaker i isečena plazmidna DNK je čuvana na -20°C do provere elektroforezom na agaroznom gelu.

```

1 atgggttttgg aaatgctgaa cccgatacat tataacatca ccagcatcgt gectgaagcc
61 atgcctgctg ccaccatgcc agtccctgctc ctcactggcc tttttctctt ggtgtggaat
121 tatgagggca catcctcaat accaggctct ggctactgca tgggaattgg acccctcatc
181 tcccacggca gattcctgtg gatggggatc ggcagtgcct gcaactacta caaccgggta
241 tatggagaat tcatgcgagt ctggatctct ggagaggaaa cactcattat cagcaagtcc
301 tcaagtatgt tccacataat gaagcacaat cattacagct ctcgattcgg cagcaaactt
361 gggctgcagt gcatcggtat gcatgagaaa ggcacatata ttaacaacaa tccagagctc
421 tggaaaacaa ctgcaccctt ctttatgaaa gctctgtcag gccccggcct tgttcgtatg
481 gtcacagtct gtgctgaatc cctcaaaaaca catctggaca ggttggagga ggtgaccaat
541 gaatcgggct atgtggacgt gttgaccctt ctgctgctg tcatgctgga cacctctaac
601 acgctcttct tgaggatccc tttggacgaa agtgctatcg tggttaaaat ccaaggttat
661 tttgatgcat ggcaagctct cctcatcaaa ccagacatct tctttaagat tctttggcta
721 tacaaaaagt atgagaagtc tgtcaaggat ttgaaagatg ccatagaagt tctgatagca
781 gaaaaaagac gcaggatttc cacagaagag aaactggaag aatgtatgga ctttgccact
841 gagttgattt tagcagagaa acgtgggtgac ctgacaagag agaatgtgaa ccagtgcata
901 ttggaaatgc tgatcgcagc tcctgacacc atgtctgtct ctttgttctt catgctattt
961 ctcattgcaa agcaccctaa tgttgaagag gcaataataa aggaaatcca gactgttatt
1021 ggtgagagag acataaagat tgatgatata caaaaattaa aagtgatgga aaacttcatt
1081 tatgagagca tgcggtagca gctgtctgtg gacttgggtca tgcgcaaagc cttagaagat
1141 gatgtaatcg atggctaccc agtgaaaaag gggacaaaaca ttatcctgaa tattggaagg
1201 atgcacagac tgcagttttt ccccaaacc aatgaattta ctcttgaaaa ttttgcaaag
1261 aatgttcctt ataggtactt tcagccattt ggctttgggc cccgtggctg tgcaggaaag
1321 tacatcgcca tgggtgatgat gaaagccatc ctcgttacac ttctgagacg attccacgtg
1381 aagacattgc aaggacagtg tgttgagagc atacagaaga tacacgactt gtccttgcac
1441 ccagatgaga ctaaaaacat gctggaaatg atctttaccc caagaaactc agacaggtgt
1501 ctggaacact ag

```

Slika 20. cDNK humane aromataze (NCBI ID: NM_001347256.1, [207]).

AatII	BaeI	BsaI	BsrGI	EagI	MscI	PacI	SfoI
AccI	BbvCI	BsaWI	BssHII	EciI	MspAII	PciI	SgrAI
AcII	BcgI	BsaXI	BssSI	EcoNI	NaeI	PluTI	SmaI
AfeI	BciVI	BseYI	BstBI	EcoRV	NarI	PmeI	SnaBI
AflIII	BclI	BsiEI	BstUI	FauI	NdeI	PvuI	SpeI
AgeI	BfuAI	BsiWI	BstZ17I	FseI	NgoMI	PvuII	SrfI
AleI	BglI	BsmI	Bsu36I	HaeII	V	RsrII	StuI
ApaLI	BglII	BspEI	CspCI	HindIII	NheI	SacII	SwaI
AscI	BlpI	BspHI	DraI	HpaI	NmeAII	SalI	TspMI
AseI	BmtI	BspMI	DraIII	KasI	I	SbfI	XbaI
AsiSI	Bpu10I	BsrBI	DrdI	MfeI	NotI	ScaI	XmaI
AvrII	BsaHI	BsrFI	EaeI	MluI	NruI	SfiI	XmnI
							ZraI

Slika 21. Restrikcioni enzimi koji ne seku u okviru cDNK humane aromataze, određeni u NEB cutter programu [204]. Podebljanim (bold) slovima su označeni restrikcioni enzimi korišćeni za restrikciju digestiju pCWori+ Arom vektora.

4.6.2. Elektroforeza na agaroznom gelu

Optimalno razdvajanje fragmenata DNK na agaroznom gelu se postiže pravilnim odabirom koncentracije agaroze, pa je tako za molekule opsega veličina od 500 do 10 000 bp, u koji se uklapa većina plazmida, preporučena upotreba 1% gela. Ovde je 1% agarozni gel napravljen rastvaranjem 1 g agaroze u 100 ml TAE pufera (40 mM Tris, 20 mM sirćetna kiselina, 1 mM EDTA), zagrevanjem u mikrotalasnoj pećnici nekoliko minuta, dodavanjem 1 µl boje koja specifično vezuje DNK (midori zelena) i izlivanjem u kadu sa češljem da bi se

formirala udubljenja za nanošenje uzoraka, nakon čega je ostavljen da se ohladi i stegne. Uzorci su pripremljeni mešanjem 9 μ l plazmidne DNK i sterilne H₂O sa 1 μ l 10x koncentrovanog pufera za uzorke (Blue Juice) i pažljivo naneti u određene bunariće. U zavisnosti od očekivane veličine DNK korišćeni su DNK markeri različitih opsega (Hyperladder I 200-10000 baznih parova, Bioron 250-10000 baznih parova). Molekuli DNK su razdvojeni po veličini primenom električnog napona jačine 100-120 V u trajanju od oko 1,5 h. Gel je vizuelizovan i analiziran u komori za fotografisanje gelova Biometra BDA digital system pod UV svetlošću korišćenjem programa BioDocAnalyze. Da bi se preciznije odredila veličina restrikcionih fragmenata, kreirana je standardna kriva gde su na x osi prikazana migraciona rastojanja traka markera, a na y veličine koje im odgovaraju. Vrednosti dobijene iz standardne krive su potom upoređene sa očekivanim.

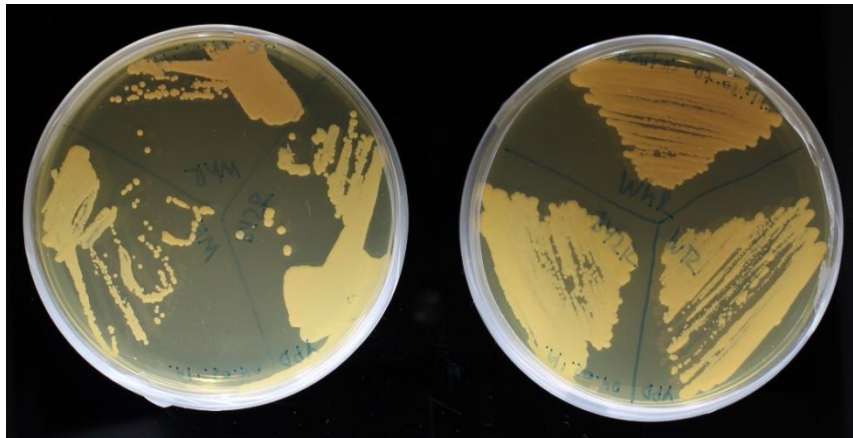
4.7. Transformacija kvasaca

Osim transformacije bakterija, i unošenje egzogene DNK u kvašćeve ćelije predstavlja esencijalnu tehniku u molekularnoj biologiji za ispitivanje željenih gena i njihovih produkata. Metode za transformaciju kvasaca su brojne. Obuhvataju primenu pulseva struje visokog napona (elektroporaciju), biolističke metode odnosno „bombardovanje“ ćelija željenom DNK, zatim tretiranje enzimima koji razgrađuju ćelijski zid, pri čemu nastaju sferoplasti u koje je lakše uneti DNK, tretman staklenim kuglicama i hemijske metode. Sve ove metode se konstantno modifikuju i usavršavaju u cilju povećanja efikasnosti transformacije [208,209].

Najčešće korišćena hemijska metoda za transformaciju kvasaca podrazumeva tretiranje ćelija litijum-acetatom (LiAc) i polietilenglikolom (PEG). Po potrebi, u cilju povećanja efikasnosti transformacije može se dodati i nespecifična, netransformišuća DNK, što je u slučaju LiAc/PEG metode jednolančana DNK. Generalno, hemijske metode obezbeđuju privremenu promenu u stabilnosti membrane i time povećavaju šansu za ulazak strane DNK mehanizmom sličnim endocitozi. Pretpostavlja se da PEG omogućava vezivanje DNK za površinu ćelije, a joni litijuma i promena temperature olakšavaju prolazak kroz ćelijski zid [209,210]. Što se mehanizma delovanja nespecifične jednolančane DNK tiče, on nije u potpunosti razjašnjen, ali je pretpostavka da povećava efikasnost transformacije vezivanjem za sva potencijalna mesta vezivanja na ćelijskom zidu za koja bi se vezala transformišuća plazmidna DNK, povećavajući time šanse za ulazak plazmida u ćeliju [210] ili da ima zaštitnu ulogu štiteći transformišuću DNK od nukleaza unutar ćelije [208].

Nakon što je prečišćavanjem iz bakterija obezbeđena dovoljna količina plazmidne DNK, ćelije kvasca su transformisane standardnom LiAc/PEG metodom [211] uz manje modifikacije. Za pojedine domačine ovaj opšti protokol nije bio efikasan, pa su optimizovani dodatni koraci na osnovu visoko efikasnih procedura opisanih u literaturi [212,213].

Prvog dana transformacije započeta je tečna kultura sa čvrstih master podloga domačina inokulacijom sterilnim nastavkom u 2-5 ml odgovarajućeg medijuma (YPD medijum za sojeve FY250, W(R), W(hR), BY2R i odgovarajući SD medijum sa dodatkom 2% glukoze za rekombinantne sojeve, u zavisnosti od auktotrofnog markera). Master podloge predstavljaju podloge sa određenim sojem ćelija kvasaca (domaćina ili transformisanog soja) gusto zasejanim u nekoliko izolata, koje služe kao početna tačka u mnogim eksperimentima i čuvaju se na 4°C. Često se kreiraju nakon „oživljavanja“ ćelija iz glicerolskih štok rastvora sa -80°C ili nakon transformacije, tako što im uvek prethodi kreiranje podloga sa pojedinačnim kolonijama da bi se osigurala genetička identičnost izolata (**Slika 22**).



Slika 22. Podloge sa pojedinačnim kolonijama i master podloge kvasaca.

Tečne kulture su inkubirane uz agitaciju i aeraciju na 30°C, 180 obrtaja/min preko noći. Drugog dana, kada su ćelije dostigle zasićenost (OD_{600nm} 4-9), razblažene su po formuli:

$$x(ml) = \frac{V_{kupno}(ml) \cdot OD_{željeno}}{OD_{početno} \cdot 2^{broj\ generacija}}$$

gde je x (ml) guste kulture prebačeno u oko 20 ml svežeg medijuma (u zavisnosti koliko je transformacija planirano, varirana je zapremina) i inkubacija je nastavljena pod identičnim uslovima uz praćenje rasta merenjem OD_{600nm} . S obzirom na to da je korišćenje spektrofotometra nepouzdan van dinamičkog opsega aparata, uzorak očekivane visoke OD vrednosti je pre

očitanja razblažen nekoliko puta medijumom. Čelije su gajene do OD_{600nm} oko 0,6, odnosno logaritamske faze rasta kada su „najzdravije“, odnosno najbrže se dele i metabolički su najaktivnije, te je najpogodniji trenutak za transformaciju. Pripremljeno je onoliko tubica koliko je transformacija planirano, obavezno uz pozitivnu i negativnu kontrolu, kako bi se omogućilo praćenje validnosti eksperimenta. Čelije su sakupljene centrifugiranjem oko 1,5 ml kulture pri 9300 x g 5 min na sobnoj temperaturi i supernatant je pažljivo odliven. U talog ćelija je dodato 5 μ l prečišćene plazmidne DNK (osim u negativnu kontrolu, gde je dodata sterilna voda) i tubice su blago protrešene. Zatim je u svaku dodato po 100 μ l LiAc/PEG smeše, sadržaj je nežno vorteksovan i inkubiran na sobnoj temperaturi 15 min.

LiAc/PEG smeša (dovoljno za 8-9 transformacija, čuvana na ledu):

660 μ l 60% PEG
200 μ l 1M LiAc (200 mM)
100 μ l 1M DTT (ditiotreitol) (100 mM)
40 μ l sterilne H_2O

U sledećem koraku ćelije su izložene toplotnom šoku zagrevanjem u vodenom kupatilu na 45°C u trajanju od 25 min. Na kraju je svih 100 μ l zasejano na odgovarajuće selektivne podloge u sterilnim uslovima. Inkubacija do pojave kolonija transformanata je trajala 3-5 dana na 30°C u vlažnoj atmosferi. Ostatak guste prekonoćne kulture je zamrznut u 15% glicerolu i čuvan na -80°C. Na ovaj način nisu mogli da se transformišu svi sojevi, pa su oni transformisani po izmenjenom protokolu, tako što je u LiAc/PEG smešu umesto 40 μ l sterilne H_2O dodato 50 μ l 2 mg/ml jednolančane DNK iz sperme lososa (*engl.* single stranded DNA, ssDNK), rastvorene po uputstvu proizvođača u puferu 1 mM EDTA, 10 mM TrisHCl, pH 7,5 i pre upotrebe denaturisane 5 min u ključaloj vodi.

4.7.1. Modifikovani protokoli kojima se povećava efikasnost transformacije kvasaca

Za transformaciju W(R), W(hR) i BY2R sojeva standardni protokol za transformaciju nije bio efikasan, pa su primenjena tri različita protokola:

1. protokol: Nakon gajenja, ćelije su sakupljene centrifugiranjem 5 ml tečne kulture na 2300 x g, 10 min i uklonjen je supernatant. Talog je ispran sterilnom H_2O dva puta po 500 μ l, nakon čega su ćelije resuspendovane u 500 μ l 0,1 M LiAc. Nakon kratkog centrifugiranja na 2300 x g supernatant je uklonjen pipetom i dodato je 360 μ l LiAc/PEG smeše.

LiAc/PEG smeša:

200 µl 60% PEG

36 µl 1M LiAc

50 µl ssDNK

5 µl plazmidne DNK (za negativnu kontrolu je umesto plazmidne DNK dodata sterilna H₂O)

69 µl sterilne H₂O

Sadržaj je vorteksovan do potpunog rastvaranja taloga i inkubiran 30 min na 30°C uz povremeno invertovanje tubica. Dodato je 34 µl dimetilsulfoksida (DMSO), za koji se pretpostavlja da pospešuje ulazak DNK, tubica je vorteksovana, nakon čega je usledilo izlaganje ćelija toplotnom šoku u vodenom kupatilu na 42°C u trajanju od 15 min. Ćelije su istaložene centrifugiranjem na 15000 x g, 30 sekundi i supernatant je uklonjen pipetom. Resuspendovanje taloga je izvršeno dodatkom 500 µl sterilne H₂O i nežnim pipetiranjem gore-dole. Na kraju je suspenzija zasejana na selektivne podloge i inkubirana 3-5 dana na 30°C [212].

2. protokol: Gotovo sve faze ovog protokola su identične kao kod prethodno opisanog, s tom razlikom što su ćelije rastvorene umesto u 500 µl 0,1 M LiAc u 500 µl sterilne H₂O, dok je toplotni šok izveden na istoj temperaturi, ali duže (60 min) [213].

3. protokol je podrazumevao modifikaciju standardnog LiAc/PEG protokola uz dodatno ispiranje ćelija od LiAc/PEG smeše sterilnom H₂O, inkubaciju za „oporavak“ 1 h u 500 µl kompletnog YPD medijuma, ponovno ispiranje sterilnom H₂O i resuspendovanje u 100 µl odgovarajućeg selektivnog medijuma pre zasejavanja [211].

4.8. Optimizacija fluorescentnog testa u kvascu za ispitivanje afiniteta vezivanja steroidnih jedinjenja za steroidne receptore

Optimizacija fluorescentnog testa u kvascu je podrazumevala pronalaženje optimalnih uslova za identifikaciju liganada LBD eksprimiranih u *Saccharomyces cerevisiae* FY250 soju, pri čemu je procedura opisana u nastavku bila najuspešnija. Ćelije transformisane rekombinantnom DNK su gajene do zasićenja u selektivnom medijumu u odsustvu aminokiseline triptofan (SD-trp) na 28°C, uz agitaciju (150 obrtaja/min) i aeraciju. Kao prvobitni izvor ugljenika u medijumu korišćena je 2% rafinoza, kako bi se izbegla represija GAL1 promotora od strane glukoze i indukcija ekspresije proteina galaktozom dok ćelije nisu potpuno spremne [214]. Kada je OD_{600nm} kulture dostigla vrednost veću od 1, ćelije su razblažene u svežem selektivnom medijumu sa 2% rafinozom u zapremini većoj od prekonoćne kulture, na

oko 0,1 da bi se obezbedile bar dve generacije do željene logaritamske faze rasta ($OD_{600nm} \sim 0,6$) po formuli iz poglavlja 4.7. Inkubacija je nastavljena pod istim uslovima dok ćelije nisu dostigle logaritamsku fazu rasta i 2-3 generacije, pri čemu je proteklo oko 12 h, a zatim je indukovana ekspresija LBD-YFP proteina dodavanjem galaktoze u medijum u finalnoj koncentraciji 2%. U isto vreme, sa namerom da se pospeši pravilno savijanje proteina, dodati su poznati ligandi eksprimiranih receptora ili ispitivana steroidna jedinjenja u jednakoj finalnoj koncentraciji od 10 μ M, koja je izabrana kao optimalna nakon ispitivanja širokog opsega koncentracija. Takođe su urađeni i eksperimenti gde je ligand dodat nakon određenog vremenskog perioda po indukovanju ekspresije, kako bi se utvrdilo na koji način se postiže bolji efekat. Kod ćelija koje ekprimiraju LBD ER α ili LBD ER β za pozitivnu kontrolu su korišćeni tamoksifen, estron i estradiol, a androstendion i testosteron za negativnu. Sa druge strane, ligandi visokog afiniteta za AR, androstendion i testosteron, kao i oni sa niskim (tamoksifen, estradiol i estron), su upotrebljeni kao pozitivna i negativna kontrola, respektivno, u ćelijama koje ekprimiraju LBD AR. Da bi se ispitao uticaj fluorescencije samog rastvarača, DMSO bez liganda je dodat u koncentraciji 1% (dalje u radu kontrola sa DMSO-om), a alikvot ćelijske kulture bez dodate galaktoze i liganda je služio kao neindukovana kontrola. Inkubacija je nastavljena pri nešto nižoj temperaturi (25°C) u mraku između 14 i 16 h, što je određeno kao optimalni vremenski interval nakon ispitivanja vremenske zavisnosti fluorescentnog signala. Ideja za sniženu temperaturu je proistekla iz rada u kom je objavljena efikasna ekspresija i savijanje varijanata zelenog fluorescentnog proteina, kao što je YFP, na sobnoj temperaturi ili ispod nje [215]. Na kraju je intenzitet fluorescencije LBD-YFP spojenih proteina, eksprimiranih u prisustvu ili odsustvu ispitivanog liganda tokom 14-16 h, određen pomoću dve detekcione metode: fluorescentnom mikroskopijom i fluorimetrijskim merenjem u mikrotitar pločama u 96-formatu. Ovim optimizovanim testom je ispitano i vezivanje liganada za LBD ER β eksprimiran u W(hR) soju.

4.8.1. Fluorescentna mikroskopija

Za vizuelizaciju eksprimiranih fluorescentnih proteina spojenih sa odgovarajućim LBD u rekombinantnim kvašćevim ćelijama korišćena je fluorescentna mikroskopija. Na predmetno staklo je naneto 10 μ l koncentrovane suspenzije ćelija i ćelije su posmatrane i fotografisane na fluorescentnom mikroskopu Axio Imager 2 ili Olympus BX51 koristeći FITC filter (ekscitacija 485 nm, emisija 535 nm) i objektiv sa uvećanjem 43 i 40 puta, respektivno. Vreme ekspozicije je podešeno na 500 ili 1000 ms.

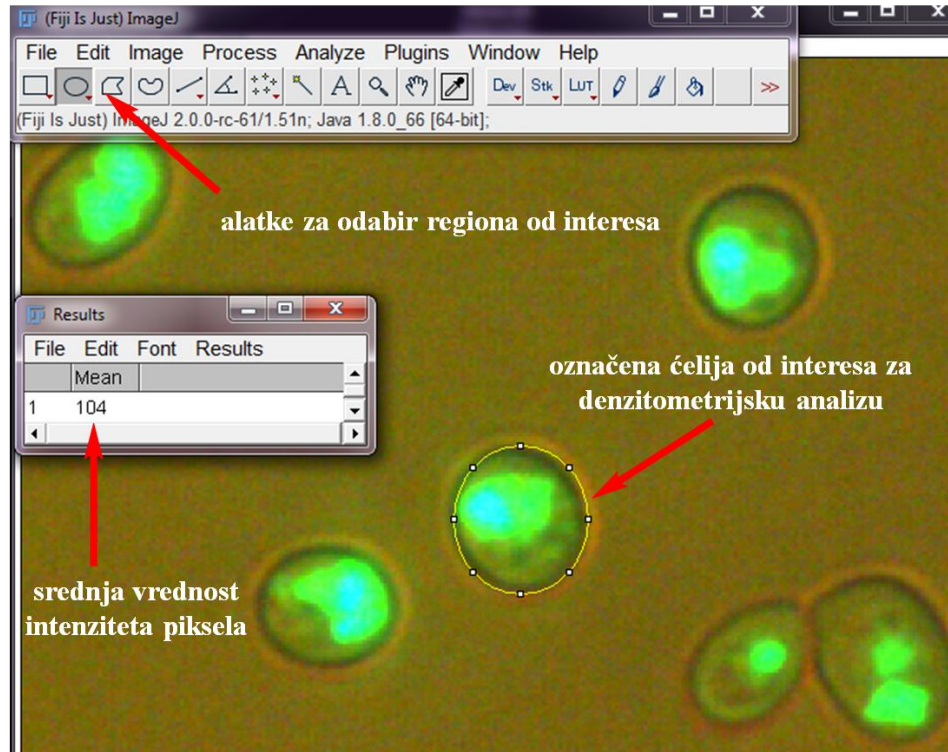
U cilju provere metode kreirane su dozno i vremenski zavisne krive. Za ispitivanje dozne zavisnosti rekombinantne ćelije koje eksprimiraju LBD AR tretirane su dihidrotestosteronom u šest različitih koncentracija (0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 i 100 μM) i praćena je promena srednje vrednosti intenziteta fluorescencije ćelija nakon 16 h ekspresije. Na sličan način je kreirana dozno zavisna kriva za vezivanje estradiola za eksprimiran LBD ER β . Kako bi se ispitala vremenska zavisnost, ćelije koje eksprimiraju LBD ER β su tretirane estradiolom i fluorescentnom mikroskopijom analizirane u različitim vremenskim intervalima od indukcije ekspresije, do 30 h nakon indukcije. Nakon optimizacije, fluorescentni test u kvascu korišćen je za testiranje velikog broja steroidnih jedinjenja.

4.8.1.1. Denzitometrijska (ImageJ) analiza slika

Slike dobijene mikroskopijom su analizirane denzitometrijski pomoću besplatnog ImageJ softvera [216]. Naime, slike snimljene korišćenjem svetlosnog mikroskopa i njihovi odgovarajući fluorescentni parovi su preklopljeni kako bi se bolje videli tačni obrisi ćelija, neophodni za dalju denzitometrijsku analizu, a pozadinski signal je oduzet. Ćelije su označene korišćenjem odgovarajućih alatki koje nudi program i određena je srednja vrednost intenziteta piksela označenih regiona (**Slika 23**), koja je direktno proporcionalna srednjoj vrednosti intenziteta fluorescencije celih ćelija. Broj analiziranih ćelija iznosio je 15-50 po uzorku. Afinitet vezivanja liganda je izražen kao odnos srednje vrednosti fluorescencije uzorka i kontrole sa DMSO-om, i izračunat prema sledećoj formuli:

$$\text{odnos fluorescencije} = \frac{\text{srednja vrednost intenziteta fluorescencije}_{\text{uzorak}}}{\text{srednja vrednost intenziteta fluorescencije}_{\text{DMSO kontrola}}}$$

Histogrami su kreirani korišćenjem Origin Pro 8, softvera za analizu podataka i označene su propagirane standardne greške odstupanja od srednje vrednosti.



Slika 23. Primer denzitometrijske analize ćelija koje ekspimiraju YFP u ImageJ programu.

4.8.2. Merenje fluorescencije u 96-formatu

Za potrebe fluorimetrijskog merenja po 100 μ l suspenzije živih rekombinantnih ćelija je dodato u triplikatu u polja 96-mikrotitar ploče (Carl Roth), dok je kao slepa proba služio medijum bez ćelija. Pre merenja fluorescencije, neophodno je spektrofotometrijski izmeriti OD_{600nm} ćelija, kako bi se napravila razlika između malog broja jako fluorescentnih i velikog broja slabo fluorescentnih ćelija, odnosno kako bi se dobila srednja vrednost fluorescencije po ćeliji. Merenje OD_{600nm} je izvršeno na čitaču za mikrotitar ploče ThermoLabsystems Multiscan EX, a merenje fluorescencije na fluorimetru Fluoroskan Ascent FL na temperaturi od 25°C podešavanjem ekscitacione i emisije talasne dužine na 485 i 538 nm, respektivno. Pre svakog merenja uzorci su promešani da bi se izbegla agregacija ćelija. Za intenzitet fluorescencije uzorka uzeta je srednja vrednost intenziteta tri probe, a afinitet vezivanja testiranog liganda je izražen kao odnos fluorescencije uzorka i kontrole sa DMSO-om i izračunat je prema sledećoj formuli:

odnos fluorescencije =

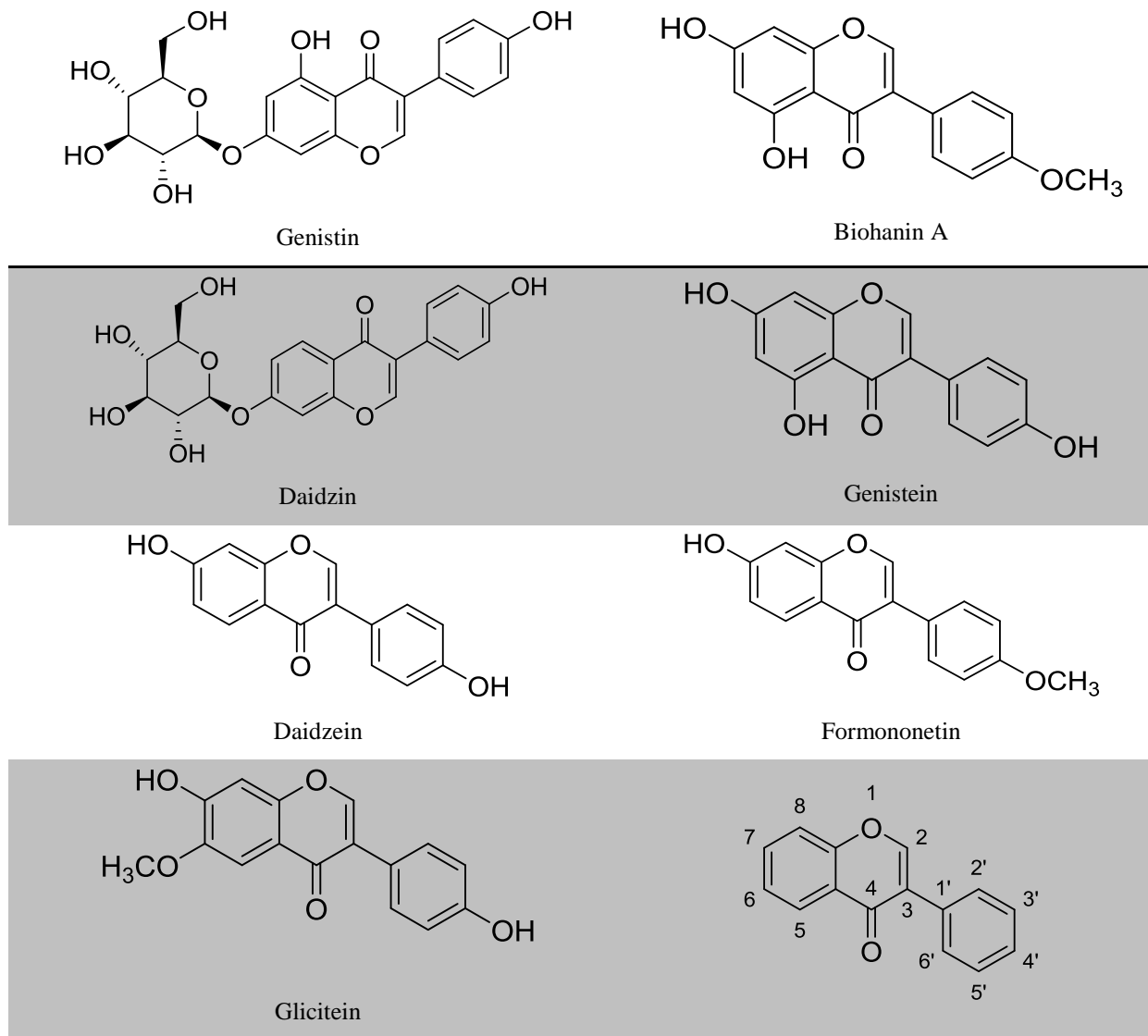
$$= \frac{\text{intenzitet fluorescencije po ćeliji}_{\text{uzorak}} - \text{intenzitet fluorescencije po ćeliji}_{\text{neindukovana}}}{\text{intenzitet fluorescencije po ćeliji}_{\text{DMSO kontrola}} - \text{intenzitet fluorescencije po ćeliji}_{\text{neindukovana}}}$$

Histogrami su kreirani korišćenjem Origin Pro 8, softvera za analizu podataka i označene su propagirane standardne greške odstupanja od srednje vrednosti. Tokom optimizacije uslova za fluorimetrijsko merenje, osim živih, na fluorimetru je izmerena i fluorescencija ćelija liziranih staklenim kuglicama.

4.9. Optimizacija fluorescentnog testa u kvascu za ispitivanje afiniteta fitoestrogena i estrogenog potencijala ekstrakata odabranih biljnih vrsta

Za primenu fluorescentnog ćelijskog biosenzora u ispitivanju afiniteta vezivanja fitoestrogena, fluorescentni test u kvascu je optimizovan korišćenjem standarda fitoestrogena navedenih u **Tabeli 14.** u različitim koncentracijama na rekombinantnim ćelijama koje eksprimiraju LBD ER β . Ćelije su prvobitno gajene do zasićenosti dva dana u SD-trp selektivnom medijumu sa 2% rafinoze na 28°C i 140 obrtaja/min. Ćelijska kultura je razblažena do OD_{600nm} 0,1 u medijumu istog sastava i spektrofotometrijski je praćen rast do OD_{600nm} 0,4-0,6, faze kada je optimalno izvršiti indukciju ekspresije LBD ER β -YFP proteina. Po 900 μ l kulture ćelija je raspoređeno u epruvete u koje je potom dodata galaktoza do finalne koncentracije 2% i standardi fitoestrogena u koncentracijama 10, 50, 100 i 200 μ M, kako bi se odredile granice osetljivosti testa, s obzirom na to da je poznato da su ovi molekuli manje potentni prema ER od estrogena. Kao ligandi visokog, odnosno niskog afiniteta prema ispitivanom receptoru su u istim koncentracijama korišćeni estradiol i androstendion. S obzirom na to da su svi radni rastvori napravljeni u DMSO-u, ovaj rastvarač je služio kao kontrola pozadinske fluorescencije, pri čemu njegova finalna koncentracija nije prelazila 1%, te nije uticao na vijabilnost ćelija. Indukovane ćelije u prisustvu ili odsustvu potencijalnog liganda su inkubirane 15 h na 140 obrtaja/min i 25°C u mraku. Za fluorimetrijska merenja po 150 μ l suspenzije ćelija je dodato u mikrotitar ploču u triplikatu. Intenzitet emitovane fluorescencije je izmeren na 538 nm nakon ekscitacije na 485 nm, dok je za detekciju fluorescentnom mikroskopijom na predmetno staklo naneto po 4 μ l 5 puta koncentrovane suspenzije ćelija. Fluorescencija YFP-a je indukovana upotrebom FITC filtera, a slike obrađene denzitometrijski u ImageJ programu. Rezultati su u oba slučajeva izraženi na prethodno opisan način, poređenjem odnosa normalizovanog intenziteta fluorescencije uzorka i DMSO (ili negativne) kontrole. Nakon postizanja optimalnih uslova za izvođenje testa upotrebom standarda fitoestrogena, testiran je estrogeni potencijal etanolnog i vodenog ekstrakta virka i etanolnih ekstrakata sladića i crvene deteline u koncentracijama 0,01; 0,1; 0,5 i 1 mg/ml.

Tabela 14. Standardi korišćeni tokom optimizacije fluorescentnog testa za procenu fitoestrogene aktivnosti. Numeracija atoma izoflavona.



4.9.1. Priprema ekstrakata odabranih biljnih vrsta

Ekstrakti virka (*Alchemilla vulgaris* aggregate), sladića (*Glycyrrhiza glabra* L.) i crvene deteline (*Trifolium pratense* L.) su pripremljeni u Laboratoriji za ispitivanje prirodnih resursa farmakoloških i bioloških aktivnih jedinjenja (LAFIB). Nadzemni delovi virka su sakupljeni na Vlasinskom jezeru u leto 2017. godine, crvene deteline, kao gajene vrste, dobijeni sa Instituta za ratarstvo i povrtarstvo „NS seme“, dok je koren sladića nabavljen iz

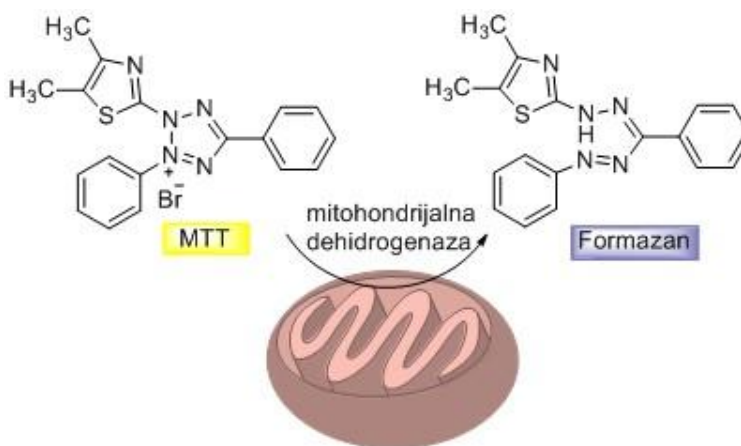


Slika 24. Etanolni ekstrakt virka nakon uparavanja.

komercijalnog izvora. Etanolni ekstrakti su pripremljeni maceracijom 5 g fino usitnjenog suvog biljnog materijala sa 100 ml 70% rastvora EtOH (odnos 1:20) na tresilici (IKA[®]), na temperaturi 24°C tokom 24 h. Sadržaj je profiltriran i rastvarač je uparen na rotacionom vakuum uparivaču Büchi R-210 na 38°C. Radi uklanjanja preostale vode, upareni ostatak (**Slika 24**) je ostavljen preko noći u eksikatoru, a potom je rastvoren u DMSO-u tako da je osnovni rastvor bio koncentracije 100 mg/ml i skladišten na 4°C do upotrebe. Vodeni ekstrakt virka je pripremljen prelivanjem suvog biljnog materijala ključalom vodom u odnosu 1:10 i inkubacijom 1 h na 80°C u vodenom kupatilu, nakon čega je biljni material odvojen ceđenjem, a vodeni ekstrakt liofiliziran.

4.10. Određivanje citotoksičnosti MTT testom

Nakon preliminarnog skrininga fluorescentnim ćelijskim testom, na Institutu za onkologiju Vojvodine u Sremskoj Kamenici je ispitana citotoksičnost odabranih jedinjenja prema ćelijskim linijama humanih kancera i kontrolnoj zdravoj ćelijskoj liniji, kako bi se upotpunila slika njihovog mogućeg mehanizma delovanja. U okviru ove disertacije procenjen je uticaj odabranih D-seko modifikovanih steroida na proliferaciju ćelijske linije ER+ adenokarcinoma dojke (MCF-7), kancera prostate (PC-3) i zdravih fibroblasta pluća (MRC-5). Antiproliferativna aktivnost ispitivanih jedinjenja je određena *in vitro* MTT testom koji se zasniva na redukovanju svetložute MTT soli (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid) u ljubičasto obojeni produkt formazan aktivnošću mitohondrijalnih dehidrogenaza, oksidoredukcionih enzima metabolički aktivnih ćelija (**Slika 25**). Intenzitet apsorbance, srazmeran broju preživelih ćelija nakon tretmana ispitivanim agensom, je određen spektrofotometrijski [217].



Slika 25. Princip MTT testa.

Ćelijske linije su gajene u flaskovima u Dulbekovom modifikovanom medijumu (*engl.* Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) u prisustvu 4,5% glukoze, 10% fetalnog telećeg seruma (*engl.* fetal calf serum, FCS), 100 IU/ml penicilina i 100 µg/ml streptomocina pri sledećim inkubacionim uslovima: 37°C, 5% CO₂, 100% vlažnost. Odabrana steroidna jedinjenja i poznati neselektivni citotoksični agensi, doksorubicin, su sveže rastvoreni u DMSO-u u koncentraciji 0,1 M, a zatim su napravljeni radni rastvori koncentracija 10⁻⁷-10⁻³ M serijskim razblaživanjem u fiziološkom rastvoru, čime je uticaj DMSO-a praktično zanemaren. Kada su dostigle logaritamsku fazu rasta, ćelije su sakupljene centrifugiranjem i vijabilnost im je izmerena testom sa tripan plavim, koji se zasniva na usvajanju ove boje od strane ćelija čija je membrana oštećena, dok žive ostaju neobojene [218]. Suspenzija ćelija (50 µl) je pomešana sa 200 µl 0,1% tripan plavog i ćelije su izbrojane u Neuber-ovoj komori za brojanje na invertnom mikroskopu. Nakon potvrde vijabilnosti, 5x10³ ćelija je zasejano u mikrotitar ploču sa 96 polja (Costar) i preinkubirane su u kompletnom medijumu na 37°C, 5% CO₂ tokom 24 h kako bi se obezbedila njihova stabilizacija pre dodavanja supstanci. Slepa proba je obuhvatala medijum bez ćelija, dok su kontrolna polja sadržala ćelije u odsustvu ispitivanih jedinjenja. Po polju mikrotitar ploče je dodato 10 µl radnih rastvora doksorubicina ili testiranih jedinjenja kako bi finalne koncentracije bile u opsegu 10⁻⁸-10⁻⁴ M, pa je izvršena inkubacija pod istim uslovima tokom 48 h. U svako polje je 3 h pre isteka inkubacije dodato po 10 µl MTT rastvora pripremljenog rastvaranjem ove soli u medijumu u koncentraciji 5 mg/ml i filtriranjem u cilju uklanjanja nerastvornih produkata. Po isteku inkubacije pipetom je uklonjeno 200 µl sadržaja iz svakog bunarića, pri čemu su ćelije ostale zalepljene na dnu, a zatim im je dodato po 100 µl rastvora 0,04 M HCl u 2-propanolu u cilju rastvaranja nastalog obojenog produkta, formazana. Nakon nekoliko minuta inkubacije na sobnoj temperaturi spektrofotometrijsko merenje je izvršeno na čitaču mikrotitar ploča Multiscan MCC340 na ispitivanoj talasnoj dužini 540 nm i referentnoj 690 nm, pri čemu su polja sa medijumom i MTT predstavljala slepu probu. Uticaj ispitivanog jedinjenja na proliferaciju ćelija izražen je kao IC₅₀ vrednost, tj. koncentracija testiranog jedinjenja neophodna za smanjenje broja ćelija za 50% u odnosu na kontrolne (netretirane) ćelije, a određena je Median effect analizom.

4.11. Predviđanje protein-ligand interakcija molekularnim dokingom

Za ispitivanje protein-ligand interakcija molekularnim dokingom najpre su pripremljene strukturne koordinate biomolekula i liganda. Iz Protein Data Bank (PDB) baze podataka [219,220] su preuzete trodimenzionalne strukturne koordinate LBD domena za ER α (PDB: 1A52) [221] i ER β (PDB: 3OLS) [222]. Koordinate za molekule vode i liganda iz kristalne strukture su uklonjene u Notepad⁺⁺ programu. H atomi i Gasteiger-ova empirijska parcijalna naelektrisanja su dodata biomolekulu pomoću skripte „receptor.c“ u VEGA ZZ 3.1.0 programu [223]. Napolarni H atomi su spojeni u istom programu i koordinate biomolekula su sačuvane u obliku PDBQT formata. Strukturni modeli liganada kreirani su i njima je manipulirano korišćenjem AVOGADRO 1.1.1 programa [224,225]. Strukture prirodnih liganada iz kristalnih struktura kompleksa su preuzete iz prethodno pomenutih PDB fajlova, dok su strukture ispitivanih modifikovanih steroida kreirane na osnovu koordinata kristalnih struktura odabranih steroida (preuzetih iz baza PubChem ili Cambridge Crystallographic Data Centre, CCDC) i modifikovane u programu AVOGADRO. Nakon dodavanja H atoma geometrija liganda je optimizovana odabirom MMF94s polja sile (*engl.* merck molecular force field 94). U ovom slučaju za izračunavanje Gasteiger-ovih empirijskih parcijalnih naelektrisanja korišćena je skripta „liagand.c“, u istom programu kao i kod pripreme strukturnih koordinata biomolekula. Rezultujući fajlovi su sačuvani u PDBQT formatu. Logaritamske vrednosti particionog koeficijenta (cLogP) testiranih jedinjenja su određene u VEGA programu.

Potencijalna energija mesta vezivanja računata je korišćenjem programa AutoGrid4, a rezultati upotrebljeni u programu AutoDock [226]. Pojedinačne rešetke sa dimenzijama 50x50x50 su postavljene u centar svakog proteina i razmak je podešen na 0,375 Å. Izračunavanje je izvršeno za svaki atom liganda, uključujući donore i akceptore vodoničnih veza, kao i atome aromatičnog sistema. Zajedno sa koordinatnim mapama rešetki izračunate su i elektrostatičke i desolvatacione mape pri standardnoj dielektričnoj vrednosti od -0,1465. U sledećoj fazi su pripremljeni parametri za doking i izvršene simulacije. Početna pozicija liganda, orijentacija i diedralni uglovi su nasumično postavljeni. Tokom pripreme liganda pomoću AutoDockTools [226] opcije je određen broj torzionih uglova slobode. Doking simulacije su izvedene pomoću genetičkog algoritma (GA) po Lamarckian-u. Maksimalna vrednost procene energije je podešena na 2 500 000, a veličina GA populacije na 150. Za svaku simulaciju je izvedeno ukupno 50 hibridnih GA-LS ciklusa. Za vizuelizaciju potencijalnih konformacija vezivanja biomolekula i

liganda je korišćen program PyMOL [227] i one su upoređene sa kristalnim strukturama kompleksa preuzetim iz PDB. AutoGrid i AutoDock proračuni su izvršeni preko servera National Biomedical Computational Resource [228,229] u okviru PyRX programa za virtuelni skrining [230]. Radi kontrole izvršene su doking simulacije liganada za koje su poznate kristalne strukture protein-ligand kompleksa i rezultati dobijeni dokingom se preklapaju sa eksperimentalno određenim kristalnim strukturama ($R.M.S.D. \leq 0,6 \text{ \AA}$). Na osnovu kontrolnih simulacija zaključeno je da su energije vezivanja koje ukazuju na jak afinitet vezivanja za ER α bile $\leq -10,21 \text{ kcal/mol}$, a za ER β $\leq -10,77 \text{ kcal/mol}$.

4.12. Optimizacija heterologne ekspresije humane aromataze u *Saccharomyces cerevisiae*

Istraživanja u sklopu ove doktorske disertacije su u najvećoj meri bila fokusirana na kvasac kao model organizam, pa su tako i prvi pokušaji optimizacije heterologne ekspresije humane aromataze izvedeni u ovom sistemu. Pompon i saradnici su razvili procedure „visoke“ i „niske“ gustine za gajenje sojeva sa kvaščevom (W(R)) ili humanom (W(hR)) CPR integrisanom u genom kvasca [231]. Nakon transformacije ovih domaćina vektorom koji nosi gen za aromatazu, heterologna ekspresija je optimizovana prateći ideju prve procedure gajenja. Varijacijom eksperimentalnih uslova uspešno je dobijen rekombinantni proteinski kompleks aromataza-CPR u aktivnom stanju i dobrom prinosu. Čelije W(R) soja transformisane pRS425-Arom plazmidnim konstruktom su sa čvrstih podloga prebačene u 20 ml SD-leu tečnog medijuma sa 2% glukoze i gajene do zasićenja na 26°C i 170 obrtaja/min. Potom su isprane sterilnom H₂O i prebačene u 0,5 l svežeg medijuma sa 2% galaktoze u kom je započeta ekspresija proteina inkubacijom pod istim uslovima. Dodavanjem galaktoze u medijum, osim aromataze pod kontrolom GAL1 promotora, indukovana je i ekspresija CPR, regulisana GAL10-CYC1 promotorom. Zbog bolje aeracije i agitacije kultura je raspoređena u tri erlenmajera od 250 ml. U proseku nakon dva dana čelije su dostigle OD_{600nm} oko 5, kada su sakupljene centrifugiranjem 10 min na 6000 x g i izmerena je masa vlažnog taloga koji je potom korišćen za izolaciju mikrozoma. Testirano je i kako korišćenje zamrzavanog umesto svežeg kvaščevog taloga utiče na rezultate.

Za razliku od heterologne ekspresije u rekombinantnim sojevima, za gajenje divljeg tipa domaćina u cilju izolacije samo CPR komponente primenjen je isti protokol, ali su pre-kulture

gajene u YPD medijumu sa 2% rafinoze umesto glukoze, a ekspresija indukovana u istom osnovnom medijumu sa 2% galaktoze.

4.13. Izolacija kvašćevih mikrozoma precipitacijom solima

Da bi aromataza i CPR bili funkcionalni, s obzirom na to da su proteini vezani za membranu, potrebno ih je izolovati unutar mikrozoma. U prvoj fazi istraživanja izolovani su mikrozomi W(R), W(hR) i BY2R sojeva koji ekspimiraju aromatazu, kako bi se dobila oba željena proteina, međutim u kasnijim fazama prešlo se na izolaciju samo redukcionu komponentu CPR iz divljeg tipa W(hR). Mikrozomalna frakcija se najčešće izoluje ultracentrifugacijom ili precipitacijom solima. Kalcijum-hlorid se dodaje u postmitohondrijalni supernatant i izaziva agregaciju mikrozoma, pa ih je moguće istaložiti standardnim laboratorijskim centrifugama [232]. Ovde su mikrozomi izolovani po prilagođenoj metodi koju su opisali Pompon i saradnici [231].

Oko 4 g vlažnog kvašćevog taloga je resuspendovano u 50 ml pufera 50 mM TrisHCl, pH 7,4; 5 mM EDTA, 100 mM KCl sa 87 μ l β -merkaptotetanolu i inkubirano 5 min na sobnoj temperaturi uz povremeno mešanje. Talog je ispran u istom puferu bez β -merkaptotetanolu, a zatim resuspendovan u 4 ml hladnog pufera 50 mM TrisHCl, pH 7,4; 2 mM EDTA, 1,2 M sorbitol. Suspenzija je razblažena hladnim puferom istog sastava, ali niže koncentracije sorbitola (0,6 M) tako da koncentracija ćelija iznosi 0,5 g/ml i raspoređena u nekoliko tubica sa staklenim kuglicama (1:1). Mehaničko liziranje je izvršeno na vorteksu u 6 ciklusa po 1 min, uz pauze na ledu kako ne bi došlo do denaturacije proteina. Ovi uslovi su odabrani kao optimalni nakon utvrđivanja uspešnosti liziranja posmatranjem pod mikroskopom ćelija podvrgnutih različitom broju ciklusa liziranja (**Slika 26**). Kada su se staklene kuglice slegle supernatant je ispipetiran u novu tubu, kuglice su zatim isprane hladnim puferom i ova tečnost je pripojena lizatu. Nakon taloženja ostatka liziranih ćelija centrifugiranjem 10 min na 14000 x g, 4°C, supernatant je prenet u novu tubu i dodat mu je CaCl₂ u finalnoj koncentraciji 15 mM uz inkubaciju na ledu u trajanju od 15 min. Nakon toga, mikrozomi su istaloženi centrifugiranjem 15 min na 14000 x g, 4°C i rastvoreni u 200 μ l hladnog pufera 50 mM TrisHCl, pH 7,4; 1 mM EDTA. Ukupna koncentracija proteina je određena metodom po Bradfordu, a mikrozomi su za eksperimente korišćeni sveži ili su skladišteni u 20% glicerolu na -80°C do izvođenja enzimskog testa.



Slika 26. A) Nelizirane ćelije kvasca; Ćelije lizirane staklenim kuglicama na vorteksu u 4 ciklusa (B) u 8 ciklusa (C) po 1 min.


4.13.1. Ispitivanje aktivnosti CPR

Nakon izolacije mikrozoma iz ćelija kvasca sa eksprimiranom humanom CPR, a pre izvođenja dvokomponentnog enzimskog testa za ispitivanje aktivnosti aromataze (eksprimirane i izolovane iz bakterija), bilo je neophodno proveriti redukcionu aktivnost CPR i time funkcionalnost čitavog sistema. Aktivnost CPR određuje se indirektno praćenjem redukcije elektron akceptora, citohroma c, koji je stabilan na vazduhu i ne podleže reoksidaciji. CPR prihvata elektrone sa NADPH i prenosi ih na citohrom c, čija redukcija je praćena porastom apsorbanca na 550 nm. Test je veoma brz i jednostavan i ne zahteva specijalizovanu opremu, a jedino ograničenje je mogućnost postojanja drugih reduktaza u izolovanim mikrozmima ili homogenatima tkiva, koje mogu ometati merenje prenosom elektrona na citohrom c [233]. Eksperimentalni sistem je testiran i u kivetu, i u mikrotitar ploči, pri čemu se drugi način pokazao bržim i ekonomičnijim.

U kivetu je dodato 80 μ l 0,5 mM citohroma c rastvorenog u 10 mM K-fosfatnom puferu, pH 7,4; 10 μ l ispitivanih mikrozoma W(hR) soja bez unetog plazmida za humanu aromatazu i do 990 μ l 0,3 M K-fosfatnog pufera, pH 7,4. Nakon snimanja pozadinske apsorbanca na 550 nm, dodato je 10 μ l 10 mM elektron donora NADPH, sadržaj je promešan i na istoj talasnoj dužini je praćena apsorbanca tokom 10 min. U kontrolnu kivetu dodate su sve komponente reakcije izuzev mikrozoma.

U bunariće mikrotitar ploče su dodate komponente prema **Tabeli 15.**, uz tri kontrolne probe-bez mikrozoma, citohroma c ili NADPH. Snimanja su izvršena na Thermo Scientific Multiskan GO čitaču mikrotitar ploča u kinetičkom modu. Aktivnost CPR je određena kao količina citohroma c redukovana po ml štok rastvora enzima u min prema uputstvu Guenbercih-a i saradnika [233].

Tabela 15. Ispitivanje aktivnosti CPR u mikrotitar ploči-sastav različitih proba i postupak snimanja A_{550nm} .

	1	2	3	4
	V (μ l)			
0,5 mM citohrom c	20	20	/	20
Mikrozomi	2,5	/	2,5	2,5
0,3 M K-fosfatni pufer, pH 7,4	227,5	227,5	227,5	227,5
10 mM K-fosfatni pufer, pH 7,4	/	/	20	/
Pufer u kom su mikrozomi	/	2,5	/	/
Snimanje A_{550nm} 3 min u intervalima po 10 sekundi.				
10 mM NADPH	2,5	2,5	2,5	/
Sterilna H ₂ O	/	/	/	2,5
Snimanje A_{550nm} 10 min u intervalima po 10 sekundi.				
				

4.14. Heterologna ekspresija humane aromataze u bakterijama *Escherichia coli*

Humana aromataza je heterologno eksprimirana u *Escherichia coli* DH5 α soju sledeći protokol Nardo-a i saradnika [159]. DH5 α bakterije transformisane pCWori+ Arom ekspresionim vektorom su iz zamrznutog glicerolskog štoka sa -80°C zasejane na LB podloge sa 100 μ g/ml ampicilina i postavljene u inkubator na 37°C, 16-18 h. Narednog dana započeta je prekonoćna bakterijska kultura inokulacijom jedne kolonije u 10 ml LB medijuma sa 100 μ g/ml ampicilina. Čelije su gajene u inkubatoru na 150 obrtaja/min i 37°C, tokom 16 h, nakon čega je centrifugiranjem tokom 4 min na 3300 x g, istaloženo 5 ml guste kulture. Iskorišćen medijum je uklonjen i talog je resuspendovan u 5 ml TB medijuma (**Tabela 3**). Ovaj inokulum je zatim razblažen u 0,5 l svežeg TB medijuma sa 100 μ g/ml ampicilina (1:100), sadržaj je podeljen u tri erlenmajera zbog bolje aeracije i agitacije, pa je inkubacija nastavljena pod istim uslovima. Bakterijski rast je praćen spektrofotometrijski merenjem OD_{600nm} tokom vremena, dok nije dostignuta logaritamska faza rasta (OD_{600nm} ~ 0,5). U tom trenutku je izdvojen alikvot 1 ml

neindukovanih ćelija (**NI**) i talog sačuvan na -20°C za analizu ekspresije proteina i njegovog prinosa i čistoće SDS-PAGE elektroforezom (elektroforezom na poliakrilamidnom gelu, *engl.* SDS-polyacrylamide gel electrophoresis). Kao prekursor hema, u kulturu je dodata δ -aminolevulinska kiselina u finalnoj koncentraciji 0,5 mM, pa je inkubacija nastavljena na 28°C . Posle 1 h ekspresija aromataze je indukovana dodavanjem 0,5 mM izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozida (IPTG) i inkubacija nastavljena na 28°C , 150 obrtaja/min tokom 48 h. Dodatna doza 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicilina je dodata 24 h nakon indukcije. Uzorci za elektroforetsko ispitivanje su uzeti na prethodno opisan način 7, 19, 24, 26 i 48 h nakon indukcije (**+7, +19, +24, +26, +48**). Po završetku ekspresije proteina, ćelije su sakupljene centrifugiranjem 10 min na 5000 x g. Talog od 0,5 l bakterijske kulture je resuspendovan u 10 ml pufera za resuspendovanje (100 mM K-fosfatni pufer, pH 7,4; 20% glicerol, 0,1 % Tween20) sa 10 mM β -merkaptetanom, dodatim neposredno pre upotrebe. Resuspendovan talog je zamrznut na -80°C sa 1 mg/ml lizozima do prečišćavanja.

4.15. Izolacija i prečišćavanje proteina Ni-afinitetnom i gel filtracionom hromatografijom

Kao i za ekspresiju, i za izolaciju i prečišćavanje rekombinantne aromataze iz *Escherichia coli* je delimično praćen protokol grupe predvođene Gilardi-em [159]. Prva faza liziranja bakterija u cilju ekstrakcije ovog membranskog proteina je podrazumevala tretiranje ćelija kombinacijom lizozima i deterdženta. Talog bakterija zamrznut sa lizozimom je postepeno otapan na ledu invertovanjem tube, a nakon oko 15 min prebačen u čašu uz mešanje na magnetnoj mešalici na 4°C . Da bi se izbegla proteoliza, dodat je inhibitor proteaza fenilmetilsulfonil fluorid (*engl.* phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF), a nakon 30 min je povećana koncentracija Tween20 deterdženta sa 0,1% (poreklom iz pufera za resuspendovanje) na 1% i nastavljeno mešanje na hladnom još 30 min. Druga faza liziranja je obuhvatila 5 ciklusa sonikacije po 30 sekundi zvučnim talasima amplitude 14 MHz na sonikatoru Soniprep 150 uz pauze na ledu. Nakon ovog koraka izdvojen je alikvot od 100 μl lizata (**L**) za proveru SDS-PAGE elektroforezom i zamrznut na -20°C . Lizat je centrifugiran u tubicama od 2 ml, 1 h na 4°C i 13400 x g. Alikvot supernatanta (**SN**) i talog (**T**) su takođe sačuvani za razdvajanje na poliakrilamidnom gelu kako bi se utvrdilo da li je željeni protein uspešno rastvoren. Frakcije supernatanta su spojene i rekombinantna aromataza je zahvaljujući prisustvu 4xHis taga prečišćena afinitetnom hromatografijom sa imobilisanim metalom (*engl.* immobilized metal

affinity chromatography, IMAC). Korišćene su komercijalne HisTrap kolonice zapremine 1 ml napunjene sefrozom i jonima nikla za formiranje helatnih kompleksa sa histidinskim ostacima [234]. Kolonica je isprana pomoću šprica sa 5 ml destilovane H₂O i ekvilibrisana sa 10 ml vezujućeg pufera (100 mM K-fosfatni pufer, pH 7,4; 20% glicerol, 0,1% Tween20). Zatim je nanet supernatant i protočna frakcija (**FT**) je sakupljena kako bi se utvrdilo da li je protein ostao vezan preko histidinskih ostataka za imobilisani Ni²⁺, odnosno da je odsutan u pomenutoj frakciji. S obzirom na prisustvo zaostalog β-merkaptetanola (poreklom iz pufera za resuspendovanje) u supernatantu, naredne faze prečišćavanja su izvedene u kratkom vremenskom periodu, da ne bi došlo do redukcije Ni²⁺ i time slabijeg vezivanja proteina. Špric je zamenjen i kolonica je isprana dva puta-prvo sa 10 ml vezujućeg pufera (**W1**), a potom sa 5 ml vezujućeg pufera sa 20 mM imidazolom (**W2**), da bi se uklonili nespecifično vezani proteini. Eluiranje željenog proteina je izvršeno sa 5 ml vezujućeg pufera sa 400 mM imidazolom i eluati su sakupljeni u tubice po 1 ml (**E1-E5**). Na kraju je kolonica isprana sa 10 ml destilovane H₂O i 5 ml 20% EtOH i čuvana uspravno na 4°C do sledeće upotrebe. Eluati su kvalitativno ispitani metodom po Bradfordu na prisustvo proteina, odabrane su one tri frakcije koje su pokazale najviši sadržaj i spojene pre nanošenja na gel filtracionu kolonu.

Ovaj tip hromatografske kolone sa ekskluzionim limitom manjim od veličine željenog proteina je korišćen u svrhu zamene pufera, radi uklanjanja imidazola, koji ometa spektroskopska merenja, i kontaminirajućih proteina manjih od željenog. Gel filtraciona kolona je pripremljena dan pre eksperimenta na sledeći način: Biogel P-10 pogodan za razdvajanje proteina molekulskih masa 1500-20000 Da je odmeren prema uputstvu za dobijanje zapremine matriksa 10 ml, potopljen u dvostruko većoj zapremini 100 mM K-fosfatnog pufera, pH 7,4 i ostavljen preko noći. Carl Roth 1516.1 L prazna kolona je postavljena na stativ i hidratizirani gel je pažljivo kvantitativno nanet, uz izbegavanje formiranja neravnina (**Slika 27**). Ekvilibracija je izvedena sa 20 ml vezujućeg pufera, a protok omogućen zahvaljujući gravitaciji. Uzorak zapremine 3 ml nanet je na ekvilibrisanu kolonu, nakon čega je dodato 10 ml vezujućeg pufera i sakupljane su frakcije po 1 ml (**F0-F10**). Ukupna koncentracija proteina u uzorcima



Slika 27. Ručno pakovana gel filtraciona kolona sa gravitacionim protokom.

određena je Bradfordovom metodom, a za frakcije sa najvišom koncentracijom snimljeni su apsorpcioni spektri. Intenzitet Soretovog pika je pokazatelj funkcionalnosti proteina u našem slučaju, pa su na osnovu njega odabrane frakcije koje su skadištene na -80°C za dalje eksperimente. Od svih naznačenih frakcija tokom prečišćavanja Ni-afinitetnom i ekskluzionom hromatografijom su izdvojeni alikvoti po $100\ \mu\text{l}$ i zamrznuti na -20°C do izvođenja SDS-PAGE elektroforeze. Za proveru na gelu su takođe izdvojeni alikvoti E i F frakcija odabranih za dalje eksperimente (**P1, P2**).

4.15.1. Razdvajanje proteina SDS-PAGE elektroforezom

Za proveru količine i čistoće izolovane aromataze prikupljeni uzorci analizirani su SDS-PAGE elektroforezom na Mini-Protean III Bio-Rad aparaturi. Ovom metodom se razdvajanje proteina vrši u električnom polju na osnovu razlika u dužinama njihovih polipeptidnih lanaca nakon narušavanja savijene strukture SDS deterdžentom, β -merkaptotanolom i povišenom temperaturom [235].

S obzirom na to da je molekulska masa aromataze oko 55 kDa, napravljen je 12,5 % razdvajajući gel (*engl.* separating gel), pogodan za razdvajanje proteina u rangu 15-60 kDa [235] i 4% koncentrujući gel (*engl.* stacking gel), koji obezbeđuje ujednačen ulazak proteina svih uzoraka u razdvajajući gel. Uzorci za gel su pripremljeni mešanjem $10\ \mu\text{l}$ ispitivane frakcije (broj ćelija je normalizovan među uzorcima) sa $4\ \mu\text{l}$ 5x koncentrovanog pufera za uzorke sa SDS-om, $0,5\ \mu\text{l}$ β -merkaptotanolom i $5,5\ \mu\text{l}$ destilovane H_2O i zagrevanjem na 100°C , 5 min u termobloku. Veoma viskozni uzorci (lizati ćelija i talozi) su pre gel elektroforeze sonifikovani. Nakon polimerizacije gelovi su prebačeni u komoru za elektroforezu i naliveni hladnim puferom 25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1% SDS. U bunariće formirane pomoću 1 mm češljica naneto je po $20\ \mu\text{l}$ pripremljenih uzoraka i $10\ \mu\text{l}$ proteinskog markera (Serva 6,5-200 kDa, Roti®-Mark 14-212 kDa standard). Aparatura je zatvorena postavljanjem poklopca na odgovarajuće elektrode i primenjen je napon od 80 V za kretanje proteina u koncentrujućem gelu, zatim 180 V u razdvajajućem. Elektroforeza je zaustavljena nakon približno 90 min, nakon čega su gelovi ostavljeni preko noći da se boje u rastvoru 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250, 4,5% metanol, 4,5% glacialna sirćetna kiselina, a zatim obezbojeni u rastvoru 1% metanol, 1% glacialna sirćetna kiselina i fotografisani.

4.15.2. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina je određena na dva načina-očitavanjem apsorbance na 280 nm ili metodom po Bradfordu. Zahvaljujući prisustvu aromatičnih aminokiselina, proteini apsorbuju u UV oblasti sa apsorpcionim maksimumom na 280 nm, pa je nakon određivanja $A_{280\text{nm}}$, njihovu koncentraciju moguće izračunati preko Lamber-Berovog zakona:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

gde ε predstavlja molarni ekstinkcioni koeficijent proteina, koji smo odredili na osnovu sekvence u ExPASy programu (za aromatazu iznosi $54320 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), c koncentraciju, a l dužinu optičkog puta koja kod kiveta iznosi standardno 1 cm. Određivanje sadržaja proteina metodom po Bradfordu je izvedeno u mikrotitar pločama po protokolu Bio-Rad proizvođača [236]. Prvo je generisana standardna kriva, tako što su pripremljeni rastvori albumina goveđeg seruma u koncentracijama 125-2000 $\mu\text{g/ml}$. Istovremeno je određena apsorbance ispitivanih uzoraka i na osnovu standardne krive određene su nepoznate koncentracije. Nakon dodavanja Bradfordovog reagensa uzorci koji sadrže proteine boje se u plavo, što je vidljivo i golim okom, te je ova metoda korišćena i za preliminarni kvalitativni skrining frakcija tokom prečišćavanja, kako bi se identifikovale one u kojima su prisutni proteini.

4.16. Određivanje aktivnosti aromataze i inhibitornog potencijala odabranih steroidnih jedinjenja

Test za ispitivanje katalitičke aktivnosti rekombinantne aromataze baziran je na proceduri Peyronneau-a i saradnika za enzim CYP 3A4, s tim što su koncentracije komponenata reakcione smeše povećane [237]. Razvoj ovog testa je tekao u dva pravca. Prvobitno je kompleks aromataza-CPR dobijen izolacijom mikrozoama rekombinantnih sojeva kvasca sa optimizovanim redoks sredinama (W(R), W(hR) ili BY2R) transformisanih plazmidnim konstruktom sa genom za aromatazu. Drugi pravac je podrazumevao razvoj kuplovanog testa, gde je aromataza izolovana iz bakterija *Escherichia coli* DH5 α soja transformisanih pCWori+ Aro plazmidom, a reduktaza iz mikrozoama kvasca *Saccharomyces cerevisiae* W(hR) soja. Nakon što je potvrđena katalitička aktivnost enzima testom aromatizacije supstrata, ispitan je uticaj poznatih inhibitora, kao i nekoliko modifikovanih steroida na aktivnost aromataze. Tokom optimizacije ovih enzimskih testova ispitane su različite koncentracije komponenata reakcione smeše i različiti uslovi, a u **Tabelama 16. i 17.** su navedeni oni koji su dali pozitivne rezultate. Rastvor čistog,

nedeogradiranog NADPH pokazuje apsorpcioni maksimum na 340 nm, pa je svaki put pre njegove upotrebe u eksperimentu, u cilju provere aktivnosti, snimljen apsorpcioni spektar.

Tabela 16. Sastav reakcione smeše za ispitivanje aktivnosti aromataze enzimskim testom u kom je korišćen kompleks aromataza-CPR iz jednog izvora.

Komponente reakcione smeše	Reakcija	Kontrola bez mikrozoama
Mikrozomi iz W(R) soja sa eksprimiranom aromatazom i kvašćevom CPR	43 µg	/
NADPH	100 µM	100 µM
Androstendion	80 µM	80 µM
Pufer 50 mM TrisHCl pH 7,4 1 mM EDTA	do 0,5 ml	do 0,5 ml

Tubice sa reakcionom smešom su postavljene u vodeno kupatilo i inkubirane 1 h na 37°C uz povremeno blago invertovanje. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 50 µl NaOH. Steroidi su ekstrahovani metilen-hloridom u dve porcije po 500 i 800 µl vorteksovanjem 3 min na maksimalnoj brzini. Donji, organski sloj, je nakon centrifugiranja u trajanju od 1 min na 13400 x g, prenet u čistu tubicu i uparen na sobnoj temperaturi do suva, a potom analiziran tankoslojnom hromatografijom.

Tabela 17. Sastav reakcione smeše za ispitivanje aktivnosti aromataze kuplovanim enzimskim testom.

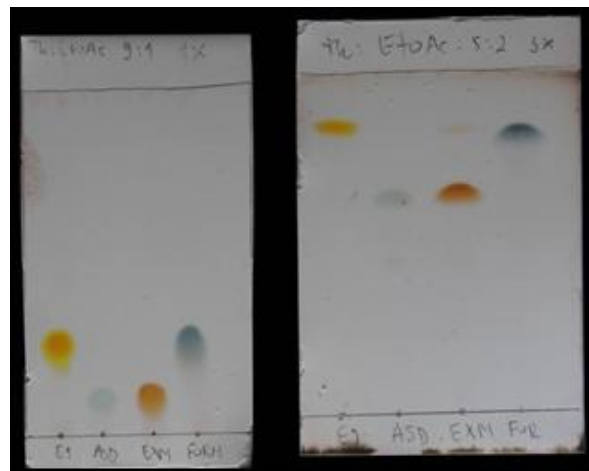
Komponente reakcione smeše	Reakcija	Kontrola bez aromataze	Kontrola bez supstrata	Kontrola bez mikrozoama	Reakcija sa inhibitorom	Reakcija bez inhibitora
Mikrozomi iz W(hR) soja sa eksprimiranom kvašćevom i humanom CPR	230-460 µg	460 µg	460 ug	/	920 µg	920 µg
Aromataza iz <i>Escherichia coli</i> DH5α soja	178 µg	/	178 µg	178 µg	178 µg	178 µg
NADPH	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
Androstendion/Testosteron	100 µM	100 µM	/	100 µM	100 µM	100 µM
100 mM K-fosfatni pufer pH 7,4 20% glicerol 0,1% Tween20	do 1ml	do 1ml	do 1ml	do 1ml	do 1ml	do 1ml
Inhibitor	/	/	/	/	300-1000 µM	/
DMSO	/	/	10 µl	/	/	3-10 µl

Tubice sa reakcionom smešom su postavljene u vodeno kupatilo i inkubirane 1 ili 2 h na 37°C uz povremeno blago invertovanje. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 50 µl NaOH. Steroidi su ekstrahovani sa 500 µl metilen-hlorida vorteksovanjem 3 min na maksimalnoj brzini.

Donji, organski sloj, je nakon centrifugiranja 1 min na 13400 x g, prenet u čistu tubicu i uparen na sobnoj temperaturi do suva, a potom analiziran tankoslojnom hromatografijom. Kod određivanja inhibitornog potencijala, aromataza je preinkubirana sa inhibitorom 30 min na 37°C kako bi se omogućilo njegovo vezivanje, a potom je inkubacija nastavljena još 2 h sa supstratom i ostalim komponentama reakcije. Takođe je ispitan efekat inhibitora na aktivnost aromataze bez preinkubacije, kao i da li je moguće umesto kompletno izolovanih mikrozoma koristiti lizat kao izvor CPR da bi se skratilo vreme izvođenja eksperimenta.

4.16.1. Detekcija proizvoda enzimske reakcije tankoslojnom hromatografijom

Među hromatografskim tehnikama za analizu steroida, tankoslojna hromatografija (*engl.* thin-layer chromatography, TLC) zauzima posebno mesto kao veoma ekonomična i brza tehnika razdvajanja sa granicom detekcije u nanomolarnom opsegu, koja, osim kvalitativne, omogućava i kvantitativnu denzitometrijsku analizu rezultata. Princip razdvajanja se zasniva na različitom afinitetu ispitivanih jedinjenja prema stacionarnoj i mobilnoj fazi [238]. Kao stacionarna faza, najčešće se koristi čvrst adsorbent, silika-gel, gde se optimalno razdvajanje steroidnih jedinjenja postiže sa



Slika 28. Tankoslojni hromatogrami estrona, androstendiona, eksemestana i formestana (sa leva na desno) u razvijama različite polarosti: toluen:etilacetat = 9:1 (levo) i toluen:etilacetat = 5:2, 3 puta razvijanje (desno).

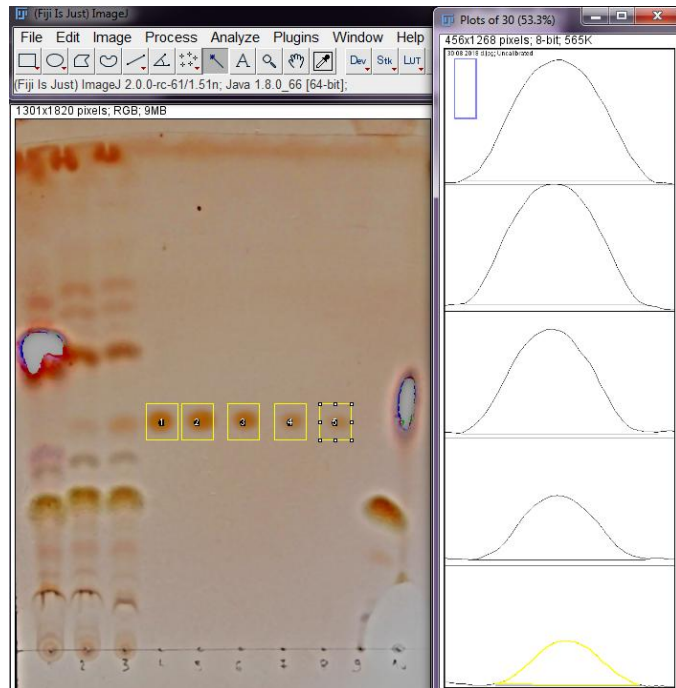
porama dijametra 50-60 Å, dok se kao mobilna faza koristi jedan ili smeša rastvarača različite polarosti. S obzirom na to da je silika-gel veoma polaran, polarnija jedinjenja će se duže zadržati na njemu, dok će kod razvijanja sa porastom udela nepolarnije komponente supstance sporije migrirati, i obrnuto (**Slika 28**). U slučaju lošeg razdvajanja, pločica može biti razvijena nekoliko puta. Fluorescentni neorganski indikator kojim je obeležen silika-gel omogućava da UV-aktivna steroidna jedinjenja budu vidljiva pod UV svetlošću u obliku tamnih mrlja sa smanjenom fluorescencijom, jer i sami apsorbuju na istoj talasnoj dužini. Ukoliko jedinjenja ne apsorbuju u ovom opsegu, vizuelizacija se omogućava različitim metodama derivatizacije [239].

Proizvodi enzimskog testa za ispitivanje aktivnosti aromataze i njenih inhibitora su nakon ekstrakcije organskim rastvaračem i uparavanja razdvojeni i detektovani TLC hromatografijom.

Upareni ostaci i referentna jedinjenja su rastvoreni u 50 μ l metilen-hlorida i naneti staklenim kapilarama na aluminijumsku TLC pločicu silika-gela 60 F₂₅₄ Merck. Razvijanje TLC hromatograma je izvršeno kapilarnim silama u smeši rastvarača toluen:etilacetat = 2:1 u kadici za razvijanje. Osušena pločica je posmatrana pod UV svetlošću i obeležene su lokacije UV-aktivnih jedinjenja, nakon čega je isprskana 50% sumpornom kiselinom i zagrejana na oko 80°C u cilju vizuelizacije ostalih jedinjenja. Na kraju su određeni retencioni faktori (R_f), tj. odnos pređenog puta supstance i fronta razvijaača, što je omogućilo pouzdaniju identifikaciju produkata enzimske reakcije i upoređivanje rezultata iz različitih eksperimenata.

4.16.1.1. Densitometrijska analiza TLC hromatograma

Za određivanje specifične enzimske aktivnosti aromataze, kao količine nastalog estranskog produkta u jedinici vremena po mg proteina, kvantifikacija TLC hromatograma je izvršena densitometrijskom analizom u ImageJ programu po metodologiji opisanoj u radu Olech-a i saradnika [240]. Nakon oduzimanja pozadinskog signala, mrlje koje potiču od estradiola u koncentracijama 25, 50, 75, 100 i 125 μ M su označene i određena je površina ispod pikova raspodele piksela različitih intenziteta (Slika 29), direktno proporcionalna koncentraciji supstance. U Origin Pro 8 programu je zatim kreirana standardna kriva iz koje je određena nepoznata koncentracija nastalog estradiola i specifična enzimska aktivnost aromataze.



Slika 29. Densitometrijska analiza TLC hromatograma u ImageJ programu.

4.16.2. Ispitivanje aktivnosti aromataze u tečnoj kulturi kvasaca bez izolacije mikrozoma

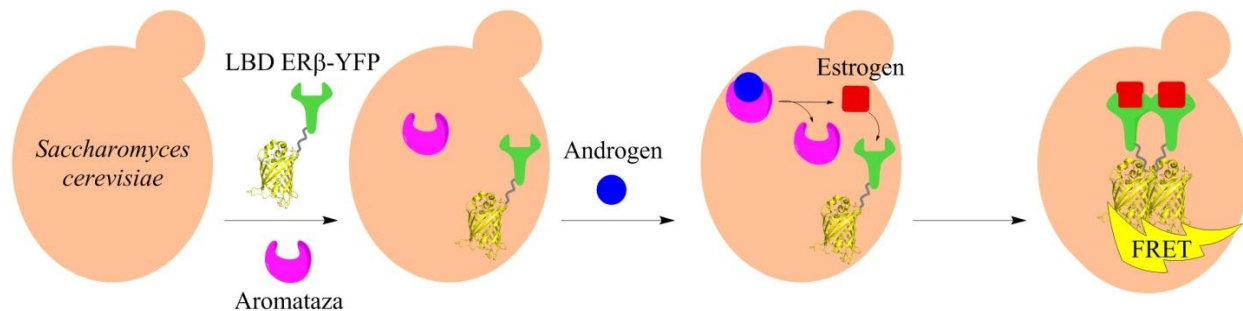
Tokom razvoja metode za ispitivanje aktivnosti aromataze, sa nastojanjem da se smanji broj eksperimentalnih koraka, testirana je mogućnost izvođenja enzimskog testa u tečnoj kulturi rekombinantnih kvasaca bez izolacije mikrozoma. Stepen biokonverzije steroida je određen po modifikovanom postupku Shkumatov-a i saradnika [241]. SD-leu medijum sa 2% glukoze je

inokuliran rekombinantnim ćelijama W(R) i W(hR) sojeva transformisanih pRS425-Arom plazmidnim konstruktom sa čvrstih podloga i one su gajene do zasićenja u inkubatoru na 25-28°C i 180 obrtaja/min. Kada je dostignuta vrednost OD_{600nm} oko 3, ćelije su razblažene na OD_{600nm} 0,1 u 20 ml svežeg SD-leu medijuma sa 2% galaktoze, dodat im je androstendion ili testosteron rastvoren u etanolu do finalne koncentracije od 200 µM i inkubirane su pod istim uslovima. Iz svakog erlenmajera je pre vraćanja u inkubator izdvojen alikvot od 2 ml (**0 h**), centrifugiran i iz supernatanta su ekstrahovani steroidi vorteksovanjem sa 4 ml metilen-hlorida u 8 ciklusa po 1 min. Organski sloj je uparen na sobnoj temperaturi. Isti postupak je ponovljen i za uzorke nakon 8, 24 i 48 h od indukcije (**8 h, 24 h, 48 h**). Uparene organske faze su rastvorene u 200 µl metilen-hlorida i u zapremini od 4 kapilare nanete na TLC pločicu. Razvijanje je izvršeno u smeši rastvarača toluen:etilacetat = 2:1, a vizuelizacija mrlja prskanjem 50% sumpornom kiselinom i zagrevanjem na rešou. TLC hromatogrami su fotografisani. Pod sličnim uslovima izveden je i eksperiment u kojem je istovremeno sa supstratom dodat 100 µM NADPH kofaktor, a ekspresija izvedena na višoj temperaturi nego u prvom slučaju, tj. na 36°C. Osim toga, ispitano je i kako liziranje ćelija staklenim kuglicama utiče na ekstrakciju produkata biokonverzije. Dalje, da bi se ustanovilo da li dolazi do degradacije steroida tokom 48 h inkubacije, kao kontrolni eksperiment umesto ćelija dodat je medijum. Od eksperimentalnih uslova takođe je ispitano i odsustvo indukcije ekspresije proteina galaktozom, primena soja koji ne eksprimira pojačano CPR (FY250), kao i W(R) soja bez unetog gena za aromatazu, da bi se proverio uticaj same CPR na biokonverziju. Neočekivano, na osnovu detektovane dominantne redukcije androstendiona u testosteron kod W(R) soja sa ekspimiranom aromatazom, pretpostavljeno je da je nativna, kvašćeva 17β-HSD odgovorna za ovu biokonverziju, te je kao kontrolni eksperiment ovaj enzim inhibiran dodavanjem ibuprofena u koncentraciji od 500 µM.

4.16.3. Kuplovani fluorescentni test za ispitivanje aktivnosti aromataze

Istraživanja u okviru razvoja testa za određivanje aktivnosti aromataze su tekla i u pravcu koekspresije LBD ERβ i aromataze u ćelijama kvasca, gde bi, zahvaljujući kuplovanom sistemu, umesto tankoslojne hromatografije produkti enzimski katalizovane reakcije bili detektovani fluorescentnim ćelijskim biosenzorom. Ukoliko bi heterologno ekspimirana aromataza bila funkcionalna, došlo bi do konverzije androgena u estrogene, njihovog vezivanja za ekspimirane LBD ERβ-YFP i mogao bi se detektovati FRET signal nastao usled dimerizacije i približavanja domena (**Slika 30**). Nakon transformacije FY250 soja pRF4-6-hERβ LBD-EYFP i pRS425-Aro

vektorima, sa master podloge su započete tečne kulture u 3 ml SD-leu-trp medijuma sa 2% rafinoze. Erlenmajer sa ćelijama je postavljen u inkubator na 28°C, 180 obrtaja/min preko noći. Sledećeg dana ćelije su razblažene na OD_{600nm} 0,15 i gajene bar dve generacije, tj. do OD_{600nm} 0,6 (oko 12 h), kada je izvršena indukcija ekspresije oba proteina dodavanjem galaktoze u finalnoj koncentraciji 2%. Kultura je 24 h nakon indukcije raspoređena u epruvete po 1 ml i dodati su steroidni hormoni u finalnoj koncentraciji od 10 µM, dok je u kontrolnu probu dodato samo 10 µl DMSO rastvarača. Ćelije su posmatrane pod fluorescentnim mikroskopom u različitim vremenskim intervalima nakon dodavanja steroidnih hormona. Na isti način testiran je i sistem gde su LBD ERβ i aromataza koekspimirani u W(hR) soju.



Slika 30. Princip kuplovanog fluorescentnog testa za ispitivanje aktivnosti aromataze.

4.16.4. Test oksidacije NADPH

Aktivnost rekombinantne aromataze u kompleksu sa CPR je ispitana i indirektno, praćenjem sposobnosti oksidacije NADPH kofaktora [242]. U mikrotitar ploču su dodati rekombinantna aromataza iz *Escherichia coli* DH5α soja (1,4 µM), mikrozomi iz W(hR) soja sa ekspimiranom kvaščevom i humanom CPR (76,5 µg) i testosteron (200 µM) u 100 mM K-fosfatnom puferu, pH 7,4; 20% glicerol, 0,1% Tween20. Ploča je preinkubirana u čitaču mikrotitar ploča 3 min na 37°C i A_{340nm} je snimana na svakih 10 sekundi u 15 ciklusa. Zatim je dodat NADPH kofaktor (200 µM) i nastavljeno merenje u kinetičkom modu u trajanju od oko 10 min na istoj temperaturi. Da bi se isključio uticaj komponenti iz prečišćenih proteina na oksidaciju NADPH, ispitane su kontrole u odsustvu aromataze ili mikrozoma.

4.17. Ispitivanje vezivanja liganada za aromatazu apsorpcionom spektroskopijom

Da bi se proverila funkcionalnost aromataze prečišćene Ni-afinitetnom i gel filtracionom hromatografijom za dalje enzimske testove i odlučilo koje frakcije spojiti prilikom zamrzavanja

proteina, snimljen je apsorpcioni spektar hema u opsegu 250-650 nm. Kada je utvrđeno da enzim pokazuje karakterističan Soretov pik na oko 416-418 nm, pristupilo se ispitivanju vezivanja liganada metodom apsorpcione spektroskopije. Uzorak proteina koncentracije oko 16 μM je ispipetiran u mikrotitar ploču u zapremini od 100-150 μl , a kao slepa proba korišćen je pufer bez proteina u istoj zapremini. Apsorpcioni spektar u opsegu 250-650 nm je snimljen na Thermo Scientific Multiskan GO spektrofotometru na temperaturi 25°C. Nakon toga u oba bunarića je dodato po 1-5 μl 10 mM supstrata aromataze, androstendiona, i ponovo snimanjen spektar pod istim uslovima odmah ili 10-15 min nakon dodavanja jedinjenja i inkubacije na 25°C. Da bi se efekat vezivanja uporedio sa proteinom u odsustvu liganda, isti postupak je ponovljen sa DMSO rastvaračem umesto rastvora androstendiona. Eksperimenti su ponovljeni sa različitim koncentracijama supstrata, inhibitora eksemestana i formestana, sildenafili i nekoliko modifikovanih steroida (kao i dva nesteroidna jedinjenja). Apsolutni spektri su obrađeni u Origin Pro 8 i Excel programima oduzimanjem vrednosti slepe probe od uzorka, kao i korigovanjem bazne linije. Promene položaja Soretovog pika, odnosno pomeranja, su praćena upoređivanjem apsorpcionih maksimuma među apsolutnim spektrima proba sa i bez liganda, a oduzimanjem ovih spektara dobijeni su diferencijalni spektri.

4.18. Ispitivanje vezivanja liganada za aromatazu fluorescentnom spektroskopijom

Fluorescentnom spektroskopijom je ispitano vezivanje za aromatazu onih steroidnih jedinjenja koja su prethodno pokazala značajno pomeranje Soretovog pika. S obzirom na to da se tehnika zasniva na praćenju promena u fluorescentnom spektru triptofana nakon vezivanja liganda za protein, talasna dužina ekscitacije je podešena na 295 nm, a emisionog spektra na 300-450 nm, kako bi se selektivno pratila samo ova aromatična aminokiselina. Zbog visokog udela glicerola, koji može da utiče na spektroskopska merenja, a neophodan je za stabilnost CYP 450 proteina, štok rastvor aromataze u 100 mM K-fosfatnom puferu, pH 7,4; 20% glicerol, 0,1% Tween20 je razblažen do koncentracije 0,1 μM u 50 mM K-fosfatnom puferu istog pH i takav korišćen za merenja. U dve kvarcne kivete je dodato po 1 ml razblaženog rastvora proteina i fluorescentni emisioni spektri su snimljeni na spektrofluorimetru Shimadzu RF-1501, a zatim je izvedena spektrofotometrijska titracija sa po 2 μl ispitivanog steroidnog jedinjanja (koncentracije 10 mM) u jednu i rastvarača DMSO u drugu, referentnu kivetu, u 10 ciklusa. Zbog vremenske ograničenosti neka jedinjenja su titrovana u samo dve zapremine, 10 i 20 μl . Kako bi se isključio

fenomen prigušivanja ekscitacionog ili emisionog zraka (*engl.* inner filter effect) samih jedinjenja, snimljeni su njihovi apsorpcioni spektri u opsegu 250-450 nm i korigovana vrednost fluorescencije ($F_{\text{korigovano}}$) je izračunata po sledećoj formuli:

$$F_{\text{korigovano}} = F_{\text{izmereno}} \cdot 10^{\frac{OD_{\text{ex}} + OD_{\text{em}}}{2}}$$

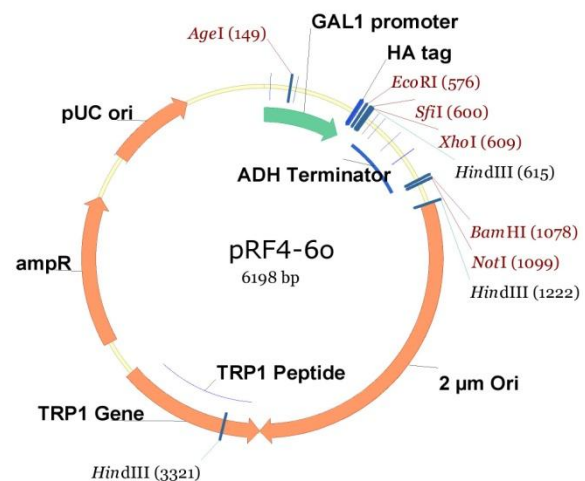
Rezultati su prikazani kao fluorescentni spektri i kao zavisnost intenziteta korigovane fluorescencije od koncentracije dodatog liganda kao titranta.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Kod procesa otkrivanja novih lekova za lečenje bolesti zavisnih od koncentracije steroidnih hormona, biološki testovi za preliminarni skrining biološke i/ili farmakološke aktivnosti jedinjenja su od izuzetnog značaja, pa je cilj ove doktorske disertacije bio upravo razvoj takvih testova. Poređenjem dobijenih rezultata sa objavljenim rezultatima drugih istraživača stavljen je akcenat na prednosti optimizovanih bioloških testova, kao i na značaj identifikovane biološke aktivnosti ispitivanih jedinjenja. Korelacijom afiniteta vezivanja za steroidne receptore, citotoksičnosti prema odabranim tumorskim ćelijskim linijama i *in silico* određenim energijama vezivanja omogućen je bolji uvid u potencijalni mehanizam delovanja odabranih jedinjenja. Dodatni korak u boljem razumevanju načina delovanja testiranih modifikovanih steroida i njihove potencijalne uloge u tretmanu hormon-zavisnih bolesti predstavljalo je ispitivanje afiniteta vezivanja za humanu rekombinantnu aromatazu i inhibiciju njene aktivnosti.

5.1. Pregled korišćenih plazmidnih konstrukata

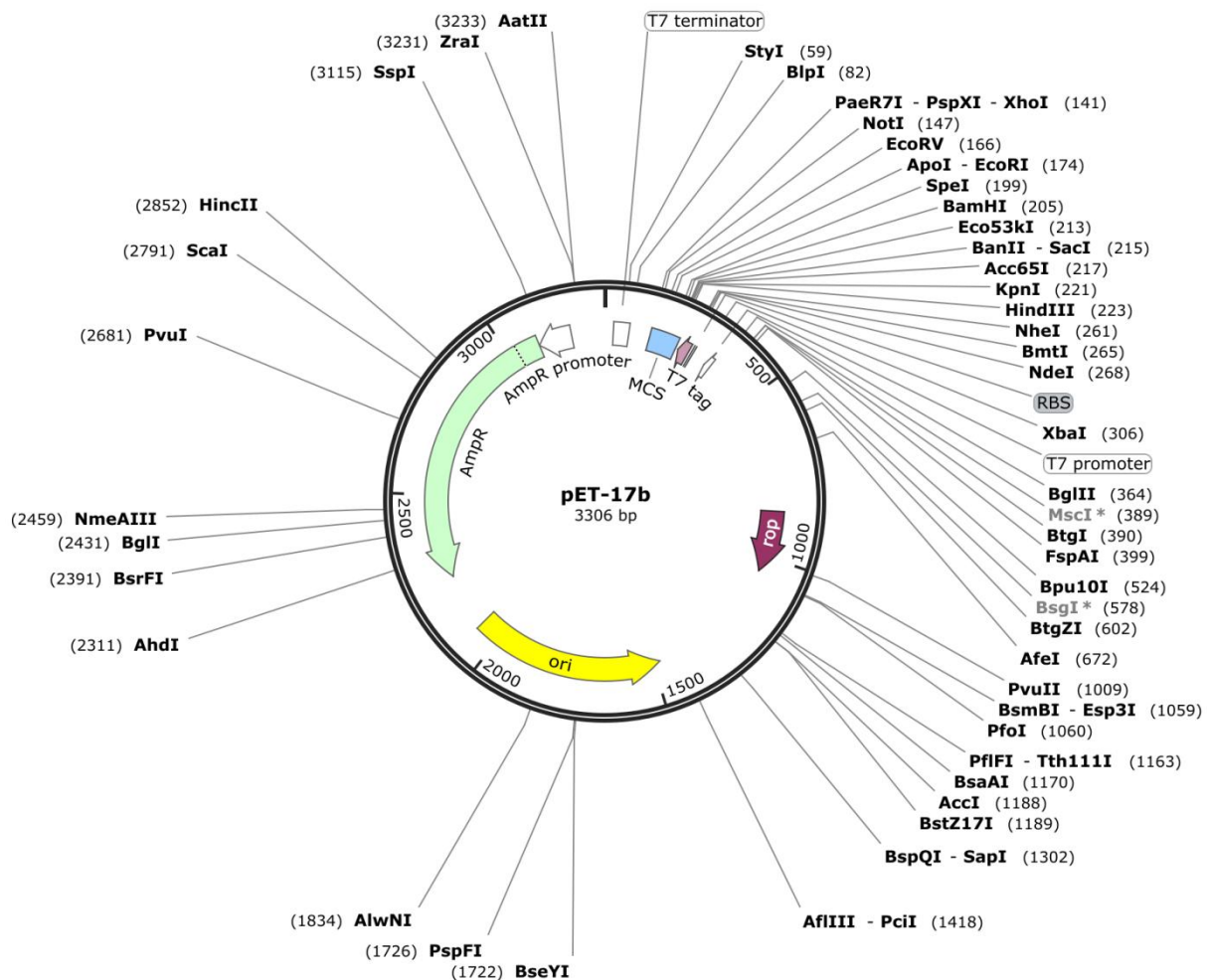
Muddana i Peterson su konstruisali plazmide za fluorescentni ćelijski senzor na način opisan u nastavku. PCR reakcijom kreirana su mesta prepoznavanja restrikcionih endonukleaza *EcoRI* i *SalI* na 5', odnosno 3' krajevima fragmenata DNK koji kodiraju humane ER α , ER β i AR LBD. Na taj način dobijeni su konstrukti 5'-*EcoRI*-LBD receptora-*SalI*-Stop-*XhoI*-3', a nativna mesta sečenja ove dve nukleaze, koja se nalaze unutar gena, uklonjena su uvođenjem tihih mutacija. Ista restrikciona mesta dodata su na



Slika 31. Mapa pRF4-6 vektora [301].

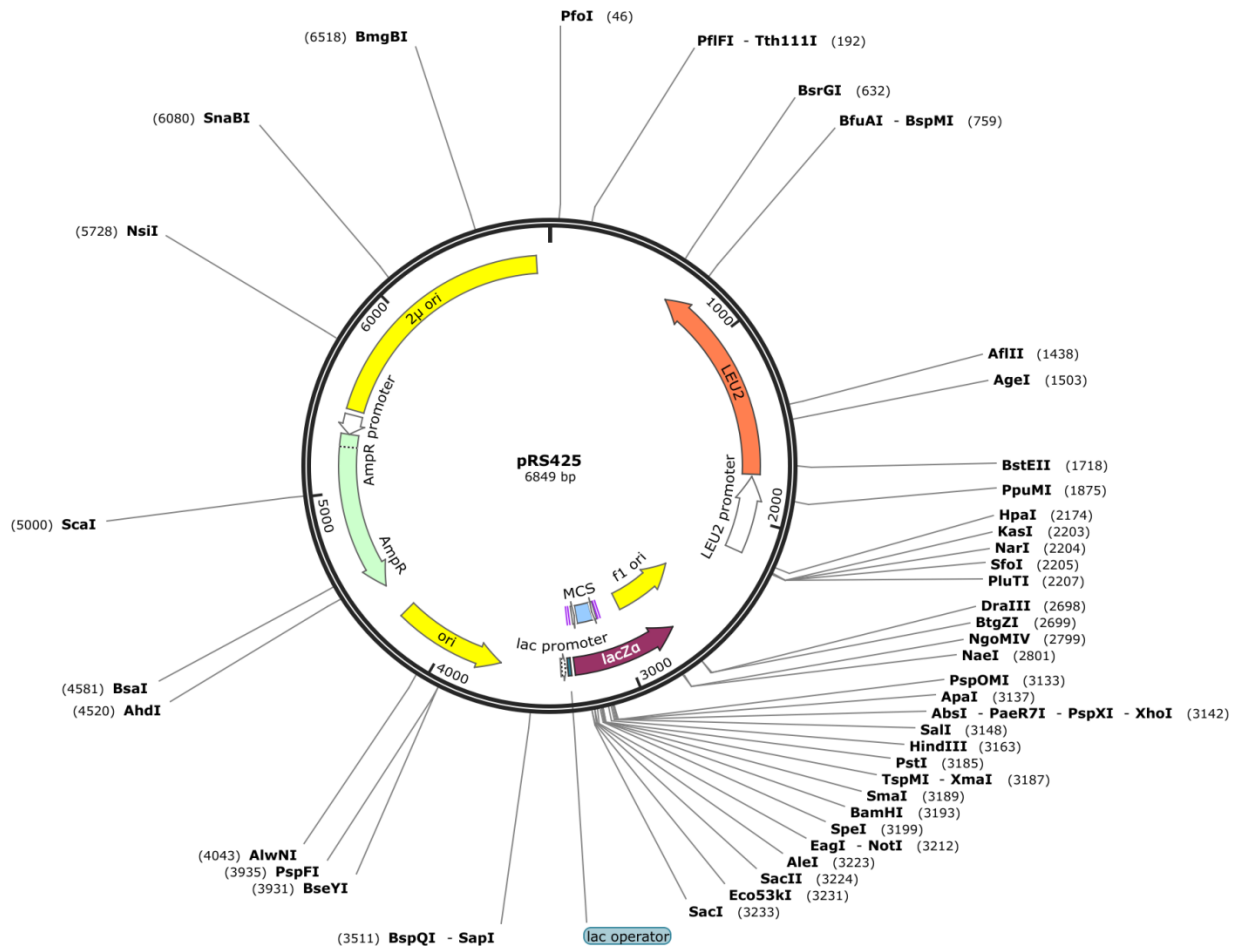
krajeve EYFP gena 5'-*EcoRI*-EYFP-*SalI*-Stop-*XhoI*-3', izvršena je digestija sa *EcoRI* i *SalI* i kloniranje u kvašćev vektor pRF4-6 isečen sa *EcoRI* i *XhoI* uz zamenu postojećeg aktivacionog domena HA epitop tagom na N-terminusu. Ovaj vektor (Slika 31), veličine oko 6 kbp, poseduje *TRP1* marker, odnosno kopiju ispravnog *trp1* gena bez mutacija, koji omogućava ćelijama preživljavanje na podlozi bez navedene aminokiseline i GAL1 promotor. Sečenjem ovog vektora i 5'-*EcoRI*-LBD receptora-*SalI*-Stop-*XhoI*-3' umnoženog fragmenta DNK sa *EcoRI* i *SalI*

enzimima i njihovom ligacijom dobijen je plazmid za fluorescentni ćelijski senzor korišćen u daljim eksperimentima [80].



Slika 32. Mapa pET-17b vektora [243].

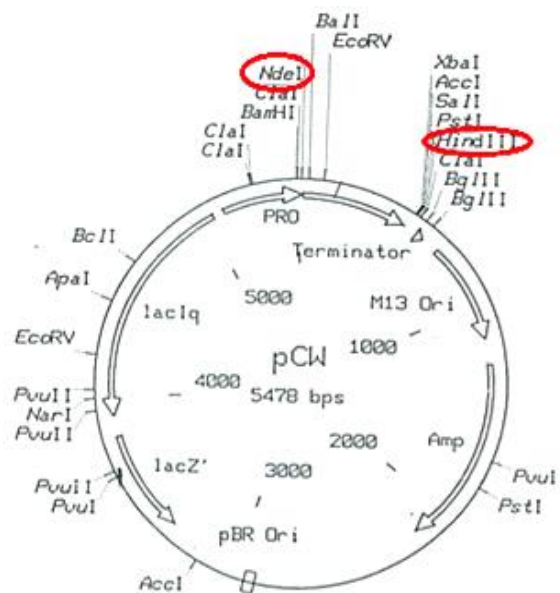
Norio Kagawa je opisao modifikacije sekvence humane aromataze [244,245] kojima se postiže visok nivo njene ekspresije u *Escherichia coli*. Ključ je u skraćivanju sekvence na N-terminusu, odgovorne za membransko usidranje proteina, i zameni regiona bogatog baznim aminokiselinama odgovarajućim regionom iz CYP2C11 pacova. Nakon translacionog start kodona ATG, dodat je GCT (Ala), čime su dobijeni 2cA konstrukti. Kloniranje ove sekvence u pET-17b vektor (Slika 32), isečen sa *NdeI* i *HindIII*, rezultovalo je dizajnom 2cArpET. Između ostalog, da bi se olakšalo prečišćavanje aromataze niz od 4 histidinska ostatka dodat je uzvodno od STOP kodona na C-terminusu.



Slika 33. Mapa pRS425 vektora [246].

Da bi se ovako modifikovan gen za humanu aromatazu mogao heterologno eksprimirati u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* bilo je neophodno klonirati ga u vektor namenjen za ekspresiju proteina u kvascima, kao na primer YE_p-Rgal (pRS425, Slika 33) koji odlikuje inducibilna ekspresija galaktozom, veliki broj kopija i *LEU2* selektivni marker. Direktno kloniranje aromataze je izvršeno sa *SpeI* i *NotI* restrikcionim endonukleazama, pri čemu je dobijen pRS425-Aro ekspresioni vektor [247].

Nardo i saradnici su cDNK humane

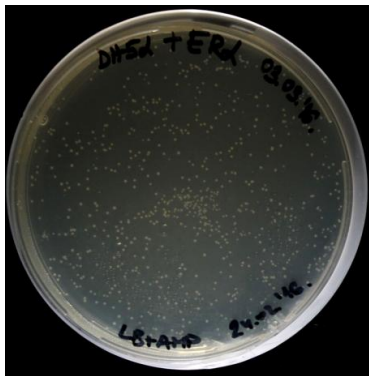
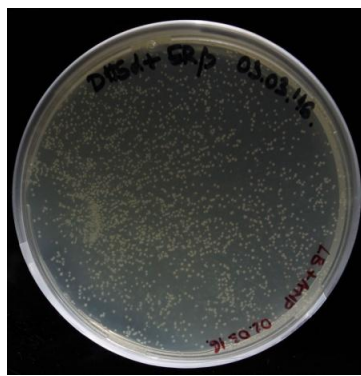
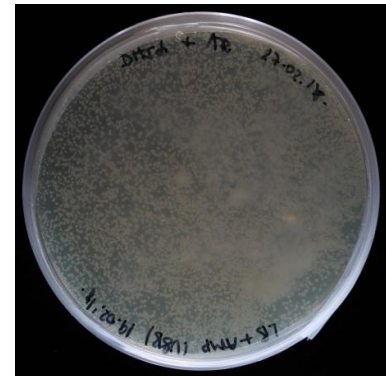
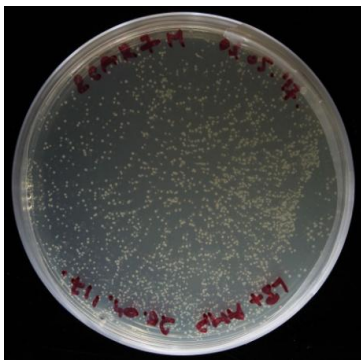
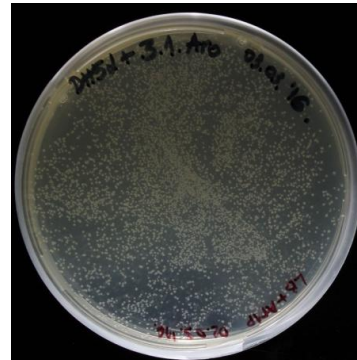
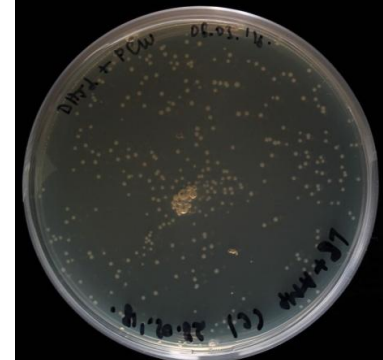


Slika 34. Mapa pCW vektora [302].

aromataze modifikovali zamenom prvih 39 N-terminalnih aminokiselinskih ostataka lancem od 10 hidrofилnih aminokiselina, od kojih su 3 lizinska ostataka, dok su na C-terminus uveli 4 histidinska ostataka i time omogućili prečišćavanje ekspresovanog proteina afinitetnom hromatografijom. Gen koji omogućava ekspresiju rastvorljive aromataze je direktno kloniran između *NdeI* i *HindIII* restrikcionih mesta u pCW ori+ vektoru (Slika 34) sa IPTG inducibilnim Tac promotorom i genom za otpornost na ampicilin [159,205].

5.2. Verifikacija korišćenih plazmidnih konstrukata agaroznom elektroforezom nakon prečišćavanja iz DH5 α ćelija

Transformacija kompetentnih DH5 α ćelija opisanim plazmidima, od kojih svaki nosi gen za rezistentnost na ampicilin, je uspešno izvršena metodom toplotnog šoka, pri čemu su ćelije koje su usvojile stranu DNK selektovane na LB ampicilinskim podlogama (Slika 35).

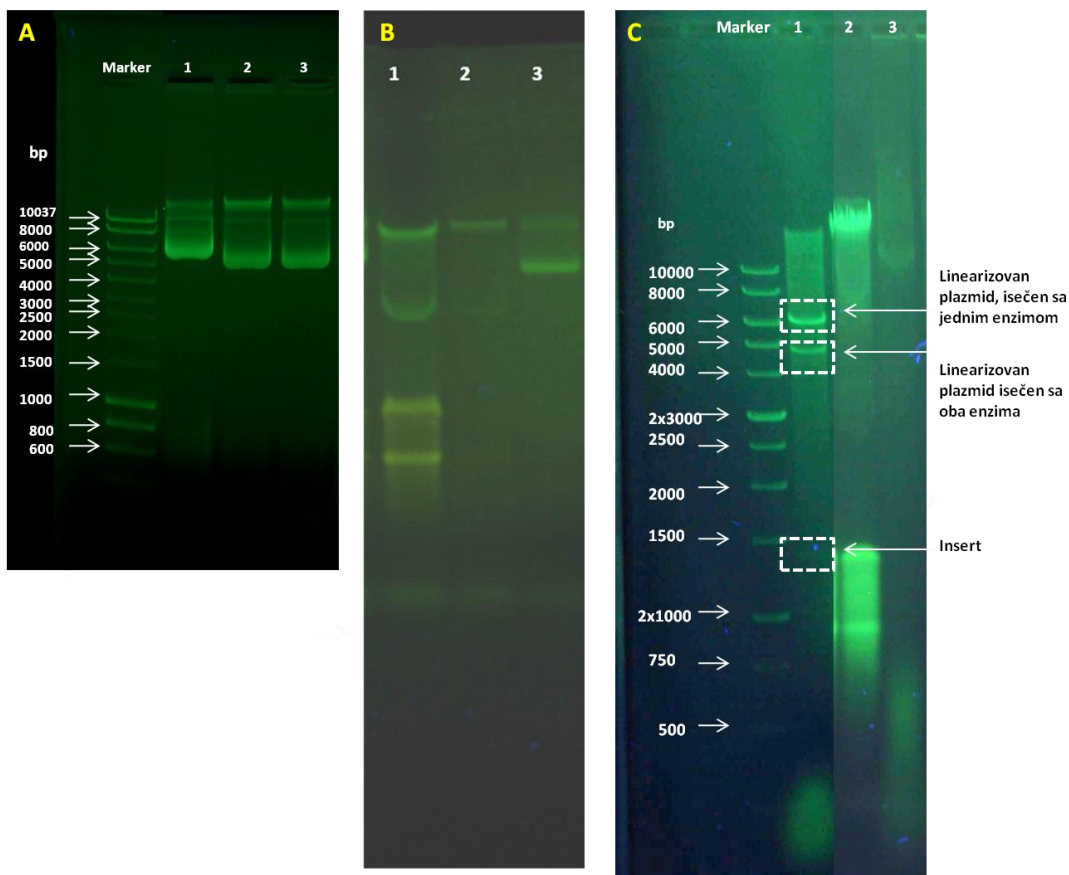
DH5 α + pRF4-6-hER α LBD-EYFPDH5 α + pRF4-6-hER β LBD-EYFPDH5 α + pRF4-6-hAR LBD-EYFPDH5 α + 2cAr-pETDH5 α + pRS425-AroDH5 α + pCWori+ Arom

Slika 35. DH5 α ćelije transformisane plazmidima korišćenim u disertaciji metodom toplotnog šoka nakon 16-18 h inkubacije na 37°C na LB podlogama sa 100 μ g/ml ampicilina.

Na podlozi zasejanoj ćelijama kojima je umesto plazmidne DNK u smešu za transformaciju dodata sterilna voda (negativna kontrola), kao što je i očekivano, nisu uočene kolonije, jer ove ćelije nemaju sposobnost preživljavanja na antibiotskoj podlozi. Prinos i kvalitet

plazmida prečišćenih iz rekombinantnih DH5 α ćelija metodom alkalne lize upotrebom silika-gela i/ili Qiagen kolonica analiziran je agaroznom elektroforezom.

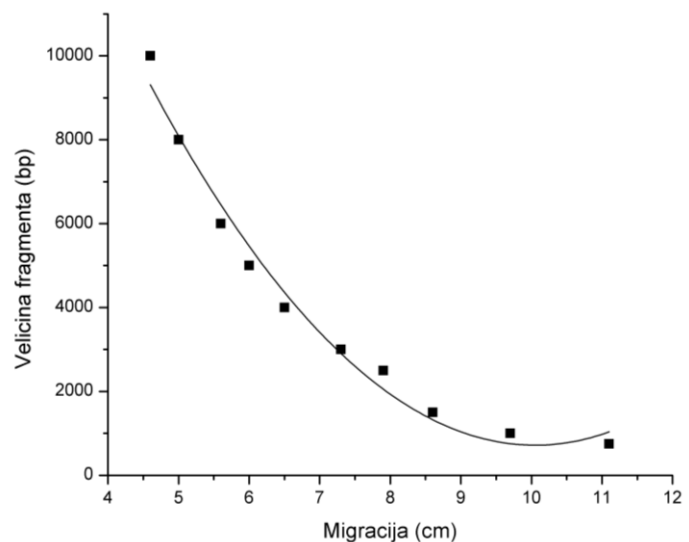
Plazmidi sa identičnom sekvencom se mogu javiti u nekoliko različitih konformacija, što se na gelu manifestuje razlikama u pređenim rastojanjima. Najčešće zastupljen nativni oblik je superspiralizovani, kako bi bilo omogućeno kompaktnije pakovanje u ćeliji, zatim, usled mehaničkog ili enzimskog raskidanja jednog lanca ovih cirkularnih dvolančanih molekula DNK, nastaje „zarezana“ (*engl.* nicked) forma, a dejstvom restrikcionih enzima koji seku oba lanca na specifičnim mestima prepoznavanja plazmidna DNK dobija linearizovani oblik. Kada je neophodno precizno odrediti veličinu plazmida, on mora biti linearizovan kako bi rastojanje na gelu koje pređe bilo stvarno i uporedivo sa DNK fragmentima markera poznate veličine. Elektroforetska mobilnost opisanih formi je superspiralizovana > linearizovana > „zarezana“, a osim ovih monomernih oblika, plazmidi se mogu javiti i u oligomernim formama [248].



Slika 36. Panel 1% agaroznih gelova sa midori zelenom bojom nakon razdvajanja plazmida prečišćenih iz DH5 α ćelija. Gel A: marker, 1-pRS425-Aro (silika-gel), 2-pRF4-6-hER α LBD-EYFP (silika-gel), 3-pRF4-6-hER β LBD-EYFP (silika-gel); Gel B: 1-2cAr-pET (Qiagen kolonica), 2-2cAr-pET (silika-gel), 3-pRF4-6-hAR LBD-EYFP (silika-gel); Gel C: marker, 1-pCWori+ Arom isečen sa *HindIII* i *NdeI* (Qiagen kolonica), 2-pCWori+ Arom (Qiagen kolonica), 3-pCWori+ Arom (silika-gel).

Na agaroznom gelu A u okviru panela **Slike 36.** u kolonama 1, 2 i 3 su vidljive trake koje odgovaraju plazmidima pRS425-Aro, pRF4-6-hER α LBD-EYFP i pRF4-6-hER β LBD-EYFP, prečišćenim upotrebom silika-gela. Na osnovu njihovog jakog intenziteta može se zaključiti da su dobijeni u visokom prinosu. Rastojanja na kojima su se ovi molekuli zadržali odgovaraju manjem broju baznih parova (bp) od očekivanih, što sugeriše zauzimanje superspiralizovane konformacije, koja brže i sa manjim otporom prolazi kroz gel. Prisustvo trećeg plazmida iz istog seta, pRF4-6-hAR LBD-EYFP, se vidi na gelu B u koloni 3, u nešto manjoj količini. Trake na položajima 1 i 2 ovog gela odgovaraju 2cAr-pET plazmidu prečišćenom pomoću Qiagen kolonice i silika-gela, respektivno. Bolje prečišćavanje je postignuto u prvom slučaju, međutim, razmaz na dnu gela označava da je verovatno prisutna i kontaminacija sa RNK.

Na agaroznom gelu C prikazani su produkti restrikcione digestije pCWori+ Arom plazmida enzimima *HindIII* i *NdeI* (kolona 1). Na slici su označeni restrikcioni fragmenti koji odgovaraju linearizovanom plazmidu isečenom najverovatnije jednim restrikcionim enzimom, zatim linearizovanom plazmidu kompletno isečenom sa oba restrikciona enzima, odnosno „otvorenom vektoru“, i insertu DNK. Veličine ovih fragmenata DNK su određene na osnovu standardne krive



Slika 37. Zavisnost rastojanja DNK fragmenata markera od njihove veličine kao standardna kriva za određivanje nepoznate veličine linearizovanih fragmenata DNK.

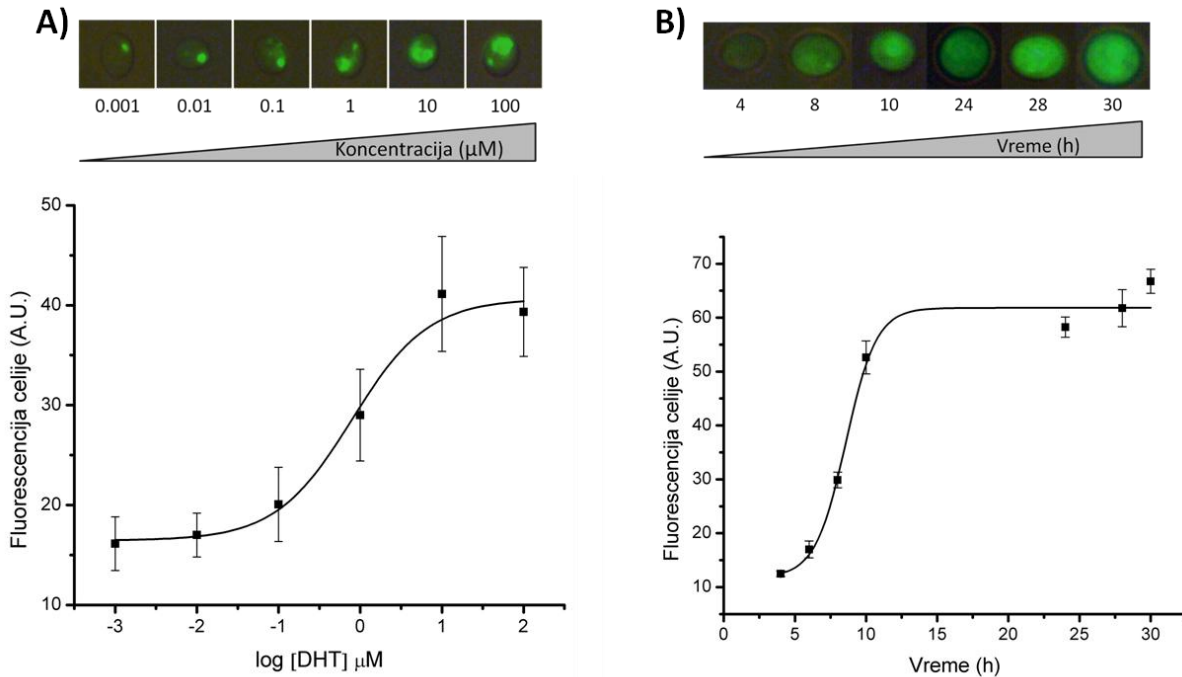
(**Slika 37**), pri čemu je predviđena veličina inserta DNK bila u skladu sa eksperimentalno određenom. Na ovaj način je potvrđeno da se radi o ispravnom plazmidnom konstrukturu sa kojim su nastavljeni dalja istraživanja. Kolone 2 i 3 predstavljaju isti neisečeni plazmid prečišćen upotrebom kolonice i silika-gela, respektivno, pri čemu je fluorescencija trake prvog intenzivnija i označava da je za prečišćavanje ovog plazmida poželjno koristiti Qiagen protokol.

5.3. Optimizacija netranskripcionog fluorescentnog testa u kvascu za detekciju liganada steroidnih receptora

Upotrebom protočne citometrije, fluorescentni ćelijski biosenzor pokazuje osetljivost sličnu transkripcionom testu u kvascu za poznate ligande ER α i AR, međutim osetljivost neophodna za biološku karakterizaciju sintetskih steroida je manja u odnosu na biomedicinske i uzorke iz životne sredine. Stoga je ovde izvršena optimizacija testa za brzu procenu afiniteta vezivanja steroidnih derivata za steroidne receptore upotrebom standardne laboratorijske opreme: fluorescentnom mikroskopijom ili spektroskopijom.

Prethodna istraživanja sugerišu da D-seko steroidni derivati **1-4** mogu ispoljiti antiproliferativnu (**1**) ili antiestrogenu (**2-4**) aktivnost [67,182–184,249]. Da bi se procenio relativni afinitet vezivanja ovih i drugih derivata steroidnih hormona za ER α , ER β i AR, u okviru ove doktorske disertacije optimizovan je netranskripcioni fluorescentni test u kvascu, koji su razvili Muddana i Peterson, kojim se direktno meri vezivanje liganada za LBD steroidnih receptora [80]. Često je cilj sinteze kreiranje steroidnih jedinjenja koja se ne vezuju za ER ili AR, kako bi se redukovala nespecifična aktivacija ovih signalnih puteva, kao na primer kod dizajna steroidnih inhibitora aromataze ili 17 α -hidroksilaza/17,20-lijaze. Stoga se rezultati ovog testa u kombinaciji sa rezultatima drugih testova za ispitivanje biološke aktivnosti mogu iskoristiti za usmeravanje daljeg toka organske sinteze, prepoznavanjem važnih farmakofora.

LBD ER α , ER β ili AR spojeni sa YFP proteinom su eksprimirani u kvascu pod kontrolom GAL1-inducibilnog promotora i njihovo prisustvo u ćelijama detektovano i kvantifikovano na dva načina fluorescentnom mikroskopijom i spektroskopijom. S obzirom na to da vezivanje liganada može stabilizovati savijanje LBD-YFP proteina tokom ekspresije [80], testirani ligandi su dodati istovremeno sa galaktozom, čiji je zadatak indukcija ekspresije YFP-a. Intenzitet fluorescencije ćelija nakon simultanog dodavanja testiranog liganda i galaktoze bio je viši u odnosu na situaciju kada su dodati u različito vreme. Kao što se može videti sa **Slike 38.**, gde je koncentracija prikazana na logaritamskoj skali, intenzitet fluorescencije ćelije raste sigmoidalno, dostižući saturaciju na 100 μ M (**Slika 38.A**). Sa druge strane, nakon dodavanja optimalne koncentracije (10 μ M) testiranog liganda, intenzitet fluorescencije ćelija raste sa porastom vremenskog intervala izloženosti, dostižući saturaciju nakon 15 h (**Slika 38.B**). Na osnovu dobijenih rezultata odlučeno je da u budućim testovima vezivanja modifikovanih steroida optimalna koncentracija potencijalnog liganda bude 10 μ M, a vreme izloženosti 14-16 h.



Slika 38. A) Dozno-zavisna kriva: promena u fluorescenciji kvašćevih ćelija ($n=15$) koje eksprimiraju AR LBD-YFP nakon 16 h izloženosti ligandu AR, DHT, u šest različitih koncentracija (0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 i 100 μM).

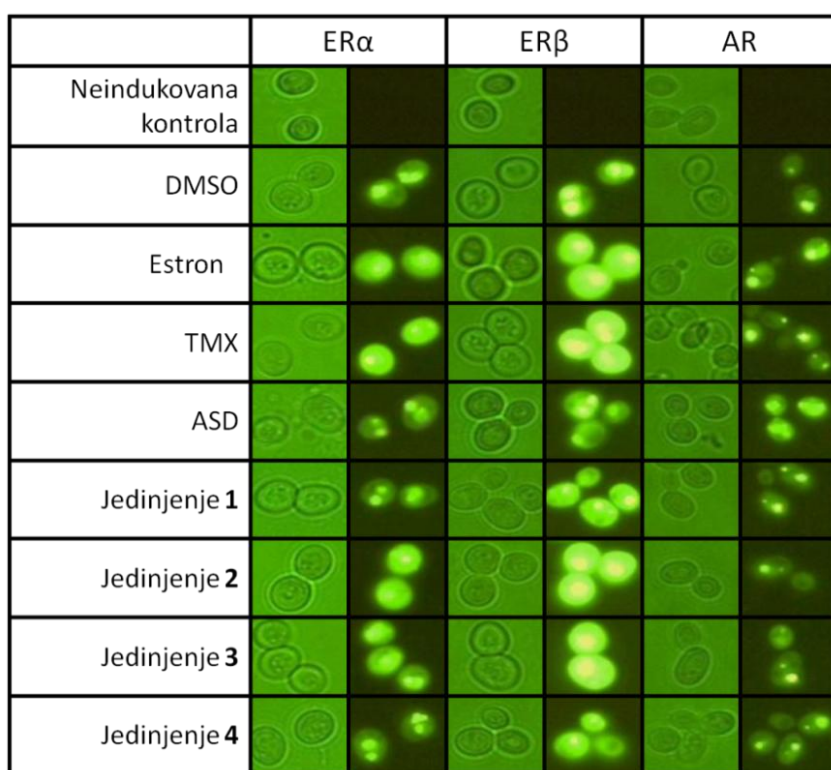
Koncentracioni opseg na x osi je dat u logaritamskoj skali; B) Vremenski zavisna promena u fluorescenciji kvašćevih ćelija ($n=8$) koje eksprimiraju ER β LBD-YFP u prisustvu ER liganda, E2, u finalnoj koncentraciji 10 μM . U oba slučaja srednja vrednost fluorescencije ćelija je određena analiziranjem fluorescentnih slika denzitometrijom u ImageJ programu. Podaci su fitovani u Origin Pro 8 programu upotrebom sigmoidalne funkcije, a odstupanja predstavljaju standardne greške srednje vrednosti [180].

5.3.1. Merenje relativnog afiniteta vezivanja liganada za ER α , ER β i AR fluorescentnom mikroskopijom živih ćelija

Na **Slici 39.** prikazani su mikrografi dobijeni svetlosnom i fluorescentnom mikroskopijom ćelija koje eksprimiraju ER α LBD-YFP, ER β LBD-YFP i AR LBD-YFP, tretiranih različitim prirodnim ligandima i ispitivanim jedinjenjima. U odsustvu galaktoze (neindukovana kontrola), fluorescencija nije detektovana, dok je bazalna fluorescencija YFP-a uočena u određenom vremenskom periodu nakon indukcije ekspresije galaktozom. Odsustvo liganada (kontrola sa DMSO-om) je rezultovalo lokalizovanim fluorescentnim signalom za sve konstrukte, najmanje intenzivnim kod AR LBD-YFP.

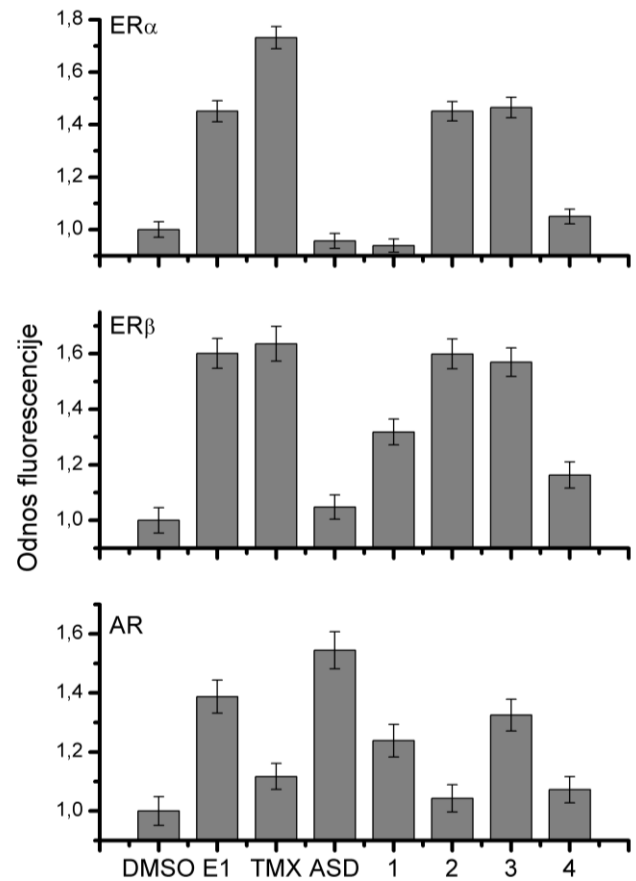
Ćelije sa eksprimiranim ER α ili ER β LBD su tretirane estronom i tamoksifenom, kao ligandima visokog afiniteta (pozitivna kontrola) i upoređene su sa istim ćelijama izloženim androstendionu, steroidu za koji je očekivano da ima nizak afinitet vezivanja za obe izoforme ER (negativna kontrola). Za ćelije sa eksprimiranim LBD AR androstendion je korišćen kao pozitivna kontrola, a za tamoksifen i estron je pretpostavljeno da su ligandi niskog afiniteta. Sa

Slika 39. se jasno može videti da je dodavanje liganada visokog afiniteta ćelijama koje ekspimiraju odgovarajući receptor dovelo do velikog porasta intenziteta fluorescencije i vidljive promene u distribuciji YFP-a u ćeliji. U saglasnosti sa prethodnim zapažanjima, proces vezivanja liganda uzrokovao je promenu ćelijske lokalizacije YFP proteina iz intracelularnih organela (verovatno endoplazmatičnog retikuluma) u citoplazmu [80], obezbeđujući brzu kvalitativnu meru potencijalne bioaktivnosti ispitivanih jedinjenja fluorescentnom mikroskopijom. Kako bi se kvantifikovao afinitet vezivanja jedinjenja **1-4** za LBD obe izoforme ER i AR, fluorescentni mikrografi ćelija su analizirani denzitometrijom u ImageJ programu [216] i afinitet je izražen kao relativna fluorescencija (**Slika 40**).



Slika 39. Reprezentativni mikrografi pod svetlosnim i fluorescentnim mikroskopom rekombinantnih ćelija kvasaca koje ekspimiraju ER α LBD-YFP, ER β LBD-YFP i AR LBD-YFP tretiranih sa DMSO-om (DMSO), estronom, tamoksifenom (TMX), androstendionom (ASD) ili testiranim jedinjenjima **1-4** u finalnoj koncentraciji 10 μ M između 14 i 16 h i neindukovanih ćelija (neindukovana kontrola). Svi fluorescentni mikrografi su uslikani sa identičnim vremenom ekspozicije od 500 ms upotrebom FITC filtera. Intenzitet fluorescencije ćelije korelira sa relativnim afinitetom vezivanja liganda za ove receptore [180].

Jako vezivanje estrona i tamoksifena za ER α i ER β , sa fluorescencijom 1,5-1,7 puta jačom u odnosu na kontrolu sa DMSO-om potvrđuje validnost testa. Na sličan način, jako vezivanje za AR je pokazao androstendion, sa odnosom fluorescencije 1,5. Tamoksifen nije pokazao afinitet vezivanja za ovaj tip receptora, međutim iznenađujuće je to što je detektovano vezivanje estrona. Dobijeni rezultat je u saglasnosti sa prethodnim tvrdnjama da ovaj estrogen može delovati kao slab agonist AR signalnog puta u YAS testu [250]. Kvantifikacijom rezultata dobijenih fluorescentnom mikroskopijom, može se zaključiti da se jedinjenja **1-4** vezuju znatno slabije za LBD AR od androstendiona. U isto vreme, jedinjenja **2** i **3** su se vezala sa sličnim afinitetom kao tamoksifen i estron za obe izoforme ER, što je u skladu sa objavljenom antiestrogenom aktivnošću ovih jedinjenja u uterotropnim testovima [183,184].

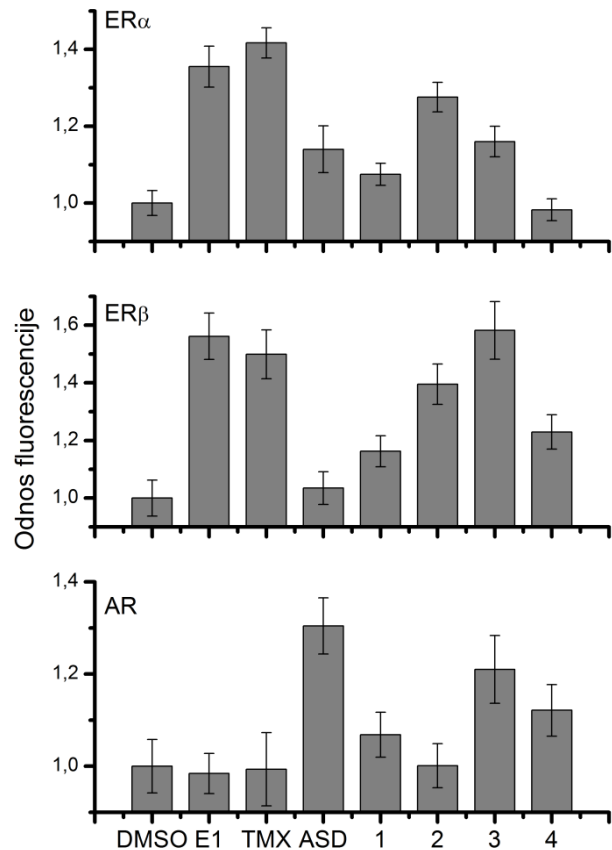


Slika 40. Odnos fluorescencije ćelija koje eksprimiraju ER α LBD-YFP, ER β LBD-YFP i AR LBD-YFP u prisustvu i odsustvu liganda (DMSO) izmeren fluorescentnom mikroskopijom. Ova vrednost je izračunata na osnovu intenziteta fluorescencije po ćeliji nakon 14-16 h izloženosti ligandima u finalnoj koncentraciji 10 μ M i 1% DMSO-u u kontrolnoj probi. Više vrednosti odgovaraju jačem afinitetu vezivanja. Slike su analizirane denzitometrijski upotrebom besplatnog ImageJ programa. Histogrami su kreirani u Origin Pro 8. programu, a odstupanja predstavljaju propagirane standardne greške srednje vrednosti, na osnovu analize 50 ćelija za svaki uzorak [180].

5.3.2. Merenje relativnog afiniteta vezivanja liganada za ER α , ER β i AR fluorimetrijom u pločama sa 96 polja

Da bi se ispitalo da li fluorescentni ćelijski biosenzor može da se primenjuje u skrining testovima visokog kapaciteta (HTS), isti eksperimenti su ponovljeni korišćenjem fluorimetrijske metode, pri čemu je merena fluorescencija celih, neliziranih ćelija u pločama sa 96 polja. Rekombinantne ćelije su tretirane ispitivanim ili kontrolnim ligandima tokom 14-16 h i intenzitet fluorescencije živih ćelija je izmeren u standardnim polistirenskim pločama sa 96 bunarića.

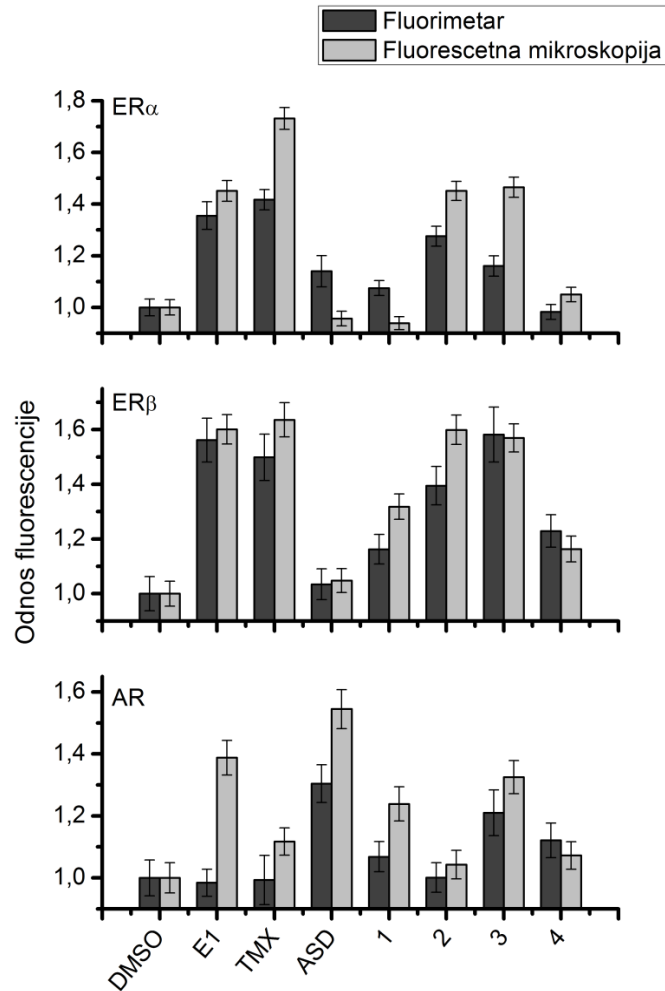
Afinitet vezivanja za ER α , ER β i AR je i ovde izražen kao relativna fluorescencija, tj. odnos fluorescencije ćelija tretiranih ligandom i DMSO rastvaračem normalizovan za optičku gustinu tretiranih i fluorescenciju neindukovanih ćelija. Da je test funkcionalan i u formatu ploče jasno je sa histograma prikazanih na **Slici 41.**, gde je jako vezivanje estrona i tamoksifena za obe izoforme ER i eksperimentalno potvrđeno merenjem 1,4-1,6 puta jače fluorescencije ćelija tretiranih ovim ligandima u odnosu na kontrolu, dok je vezivanje androstendiona za AR rezultovalo 1,3 puta jačom fluorescencijom u odnosu na ćelije izložene DMSO rastvaraču. Što se negativnih kontrola tiče, fluorimetrijski nije detektovan merljiv afinitet vezivanja estrona i tamoksifena za AR, kao ni vezivanje androstendiona ni za jednu izoformu ER. Rezultati nakon obrade podataka dobijenih fluorescentnom spektroskopijom su takođe sugerisali da kod jedinjenja **1-4** izostaje vezivanje za AR, što je saglasno sa rezultatima fluorescentne mikroskopije i denzitometrije. Slično tome, estranski sekocijano bromid **2** je i ovom metodom pokazao jako vezivanje za ER α i ER β , dok se estranski sekocijano keton **3** jače vezivao za ER β izoformu.



Slika 41. Odnos fluorescencije ćelija koje ekspimiraju ER α LBD-YFP, ER β LBD-YFP i AR LBD-YFP u prisustvu i odsustvu liganda (DMSO) izmeren fluorimetrijski u 96-formatu. Ova vrednost je izračunata na osnovu intenziteta fluorescencije po ćeliji nakon 14-16 h izloženosti ligandima u finalnoj koncentraciji 10 μ M i 1% DMSO-u u kontrolnoj probi. Histogrami su kreirani u Origin Pro 8. programu, a odstupanja predstavljaju propagirane standardne greške srednje vrednosti [180].

Poređenje vrednosti odnosa fluorescencije dobijenih fluorescentnom spektroskopijom u 96-formatu i fluorescentnom mikroskopijom je prikazano na **Slici 42.** i očigledno je da postoji kvalitativna saglasnost među ovim rezultatima. Dobro vezivanje detektovano fluorescentnom mikroskopijom je izmereno i fluorimetrijski, i obrnuto, odsustvo vezivanja je potvrđeno obema

metodama. Na osnovu izloženih rezultata može se zaključiti da se fluorescentna merenja živih ćelija kvasaca u 96-formatu mogu koristiti kao preliminarni skrining za identifikaciju potencijalnih liganada steroidnih receptora, znatno ubrzavajući proces selekcije, što dalje može biti praćeno detaljnom analizom pojedinačnih ćelija fluorescentnom mikroskopijom i kvantifikacijom vezivanja odabranih jedinjenja denzitometrijski. Vrednosti relativne fluorescencije dobijene fluorescentnom mikroskopijom su bile proporcionalno više nego kod fluorescentne spektroskopije, što ukazuje na veću osetljivost kada je analiza pojedinačnih ćelija pod fluorescentnim mikroskopom u pitanju. S obzirom na to da je ovaj test kreiran za merenje afiniteta vezivanja steroidnih derivata za homodimere steroidnih receptora, moguće je na sličan način razviti sistem i za izučavanje heterodimernih parova. U kvascu se to može postići spajanjem LBD steroidnog receptora različitim FRET-kompatibilnim fluorescentnim proteinom ili upotrebom razdeljenog (*engl.* split) proteina [251]. Osim toga, upotrebom fluorescentnog testa u kvascu interesantno bi bilo testirati i efekte koekspresije koaktivatora steroidnih receptora na vezivanje liganada [252].



Slika 42. Poređenje odnosa fluorescencije ćelija koje ekspresiraju ER α LBD-YFP, ER β LBD-YFP i AR LBD-YFP u prisustvu i odsustvu liganda (DMSO) izmeren fluorimetrijski u 96-formatu i fluorescentnom mikroskopijom. Histogrami su kreirani u Origin Pro 8. programu, a odstupanja predstavljaju propagirane standardne greške srednje vrednosti. Pirsonov koeficijent korelacije je izračunat kako bi se uporedili rezultati dobijeni ovim dvema metodama i iznosio je za ER α (0,87), ER β (0,94) i AR (0,95) [180].

5.3.3. *In vitro* antiproliferativna aktivnost jedinjenja 1-4

Da bi se dalje okarakterisala biološka aktivnost jedinjenja odabranih fluorescentnim ćelijskim biosenzorom, ispitana je njihova antiproliferativna aktivnost prema ćelijskim linijama humanih tumora. Antiproliferativno delovanje D-seko steroida **2-4** u koncentracijama od 10^{-8} do 10^{-4} M je ispitano prema MCF-7 i PC-3 ćelijskim linijama *in vitro* MTT kolorimetrijskim testom [217] nakon 48 h tretiranja. Kontrolne ćelije zdravih fibroblasta pluća MRC-5 su izložene istim jedinjenjima i uslovima da bi se proverila selektivnost jedinjenja, a rezultati su upoređeni sa efektom neselektivnog hemoterapeutika, doksorubicina. Antiproliferativni efekat, izražen kao IC_{50} vrednost za svako jedinjenje, prikazan je u **Tabeli 18**.

Tabela 18. Antiproliferativna aktivnost jedinjenja **1-4** i doksorubicina prema PC-3 i MCF-7 ćelijskim linijama kancera i kontrolnoj zdravoj MRC-5 ćelijskoj liniji.

Jedinjenje	$IC_{50}(\mu M)$		
	<u>PC-3</u>	<u>MCF-7</u>	<u>MRC-5</u>
1 [67]	70,85	0,52	> 100
2	63,42	26,22	> 100
3	54,93	51,58	> 100
4	37,91	48,51	> 100
Doksorubicin	95,61	0,75	0,12

Za jedinjenje **1** je prethodno određena submikromolarna antiproliferativna aktivnost prema ćelijskim linijama i ER-zavisnog i ER-nezavisnog kancera dojke [67]. To je otvorilo pitanje da li je mehanizam delovanja kojim smanjuje proliferaciju ovih ćelija zavisan ili nezavisan od ER, na šta nije moguće odgovoriti bez dodatnih ispitivanja. S obzirom na to da je fluorescentnim testom u kvascu određeno veoma slabo vezivanje ovog jedinjenja za obe izoforme ER, može se isključiti njegovo delovanje preko pomenutog hormon-zavisnog signalnog puta. Osvrtom na IC_{50} vrednosti, uočava se da je među ostalim testiranim steroidnim jedinjenjima, sekocijano bromid **2** ispoljio najveću antiproliferativnu aktivnost (26,22 μM) prema estrogen osetljivoj MCF-7 ćelijskoj liniji, što bi se moglo povezati sa identifikovanim visokim afinitetom vezivanja za ER α . Ovaj D-seko estratrienski derivat je u testovima na eksperimentalnim životinjama pokazao antiestrogenu aktivnost [183], što sve zajedno ukazuje na to da je mehanizam njegovog antiproliferativnog dejstva verovatno posredovan blokiranjem ER α signalnog puta. Sekocijano keton **3** je prema MCF-7 ćelijama pokazao slabu antiproliferativnu aktivnost, a za ER α jako vezivanje, što bi se možda moglo objasniti razlikom u rastvorljivosti u

odnosu na jedinjenje **2**, koje je lipofilnije i verovatno lakše prolazi kroz membranu (clogP 4,18 za jedinjenje **2**, dok je za jedinjenje **3** clogP 2,74). Na proliferaciju ove ćelijske linije nije značajno uticalo ni izlaganje jedinjenju **4**, što može biti u saglasnosti sa odsustvom značajnijeg vezivanja ovog steroida za ER α . Testirani steroidni derivati nisu ispoljili značajan antiproliferativni efekat prema PC-3 ćelijama, osim jedinjenja **4**, koje je pokazalo umerenu aktivnost (IC₅₀ 37,91 μ M). Za razliku od LNCaP ćelija adenokarcinoma prostate koje ekspimiraju AR, proliferacija PC-3 ćelija kancera prostate, koje ne ekspimiraju ove receptore, ne zavisi od prisutne koncentracije androgena [253]. Veoma je bitno napomenuti i to da ni jedno od testiranih steroidnih jedinjenja nije smanjilo proliferaciju zdrave ćelijske linije MRC-5, za razliku od doksorubicina, čija je toksičnost visoka i ka ovim ćelijama.

5.3.4. Afinitet vezivanja jedinjenja 1-4 za LBD ER α / β predviđen molekularnim dokingom

Molekularnim dokingom je moguće predvideti geometriju protein-ligand interakcija sa velikom tačnošću, ali određivanje afiniteta vezivanja jedinjenja samo na osnovu simuliranih energija vezivanja bez eksperimentalnih podataka može biti nedovoljno pouzdano [254]. U ovoj doktorskoj disertaciji molekularni doking je upotrebljen da bi se predvidele i strukturno opisale geometrije vezivanja onih jedinjenja koja su u fluorescentnom ćelijskom testu pokazala visok afinitet vezivanja za ER α ili ER β , pa su tako simulacije izvedene u odnosu na kristalne strukture LBD ER α (PDB ID: 1A52 [221]) i LBD ER β (PDB ID: 3OLS [222]). Kontrolne simulacije, bazirane na ponovljenom dokingu (re-dokingu) korišćenjem prirodnog liganda, estradiola, prisutnog u kristalnoj strukturi obe izoforme, su precizno reprodukovale geometrije protein-ligand vezivanja iz originalne kristalne strukture, pri čemu je mera reproducibilnosti, izražena srednjom kvadratnom standardnom devijacijom (RMSD), imala vrednost manju od 0,6 Å. Na osnovu rezultata re-dokinga, predviđene energije vezivanja liganda $\leq -10,21$ kcal/mol za ER α i $\leq -10,77$ za ER β su tumačene kao značajne (**Tabela 19**).

Sekodinitril **1** je u simulacijama molekularnog dokinga pokazao nešto jače vezivanje za ER β u odnosu na ER α , što je u saglasnosti za rezultatima iz literature [67], međutim eksperimentalno određen afinitet vezivanja predstavljen kao odnos fluorescencije uzorka i kontrole je niži od predviđenog u *in silico* modelima. S obzirom na činjenicu da ovaj dinitrilni derivat ispoljava jaku citotoksičnost prema ER-nezavisnim ćelijama kancera dojke, mehanizam njegovog delovanja verovatno obuhvata neke druge, trenutno nedefinisane puteve. Saglasno

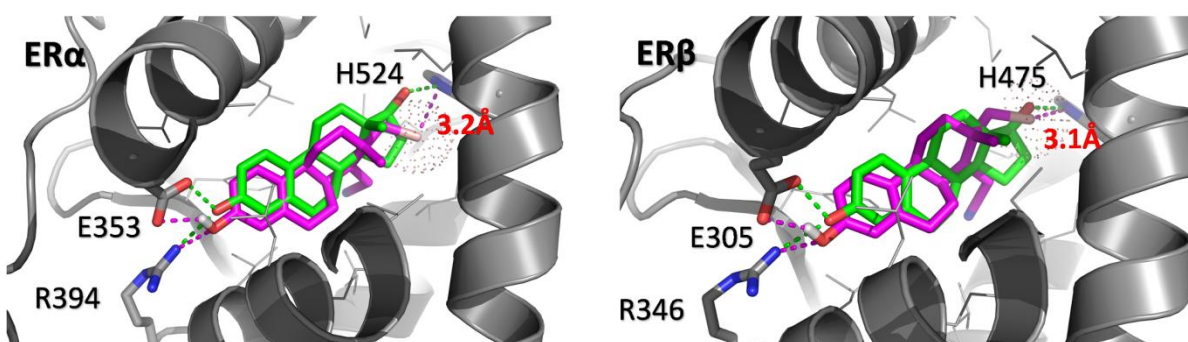
eksperimentalno dobijenim vrednostima fluorescentnih merenja, simulacije molekularnim dokingom su ukazale na snažan afinitet između jedinjenja **2** i ER α i ER β , sa energijama vezivanja -10,79 kcal/mol i -11,06 kcal/mol, respektivno, dok je za jedinjenje **3** predviđeno donekle jače vezivanje za ER β izoformu.

Tabela 19. Korelacija između eksperimentalno određenih afiniteta vezivanja jedinjenja **1-4** za ER α i ER β fluorescentnom mikroskopijom i energija vezivanja određenih *in silico* molekularnim dokingom u AutoDock programu [180].

Jedinjenje	Odnos fluorescencije uzorka i kontrole		Energija vezivanja određena u AutoDock programu (kcal/mol)	
	ER α	ER β	ER α	ER β
1	0,94	1,32	-10,31	-10,55
2	1,45	1,60	-10,79	-11,06
3	1,46	1,57	-10,37	-10,79
4	1,05	1,16	nema vezivanja	nema vezivanja
E1	1,45	1,60	-10,15	-10,66
E2	/	/	-10,21	-10,77

Na **Slici 43.** se jasno vidi da se D-seko bromid **2** smešta unutar vezujućeg mesta obe izoforme ER u sličnoj orijentaciji kao i estradiol, dok je predviđena energija vezivanja niža, odnosno viši afinitet. Slično kao u kristalnim strukturama ER α i ER β u kompleksu sa estradiolom, jedinjenje **2** ostvaruje vodonične veze između atoma kiseonika u položaju 3 i Arg394/346, kao i između atoma vodonika na položaju 3 i Glu353/305 ER α / β [221,222]. Razlog za predviđeno jače vezivanje jedinjenja **2** u odnosu na prirodni ligand može biti i formiranje halogene veze između atoma broma na položaju 17 i očuvanog histidinskog ostatka His524 kod ER α i His475 kod ER β , koja možda mimikuje vodoničnu vezu između O-17 estradiola i

navedenih histidinskih ostataka, a zavisno od uslova, ovaj tip vezivanja može čak biti i jači od vodoničnog [255]. Sa afinitetom vezivanja jedinjenja **2** za izoforme ER verovatno korelira i postojanje nitrilne grupe na poziciji C-16, funkcionalne grupe koja može učestvovati u uspostavljanju vodoničnih veza, a čije je prisustvo povezano sa jakim vezivanjem pojedinih sintetičkih liganada ER β [256]. Odgovor na pitanje zašto jedinjenje **4** ima niži afinitet vezivanja za ER α i ER β je možda upravo nepostojanje ove nitrilne funkcije. Rezultati dobijeni u simulacijama molekularnog dokinga kombinovani sa fluorescentnim merenjima i drugim eksperimentalnim podacima mogu usmeriti dizajn novih derivata steroida ka jedinjenjima prema kojima ove izoforme receptora pokazuju bolju selektivnost i veći afinitet.



Slika 43. Kompleks LBD ER α i LBD ER β sa estradiolom (zeleno) i jedinjenjem **2** (roze) nakon simulacije molekularnog dokinga vizuelizovan u PyMOL-u sa označenim kontaktima (H-His, E-Glu, R-Arg) [180].

5.4. Afinitet vezivanja modifikovanih steroida za ER α , ER β i AR, izmeren optimizovanim netranskripcionim fluorescentnim testom u kvascu

Relativni afinitet vezivanja jedinjenja **5-81** (osim jedinjenja **57** i **58**) za LBD steroidnih receptora ER α , ER β ili AR je kvantifikovan nakon optimizacije fluorescentnog ćelijskog biosenzora ligandima visokog ili niskog afiniteta i steroidnim derivatima **1-4**. Nakon što je utvrđeno da postoji dobra korelacija između rezultata dobijenih fluorimetrijskom detekcionom metodom i fluorescentnom mikroskopijom, serija modifikovanih steroida je isprva testirana fluorimetrijski, a potom je afinitet vezivanja identifikovanih liganada potvrđen detektovanjem fluorescencije celih ćelija pod mikroskopom. Relativni afinitet vezivanja je izražen kao odnos fluorescencije ispitivanog uzorka i kontrole tretirane rastvaračem (DMSO) (**Tabela 20**), čija vrednost je normalizovana na 1. Ovaj odnos je za prirodne ligande steroidnih receptora (estron, estradiol, androstendion i testosteron), prikazan kao srednja vrednost iz različitih eksperimentalnih ciklusa sa propagiranom standardnom greškom, dok je kod ispitivanih

sintetskih steroida određen u okviru jednog eksperimenta, na osnovu tri ponavljanja. Prilikom tumačenja rezultata kao donja granica od koje se smatra da ispitivano jedinjenje pokazuje vezivanje za odabrani receptor postavljena je 1,20 puta jača fluorescencija u odnosu na kontrolu sa DMSO-om.

Tabela 20. Relativni afinitet vezivanja ispitivanih jedinjenja za LBD ER α , ER β ili AR izražen kao odnos fluorescencije uzorka i kontrole sa DMSO-om normalizovane na 1 određen fluorimetrijski u 96-formatu. Ove vrednosti su izračunate na osnovu intenziteta fluorescencije po čeliji nakon 14-16 h izloženosti ligandima u finalnoj koncentraciji 10 μ M i 1% DMSO-u u kontrolnoj probi. Odstupanja predstavljaju propagirane standardne greške srednje vrednosti.

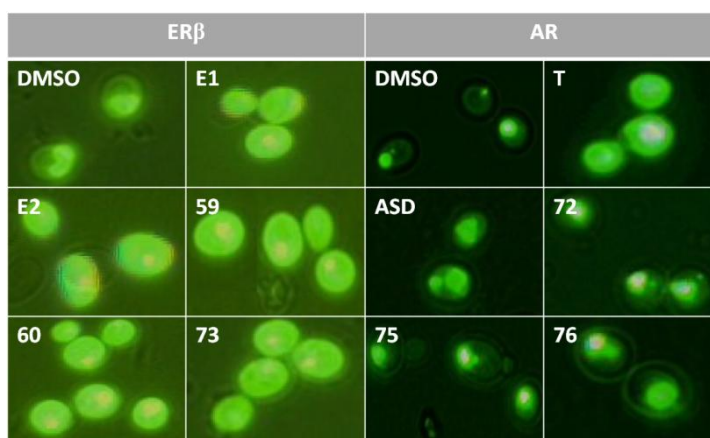
Jedinjenje	Odnos fluorescencije			Jedinjenje	Odnos fluorescencije		
	ER α	ER β	AR		ER α	ER β	AR
E1	1,21 \pm 0,03	2,01 \pm 0,05	1,34 \pm 0,05	42	0,89 \pm 0,03	0,93 \pm 0,05	0,94 \pm 0,07
E2	1,28 \pm 0,04	1,61 \pm 0,03	1,8 \pm 0,05	43	0,95 \pm 0,03	1,13 \pm 0,05	0,98 \pm 0,09
ASD	0,87 \pm 0,04	1,01 \pm 0,02	1,42 \pm 0,06	44	0,93 \pm 0,04	1,14 \pm 0,05	0,84 \pm 0,08
T	0,92 \pm 0,03	1,02 \pm 0,02	2,93 \pm 0,06	45	0,76 \pm 0,04	1,15 \pm 0,04	0,86 \pm 0,09
5	1,24 \pm 0,03	1,01 \pm 0,07	1,23 \pm 0,14	46	0,90 \pm 0,03	1,01 \pm 0,04	0,86 \pm 0,06
6	0,93 \pm 0,07	0,84 \pm 0,03	0,99 \pm 0,06	47	0,90 \pm 0,05	1,22 \pm 0,05	0,97 \pm 0,12
7	1,13 \pm 0,06	0,90 \pm 0,08	0,91 \pm 0,11	48	0,86 \pm 0,05	1,10 \pm 0,04	0,91 \pm 0,07
8	1,10 \pm 0,07	1,10 \pm 0,09	0,97 \pm 0,05	49	0,92 \pm 0,04	0,98 \pm 0,04	0,97 \pm 0,11
9	1,30 \pm 0,04	1,01 \pm 0,05	1,24 \pm 0,15	50	n.t.	1,29 \pm 0,12	1,07 \pm 0,08
10	1,13 \pm 0,10	1,40 \pm 0,08	1,04 \pm 0,06	51	n.t.	1,30 \pm 0,08	1,24 \pm 0,04
11	0,78 \pm 0,04	0,89 \pm 0,04	0,81 \pm 0,06	52	n.t.	1,08 \pm 0,11	1,13 \pm 0,15
12	0,78 \pm 0,05	1,05 \pm 0,06	1,00 \pm 0,06	53	0,85 \pm 0,03	1,07 \pm 0,03	1,26 \pm 0,04
13	0,91 \pm 0,07	1,27 \pm 0,05	1,25 \pm 0,09	54	0,99 \pm 0,04	1,21 \pm 0,05	1,29 \pm 0,09
14	1,03 \pm 0,08	1,11 \pm 0,07	1,05 \pm 0,06	55	0,93 \pm 0,05	1,12 \pm 0,04	1,29 \pm 0,04
15	0,89 \pm 0,15	1,25 \pm 0,10	1,13 \pm 0,08	56	1,05 \pm 0,04	1,33 \pm 0,04	1,21 \pm 0,05
16	0,99 \pm 0,07	1,33 \pm 0,05	1,01 \pm 0,07	57	n.t.	n.t.	n.t.
17	0,92 \pm 0,08	1,19 \pm 0,09	0,94 \pm 0,09	58	n.t.	n.t.	n.t.
18	1,29 \pm 0,15	1,26 \pm 0,08	1,13 \pm 0,08	59	1,18 \pm 0,07	1,88 \pm 0,06	n.t.
19	0,87 \pm 0,07	0,91 \pm 0,04	0,85 \pm 0,06	60	1,19 \pm 0,04	1,80 \pm 0,06	n.t.
20	1,06 \pm 0,14	1,21 \pm 0,07	1,34 \pm 0,09	61	1,13 \pm 0,08	1,37 \pm 0,03	n.t.
21	1,10 \pm 0,10	1,09 \pm 0,04	1,06 \pm 0,07	62	0,87 \pm 0,03	1,15 \pm 0,03	n.t.
22	n.t. ¹	0,74 \pm 0,21 ²	n.t.	63	0,56 \pm 0,08	1,05 \pm 0,04	1,17 \pm 0,04
23	n.t.	0,88 \pm 0,24 ²	n.t.	64	0,43 \pm 0,05	1,01 \pm 0,04	0,91 \pm 0,03
24	0,74 \pm 0,07	1,00 \pm 0,04	0,95 \pm 0,04	65	0,69 \pm 0,06	1,04 \pm 0,04	1,09 \pm 0,05
25	0,79 \pm 0,04	1,00 \pm 0,03	0,99 \pm 0,04	66	0,64 \pm 0,07	0,98 \pm 0,04	1,00 \pm 0,07
26	0,88 \pm 0,03	0,81 \pm 0,04	0,91 \pm 0,07	67	n.t.	1,06 \pm 0,11	1,09 \pm 0,07
27	0,98 \pm 0,06	0,99 \pm 0,05	0,93 \pm 0,08	68	n.t.	1,16 \pm 0,20	1,04 \pm 0,05
28	0,98 \pm 0,05	0,91 \pm 0,04	1,19 \pm 0,13	69	n.t.	1,06 \pm 0,18	1,25 \pm 0,03
29	0,90 \pm 0,04	1,14 \pm 0,08	0,90 \pm 0,10	70	n.t.	1,08 \pm 0,11	1,13 \pm 0,15
30	0,93 \pm 0,05	1,28 \pm 0,05	0,91 \pm 0,09	71	n.t.	1,22 \pm 0,06	1,19 \pm 0,07
31	0,90 \pm 0,05	1,09 \pm 0,04	0,83 \pm 0,07	72	0,94 \pm 0,04	1,01 \pm 0,03	1,45 \pm 0,05
32	0,95 \pm 0,04	1,09 \pm 0,08	0,80 \pm 0,06	73	0,99 \pm 0,03	1,75 \pm 0,04	1,04 \pm 0,04
33	0,94 \pm 0,03	0,93 \pm 0,06	0,88 \pm 0,08	74	1,00 \pm 0,04	0,95 \pm 0,04	1,39 \pm 0,04
34	0,90 \pm 0,03	1,01 \pm 0,09	0,99 \pm 0,07	75	0,88 \pm 0,04	1,18 \pm 0,04	1,43 \pm 0,06
35	0,87 \pm 0,05	0,81 \pm 0,03	0,83 \pm 0,07	76	0,91 \pm 0,03	1,11 \pm 0,04	1,46 \pm 0,08
36	0,89 \pm 0,05	1,13 \pm 0,06	0,89 \pm 0,06	77	1,10 \pm ,04	1,15 \pm 0,03	1,18 \pm 0,09
37	0,98 \pm 0,04	1,00 \pm 0,04	0,80 \pm 0,05	78	0,92 \pm 0,06	1,07 \pm 0,06	1,27 \pm 0,10
38	0,77 \pm 0,03	1,06 \pm 0,04	0,90 \pm 0,10	79	0,84 \pm 0,03	1,14 \pm 0,03	1,41 \pm 0,04
39	0,86 \pm 0,03	1,20 \pm 0,1	0,77 \pm 0,07	80	0,99 \pm 0,03	1,09 \pm 0,04	1,00 \pm 0,03
40	0,81 \pm 0,03	1,05 \pm 0,04	0,79 \pm 0,06	81	0,96 \pm 0,03	1,19 \pm 0,04	0,87 \pm 0,07
41	0,70 \pm 0,03	0,94 \pm 0,04	0,81 \pm 0,09				

¹nije testirano

²detekcija izvršena fluorescentnom mikroskopijom

U testu za ispitivanje liganada ER α identifikovana su 3 jedinjenja sa afinitetom vezivanja sličnim prirodnim ligandima, estronu i estradiolu: androstanski D-homolaktioni **5**, **9** i **18**. Za ER β izoformu izuzetno jako vezivanje, što se i na osnovu strukture moglo pretpostaviti, su pokazali estranski derivati **59**, **60** i **73**, sa fluorescencijom jačom za čak 88, 80 i 75% od kontrole, respektivno. Aromatičnost A prstena sva tri jedinjenja, koja im osigurava planarnost kao kod prirodnih estrogenih hormona, mogla bi biti jedan od razloga njihovog jakog vezivanja za LBD ER β . Umereno vezivanje prema ovoj izoformi su pokazali D-homoandrostanski laktoni **10**, **13**, **16**, **18**, **20** i **30**, estranski derivati sa atomom azota u D-prstenu **50**, **51**, **54** i **56**, A-supstituisani ferocenilmetilestranski derivat **61** i 17 α -pikolil-androst-5-enski derivat **71**. Analizom rezultata, kao ligandi sa značajnim afinitetom vezivanja za AR su izdvojeni jedinjenje **72** sa androst-5-enskim, kao i jedinjenja **75** i **76** sa androst-4-en-3-onskim sistemom, prisutnim i kod prirodnih androgena, androstendiona i testosterona. Ovi modifikovani steroidi su se u testu vezivali isto kao androstendion, dok je testosteron ispoljio dvostruko jače vezivanje od njih, najjače identifikovano u ovom fluorescentnom biosenzoru. Poređenje vezivanja potencijalnih liganada AR sa pozitivnom kontrolom nižeg afiniteta (androstendionom) povećava osetljivost i omogućuje identifikaciju i jedinjenja koja se slabije vezuju. Vezivanje jedinjenja **5**, **9**, **13**, **20**, **51**, **53**, **54**, **55**, **56**, **74** i **78** za AR je bilo umerenog intenziteta.

Dalje, upoređivanjem vezivanja testiranih jedinjenja za sva tri receptora dolazi se do zaključka da se jedinjenje **18** neselektivno vezuje sa umerenim afinitetom za obe izoforme ER, jedinjenje **9** za ER α i AR, dok je nespecifično vezivanje za ER β i AR uočeno kod jedinjenja **13**, **20**, **51**, **54** i **56**. Vezivanje ovih jedinjenja za dve mete umanjuje njihovu potencijalnu farmakološku primenu, s obzirom na to da se u dizajnu lekova teži ka jedinjenjima sa što specifičnijim



Slika 44. Levo: Panel fluorescentnih mikrografa rekombinantnih kvašćevih ćelija koje ekspiriraju ER β LBD-YFP tretiranih 14-16 h rastvaračem (DMSO), 10 μ M E1, E2, jedinjenjima **59**, **60** i **73**; Desno: Panel fluorescentnih mikrografa rekombinantnih kvašćevih ćelija koje ekspiriraju AR LBD-YFP tretiranih 14-16 h rastvaračem (DMSO), 10 μ M T, ASD, jedinjenjima **72**, **75** i **76**. Svi fluorescentni mikrografi su snimljeni sa identičnim vremenom ekspozicije od 500 ms upotrebom FITC filtera. Intenzitet fluorescencije ćelije korelira sa relativnim afinitetom vezivanja liganada za ove receptore.

načinom delovanja. Na osnovu vrednosti navedenih u tabeli za ostale derivate se može izvesti zaključak da se ne vezuju za pomenute receptore.

Nakon fluorimetrijske kvantifikacije vezivanja za receptore, fluorescencija rekombinantnih ćelija tretiranih jedinjenjima sa najvećim izmerenim afinitetom vezivanja i specifičnim načinom delovanja je detektovana fluorescentnom mikroskopijom i rezultati su prikazani na **Slici 44**. Kod ćelija koje eksprimiraju ER β LBD-YFP tretiranih estranskim derivatima **59**, **60** i **73** fluorescentni proteini su raspoređeni u čitavoj citoplazmi, kao i u prisustvu estrona i estradiola, dok su modifikovani steroidi androstanske serije **72**, **75** i **76** kod rekombinantnih ćelija kvasca sa eksprimiranim AR LBD-YFP izazvali sličnu raspodelu fluorescentnog signala u vidu lokalizovanih fluorescentnih polja kao i androstendion, mada nižeg intenziteta nego kod testosterona.

Za određene svrhe, kao na primer kod dizajniranja selektivnih inhibitora steroidogenih enzima u terapiji hormon-zavisnih kancera, jedinjenja koja ostvaruju interakcije sa LBD AR ili ER i ispoljavaju androgena ili estrogena svojstva su, u stvari, loši kandidati, pa je ovaj preliminarni test od velikog značaja ne samo za identifikaciju onih jedinjenja koja se vezuju za LBD odgovarajućeg receptora, nego i za eliminaciju drugih, kod kojih je ovo vezivanje nepoželjno ili izostaje. Sa druge strane, u cilju prevazilaženja nedovoljne efikasnosti pojedinačnog leka i rezistentnosti na terapiju, razvijeni su dualni inhibitori [257], odnosno jedinjenja koja, osim što inhibiraju enzim steroidogeneze ključan za konverziju steroidnih hormona u potentnije oblike, blokiraju i delovanje određenih steroidnih receptora vezivanjem za njihove LBD (antagonisti), u čijem ispitivanju fluorescentni test takođe nalazi veliku primenu.

Objašnjenje za unakrsno vezivanje (*engl.* cross reactivity) pojedinih androstanskih i estranskih derivata za ER i AR, respektivno, nije nimalo jednostavno. Kompleksno pitanje koje se odnosi na „slobodu“ steroidnih receptora u pogledu vezivanja liganada sve više zaokuplja pažnju naučne zajednice [258,259]. Jačinu interakcija između liganda i receptora gotovo je nemoguće predvideti samo na osnovu njihove strukture, s obzirom na to da se afiniteti vezivanja steroida sa veoma sličnim strukturnim karakteristikama mogu mnogo razlikovati, dok se, sa druge strane, strukturno različiti ligandi mogu vezivati sličnim afinitetom [260].

Na vezivanje liganda za AR i ER u velikoj meri utiče struktura liganda, odnosno njegove dimenzije, raspored elektrona, položaj nezasićenih veza, kao i osobine atoma u okolini. Osim uspostavljanja dovoljnog broja kontakata za vezivanje, geometrija steroidnog molekula mora

odgovarati geometriji ligand-vezujućeg „džepa“ steroidnog receptora. Ono što obezbeđuje specifičnost ovih receptora u prepoznavanju liganada su vodonične veze, koje povezuju dijagonalno raspoređene polarne funkcionalne grupe steroida sa proteinom, a esencijalnu ulogu u vezivanju ima i čitava mreža hidrofobnih interakcija. Iako su vodonične veze veoma specifične, ono što proširuje opseg mogućih liganada je nespecifičnost hidrofobnih interakcija i fleksibilnost aminokiselinskih bočnih ostataka uključenih u njihovo formiranje, čime se „džep“ konformaciono prilagođava strukturi egzogenog liganda, stabilizujući ga. Veliki broj neokupiranih hidrofobnih šupljina u „džepu“ sa α i β strane steroidnog skeleta pogoduje smeštanju strukturno različitih supstituenata i čini još jedan od mogućih razloga za smanjenu specifičnost vezivanja liganada steroidnih receptora. Ključne aminokiseline kod uspostavljanja vodoničnih interakcija AR, ER α i ER β i njihovih prirodnih liganada su Arg752, Asn705, Thr877; Glu353, Arg394, His524 i Glu305, Arg346, His475, respektivno. „Džep“ za vezivanje liganda ovih receptora obuhvata hidrofobnu šupljinu, koju odlikuje visok stepen fleksibilnosti, kao i rigidni deo „džepa“ u koji se smešta A prsten steroida. Ovaj krut deo „džepa“ za vezivanje u obliku klešta nameće ograničenja da efikasan ligand mora posedovati, recimo u slučaju ER, planaran aromatični A prsten, što je, međutim, eksperimentalno pokazano da nije uvek slučaj [260–263]. Takođe, tradicionalni koncept zahteva za postojanjem aromatičnog A prstena sa C3 fenolnom grupom kod ER liganada je opovrgnut i studijama evolucione biologije. Na osnovu istraživanja koja se bave evolucijom familije steroidnih receptora, zaključeno je da je ER nastao prvi među steroidnim receptorima. Budući da je *in vitro* i *in vivo* potvrđena fiziološka estrogena aktivnost androgenih molekula, Δ 5-androstendiola i 5 α -androstandiola, ispitivanjem ancestralnog ER proteina došlo se do zaključka da je vezivanje ovih steroida androstanske serije verovatno posledica evolutivno jednostavnijeg puta njihove sinteze iz DHEA, za razliku od estrogena, čija sinteza zahteva aktivnost dva enzima. „Džep“ za vezivanje ER, dva puta većih dimenzija od samog liganda, je dovoljno evoluirao da može razlikovati E2 od drugih steroida, međutim ovaj receptor je zadržao i neke osobine ancestralnog ER [258].

Kod AR je pokazano da je udaljenost između Met745 i steroidnog skeleta liganda bez C19 metil grupe manja, čime se ostvaruju jači hidrofobni kontakti, što bi možda moglo objasniti uočeno vezivanje pojedinih estranskih derivata za AR u ovoj disertaciji. Sa druge strane, povećanje broja nepolarnih supstituenata na steroidnom skeletu možda bi moglo povećati afinitet vezivanja za ligand ostvarivanjem većeg broja hidrofobnih interakcija. Konformaciona promena

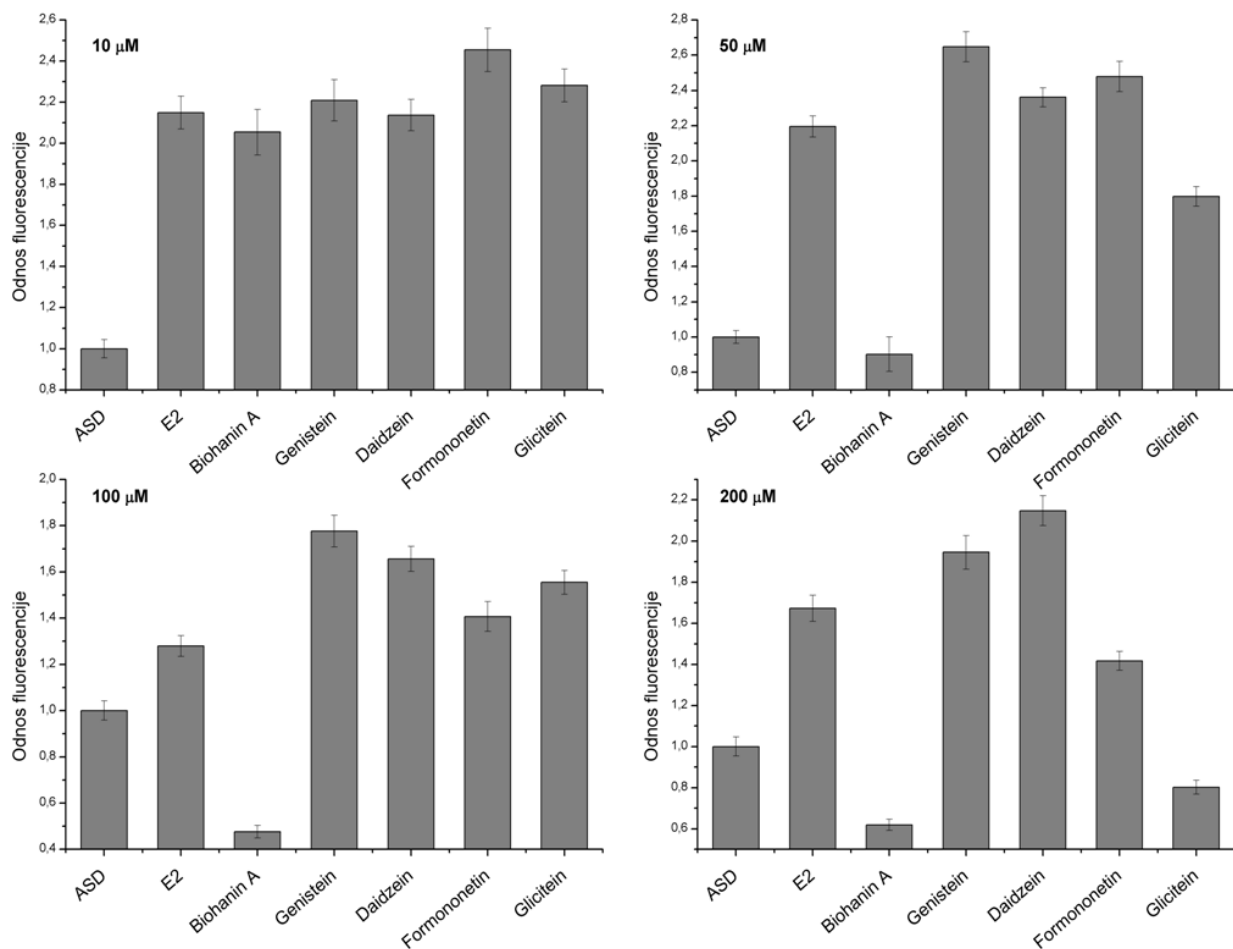
proteina pomeranjem samo jednog aminokiselinskog bočnog lanca u cilju očuvanja interakcije u „džepu“ za vezivanje liganda posleđično može dovesti do promene orijentacije i drugih, fino prilagođavajući konformaciju tog dela „džepa“ postojećem ligandu. Prisustvo konjugovanih veza, koje čini jezgro steroida rigidnijim, moglo bi dovesti do približavanja donora i akceptora vodoničnih veza u strukturi, kao što je pokazano poređenjem kristalnih struktura AR sa prirodnim i sintetskim ligandima [260]. Precizno merenje uglova i dužina veza kod jedinjenja sa identičnom strukturom nekog segmenta može objasniti zašto postoje fine razlike u afinitetu visoko strukturno sličnih liganada [260].

5.5. Primena netranskripcionog fluorescentnog testa u kvascu za ispitivanje afiniteta vezivanja fitoestrogena za ER β i estrogenog potencijala odabranih biljnih ekstrakata

Uticao bioaktivnih jedinjenja iz biljaka na fiziološke procese u organizmu sve više privlači pažnju, a u samom vrhu interesovanja, zbog višestruke protektivne uloge u ljudskom organizmu, su fitoestrogeni. Međutim, pored opšte poznatih blagotvornih efekata, sve više se proučavaju i štetni uticaji koje ovi molekuli mogu ispoljiti, među kojima je i toksičan efekat na razvoj fetusa prilikom povećane izloženosti majke ovim supstancama [264], što sve zajedno ukazuje na važnost i potrebu za razvojem osetljivih testova visoke specifičnosti kojima bi se mogla identifikovati estrogena potentnost ksenoestrogena kojima su ljudi izloženi. Pretragom literature na ovu temu dolazi se do zaključka da za određivanje estrogenog profila individualnih fitoestrogena ili smeša u biljnim ekstraktima i endokrinih disruptora dominiraju transkripcioni testovi [264–266], a pojedini autori su primenili i *in vivo* uterotropne testove prateći promenu mase uterusa eksperimentalnih životinja [264]. Jedan od specifičnih ciljeva ove doktorske disertacije bio je da se na novi način, optimizovanim fluorescentnim ćelijskim biosenzorom u rekombinantnim kvašćevim ćelijama koje ekspimiraju ER β LBD-YFP proceni relativna estrogena aktivnost fitoestrogena iz biljnih uzoraka. Tome je prethodilo određivanje estrogenne aktivnosti poznatih jedinjenja fitoestrogena iz **Tabele 14.** pod uslovima optimizovanim za testiranje steroidnih jedinjenja, čiji su ovi molekuli strukturni analozi.

Tokom određivanja optimalne koncentracije testiranih fitoestrogena, krenulo se od viših koncentracija zbog njihovog pretpostavljenog manjeg estrogenog potencijala u odnosu na estrogene hormone. Kod svih testiranih jedinjenja sa porastom koncentracije je uglavnom dolazilo do saturacije i pada intenziteta fluorescencije (**Slika 45**), u najvećoj meri kod biohanina

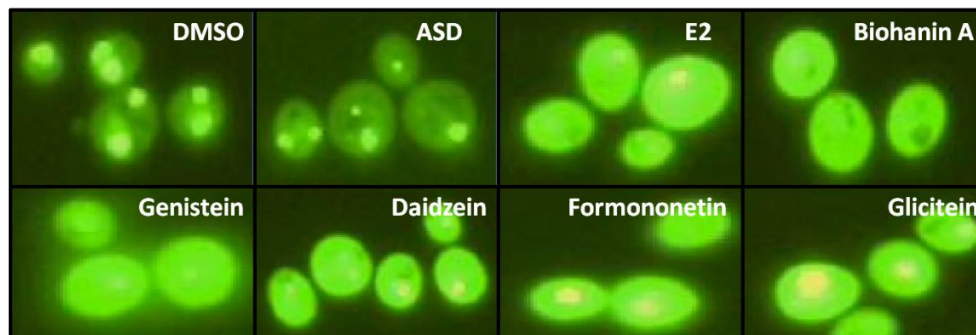
A, čije je vezivanje već pri koncentraciji od 50 μM bilo nemerljivo, odnosno niže nego kod kontrole (ASD). Takođe, u transkripcionom testu koji su izveli Collins i saradnici [267] biohanin A, za razliku od drugih ispitanih fitoestrogena, nije doveo do aktivacije β -galaktozidazne aktivnosti ni u jednoj ispitivanoj koncentraciji. Fenomen izostanka vezivanja za ER β u testu se može objasniti hipotezom da u koncentracijama višim od određene granične koncentracije (u ovom slučaju oko 10 μM , gde se ovo jedinjenje vezivalo za ER β u rangu sa estradiolom) ono možda postaje toksično za ćelije i pomoću efluksnih pumpi biva ekskretovano u spoljašnju sredinu [268]. Sličan trend je uočen i kod rekombinantnih ćelija tretiranih gliciteinom, naročito u 200 μM finalnoj koncentraciji, što je u saglasnosti sa rezultatima Boever-a i saradnika koji su uočili izostanak estrogene aktivnosti ovog molekula u transkripcionom testu [268].



Slika 45. Afinitet vezivanja E2 i poznatih fitoestrogena u koncentracijama 10, 50, 100 i 200 μM za LBD ER β eksprimiran u kvascu izražen kao odnos fluorescencije rekombinantnih ćelija u prisustvu ispitivanog liganda i liganda bez afiniteta (ASD) čija vrednost je normalizovana na 1, izmeren fluorimetrijski u 96-formatu. Histogrami su kreirani u Origin Pro 8. programu, a odstupanja predstavljaju propagirane standardne greške srednje vrednosti.

Da su ispitivana jedinjenja ligandi ER β ovim testom je potvrđeno pri najnižoj testiranoj koncentraciji, a strukturno gledano u vezivanju i stabilizaciji receptor-ligand kompleksa molekula fitoestrogena, koji su približno istih dimenzija kao estradiol, ključnu ulogu verovatno imaju vodonične veze koje se formiraju između hidroksilne grupe na položaju C4', koju poseduju svih pet članova, (slična orijentacija kao 3-OH grupa estradiola) i aminokiselinskih ostataka proteina u vezujućem mestu ili konzerviranog ostatka vode [269]. Međutim, za detaljnije tumačenje razlika u afinitetima međusobno i sa prirodnim ligandom, koje verovatno potiču od veličine i prirode supstituenata na položajima C7 i C5 kod fitoestrogena, neophodno je izvršiti detaljniju analizu.

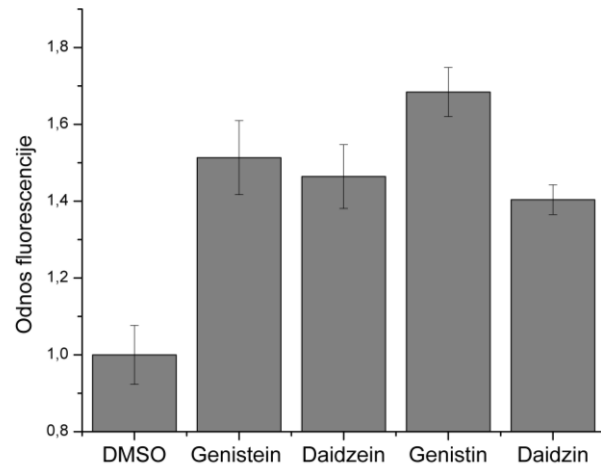
Pri najnižoj testiranoj koncentraciji od 10 μ M, koja se i ispostavila kao optimalna, svi ispitivani fitoestrogeni su pokazali značajno vezivanje za ER β , približno isto kao prirodni ligand, estradiol, što se jasno može videti i na nivou pojedinačnih ćelija na panelu **Slike 46.**, gde je čitava citoplazma ćelija fluorescentna u prisustvu liganda visokog afiniteta, dok je u odsustvu vezivanja ukupna fluorescencija niža i lokalizovana na određene oblasti ćelija.



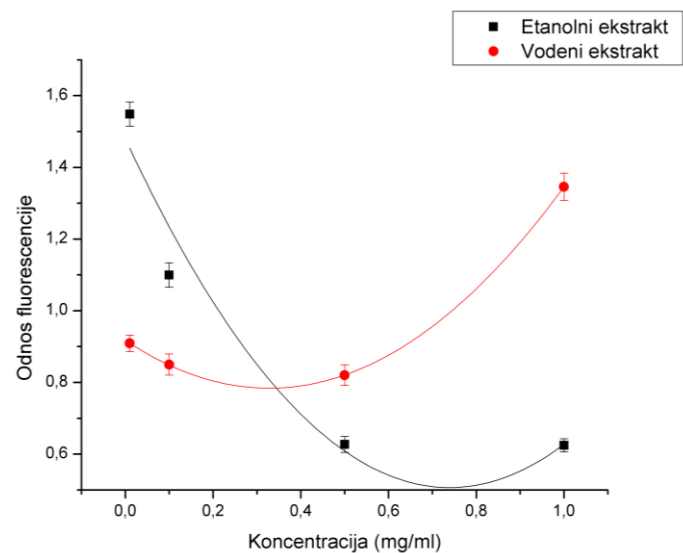
Slika 46. Panel fluorescentnih mikrografa rekombinantnih kvašćevih ćelija koje ekspimiraju ER β LBD-YFP tretiranih 14-16 h rastvaračem (DMSO), 10 μ M androstendionom (ASD), estradiolom (E2), biohaninom A, genisteinom, daidzeinom, formononetinom i gliciteinom.

S obzirom na to da su i drugi autori pri istoj koncentraciji genisteina evidentirali transkripcionu aktivnost u YES testu [265,267], čini se da je osetljivost ova dva testa približna. Formononetin je pri koncentraciji 10 μ M ispoljio najveći afinitet vezivanja, veći i u odnosu na jedan od najpotentnijih fitoestrogena, genistein, što potvrđuje rezultate Matsumoto-a i saradnika [270]. Glikozidi genistin i daidzin su pokazali sličan intenzitet fluorescencije, odnosno slično vezivanje za ER β kao i njihovi aglikonski oblici (**Slika 47**), što je i očekivano s obzirom na identifikovano prisustvo glikozidaza u *Saccharomyces cerevisiae*, koje mogu vršiti hidrolizu glikozidnih veza flavonoidnih glikozida [271].

Nakon što je postignuta specifičnost testa sa standardnim jedinjenjima, ispitana je estrogena potentnost etanolnih ekstrakata virka, crvene deteline i sladića i vodenog ekstrakata virka u koncentracijama 0,01; 0,1; 0,5 i 1 mg/ml. S obzirom na to da fitoestrogenih supstanci u biljkama ima u tragovima i da bi rezultati za različite biljne ekstrakte bili uporedivi, bilo je neophodno upariti ih do suva, a koncentracija je izražena kao masa suvog ostatka/ml. Na osnovu analize rezultata sa **Slike 48.** može se zaključiti da se kod vodenog ekstrakta virka javlja dozna zavisnost fluorescentnog signala, dok je kod etanolnog ona obrnuto zavisna, verovatno usled dostizanja saturacije već pri najnižoj testiranoj koncentraciji. Etanolni ekstrakt virka pri nižim koncentracijama ispoljava jači estrogeni potencijal od vodenog, što sugeriše da je ekstrakcija ovih fenolnih jedinjenja iz virka efikasnija 70% etanolom nego vodom. Da bi se stekao utisak o korišćenim koncentracijama u odnosu na one iz svakodnevnog života, u pripremi čaja obično se na oko 2,5 g suvog biljnog materijala dodaje oko 250 ml vode (1:100). U testu su, dakle, korišćene 10 puta više koncentracije od onih koje se mogu naći u čaju.

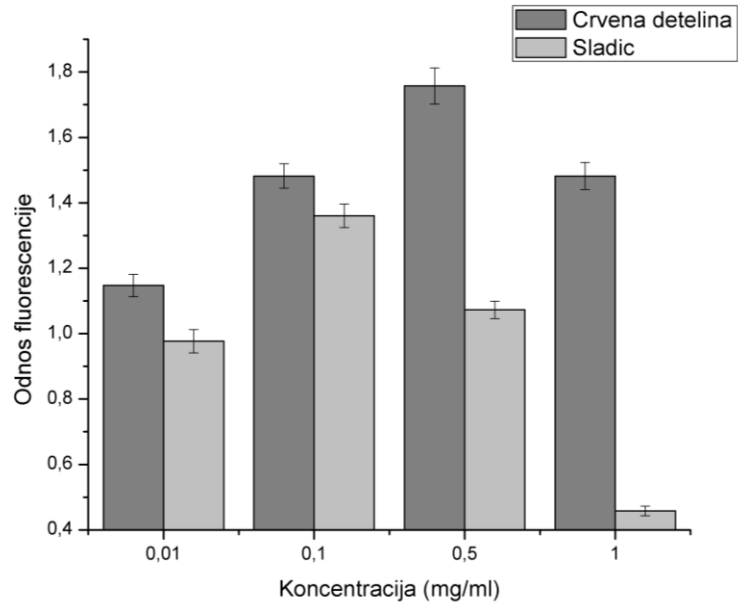


Slika 47. Afinitet vezivanja genistina i daidzina i njihovih aglikonskih oblika u finalnoj koncentraciji 10 μM za LBD ER β ekspimiran u kvascu izražen kao odnos fluorescencije rekombinantnih ćelija u prisustvu ispitivanog liganda i DMSO rastvarača čija vrednost je normalizovana na 1, izmeren fluorimetrijski u 96-formatu. Histogrami su kreirani u Origin Pro 8. program, a odstupanja predstavljaju propagirane standardne greške srednje vrednosti.



Slika 48. Zavisnost odnosa fluorescencije rekombinantnih ćelija koje ekspimiraju ER β LBD-YFP tretiranih etanolnim ili vodenim ekstraktom virka i (DMSO) kontrole od koncentracije ekstrakata.

Fenolne komponente etanolnog ekstrakta crvene deteline koncentracije 0,5 mg/ml su pokazale jako vezivanje za ER β u fluorescentnom ćelijskom biosenzoru, čak nešto više od estradiola (1,73 puta jača fluorescencija u odnosu na kontrolu), dok je u slučaju etanolnog ekstrakta sladića estrogenu potencijal ispoljen samo pri pet puta nižoj koncentraciji, i to nešto slabiji u odnosu na ekstrakt crvene deteline u istoj koncentraciji (**Slika 49**). U ćelijama tretiranim etanolnim ekstraktom sladića u koncentraciji 1 mg/ml nije



Slika 49. Afinitet vezivanja komponenata etanolnog ekstrakta crvene deteline i sladića u koncentracijama 0,01; 0,1; 0,5 i 1 mg/ml za LBD ER β eksprimiran u kvascu izražen kao odnos fluorescencije rekombinantnih ćelija u prisustvu i odsustvu ispitivanog liganda čija vrednost je normalizovana na 1 (DMSO, $1 \pm 0,032$), izmeren fluorimetrijski u 96-formatu. Odnos fluorescencije za pozitivnu kontrolu E2 iznosi $1,73 \pm 0,063$. Histogrami su kreirani u Origin Pro 8. programu, a odstupanja predstavljaju propagirane standardne greške srednje vrednosti.

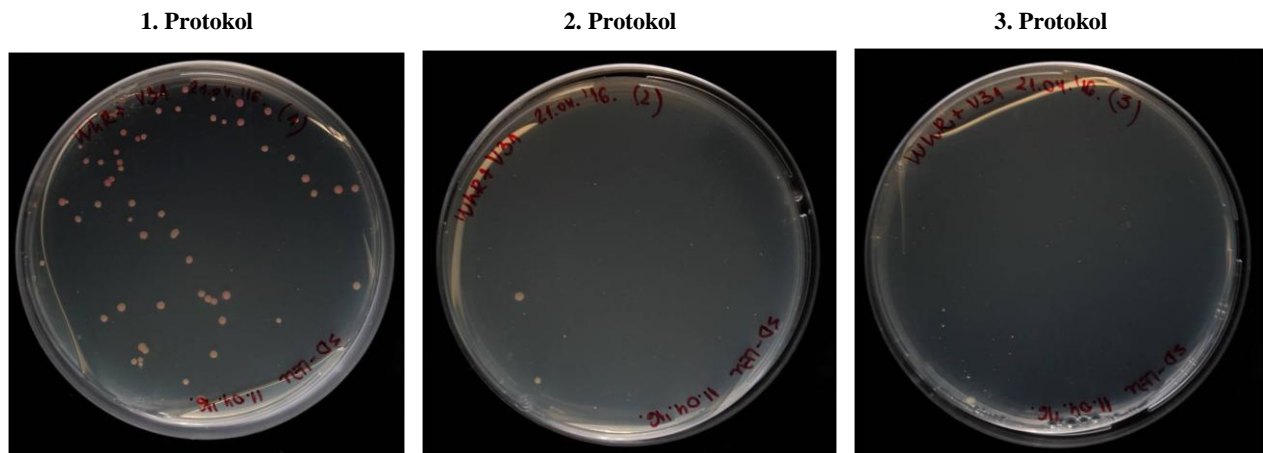
detektovan merljiv estrogenu potencijal, što se možda može objasniti potencijalnom toksičnošću komponenata ekstrakta sladića u tim količinama, slično kao kod biohanina A. Detektovano vezivanje za estrogenu receptor je u saglasnosti sa identifikovanim visokim sadržajem izoflavonoida genisteina i daidzeina u crvenoj detelini [272] i formononetina, biohanina A i genisteina u korenu sladića sa Fruške gore [273], koji ispoljavaju estrogenu svojstva. Cilj ovoga eksperimenta bio je da se testira upotrebljivost fluorescentnog ćelijskog biosenzora za testiranje prirodno zastupljenih molekula sličnih estrogenima sa potencijalnim farmakološkim delovanjem, što je sa uspehom i postignuto, čineći ovaj test odličnom „alatkom“ za brzi skrining estrogenog potencijala velikog broja biljnih ekstrakata. Da bi se bolje razumeo uočen estrogenu potencijal biljnih ekstrakata i dodelio pojedinačnim biološki aktivnim jedinjenjima, neophodno je izvršiti dodatnu karakterizaciju i kvantifikaciju njihovog sadržaja specifičnim hemijskim metodama.

5.6. Efikasnost transformacije sojeva sa optimizovanom redoks sredinom i prepoznavanje problema u vezi sa ćelijskom respiracijom

U literaturi su opisane brojne procedure za transformaciju kvasaca, međutim, s obzirom na to da postoje velike razlike među sojevima, često su neophodne varijacije protokola koji se najčešće koriste u laboratorijama. Transformacija kvasaca u slučaju *Saccharomyces cerevisiae* FY250 soja standardnom LiAc/PEG metodom je bila efikasna, međutim, kod domaćina sa pojačanom ekspresijom kvaščeve i/ili humane CPR, pogodnih za ekspresiju aromataze, ona nije dala rezultate čak ni nakon povećanja koncentracije plazmidne DNK. Za transformaciju su korišćene ćelije u logaritamskoj fazi rasta, koja se među istraživačima favorizuje u odnosu na ćelije u stacionarnoj fazi ili one sa čvrstih podloga [210]. Kada je reč o samom mehanizmu transformacije *Saccharomyces cerevisiae*, u radu Kawai-a i saradnika iznet je zaključak da su nužna dodatna istraživanja u vezi sa poslednjim korakom, drugim rečima oni su pretpostavili da se DNK vezuje za ćelijski zid, ulazi u ćeliju putem endocitoze pomoću PEG, LiAc i toplotnog šoka, nakon čega sledi isporuka u vakuole i na kraju ulazak u jedro, na način koji još uvek nije poznat [209].

Razlike u efikasnosti transformacije W(hR) soja plazmidom pRS425-Aro primenom 3 različita protokola su prikazane na **Slici 50.**, pri čemu se jasno vidi da je najuspešniji prvi, u kom je dobijeno 50-ak kolonija, zatim sledi drugi sa samo dve kolonije, dok poslednji protokol nije rezultovao pojavom transformanata na selektivnim podlogama. U okviru najefikasnije procedure talog ćelija je resuspendovan u smeši LiAc, PEG, ssDNK i plazmidne DNK, što je praćeno inkubacijom na 30°C, dodavanjem DMSO-a i toplotnim šokom na 42°C u trajanju od 15 min. Za razliku od metode Cullun-a i Pompon-a koja se kroz radove citira kod transformacije sojeva sa optimizovanom redoks sredinom [274], značaj ovde dobijenih rezultata je u potvrdi efikasnosti procedure Prochasson-a [212] i primeni nove, visoko efikasne metode za transformaciju intaktnih kvašćevih ćelija W(R), BY2R i W(hR) sojeva, koja rezultuje velikim brojem kolonija sa uspešno usvojenom željenom DNK. Postupak opisan u doktorskoj disertaciji je brži, zahteva manju zapreminu tečne kulture kvasaca i toplotni šok se izvodi na višoj temperaturi, ali kraći vremenski period. Moguće je i da bi dodatni korak oporavka ćelija od hemijskog tretmana u kompletnom medijumu na optimalnoj temperaturi, često navođen u literaturi [210], još više povećao efikasnost procedure. Ključnu ulogu u povećanju efikasnosti transformacije u odnosu na standardni LiAc/PEG protokol verovatno ima polarni rastvarač, DMSO, koji povećava poroznost

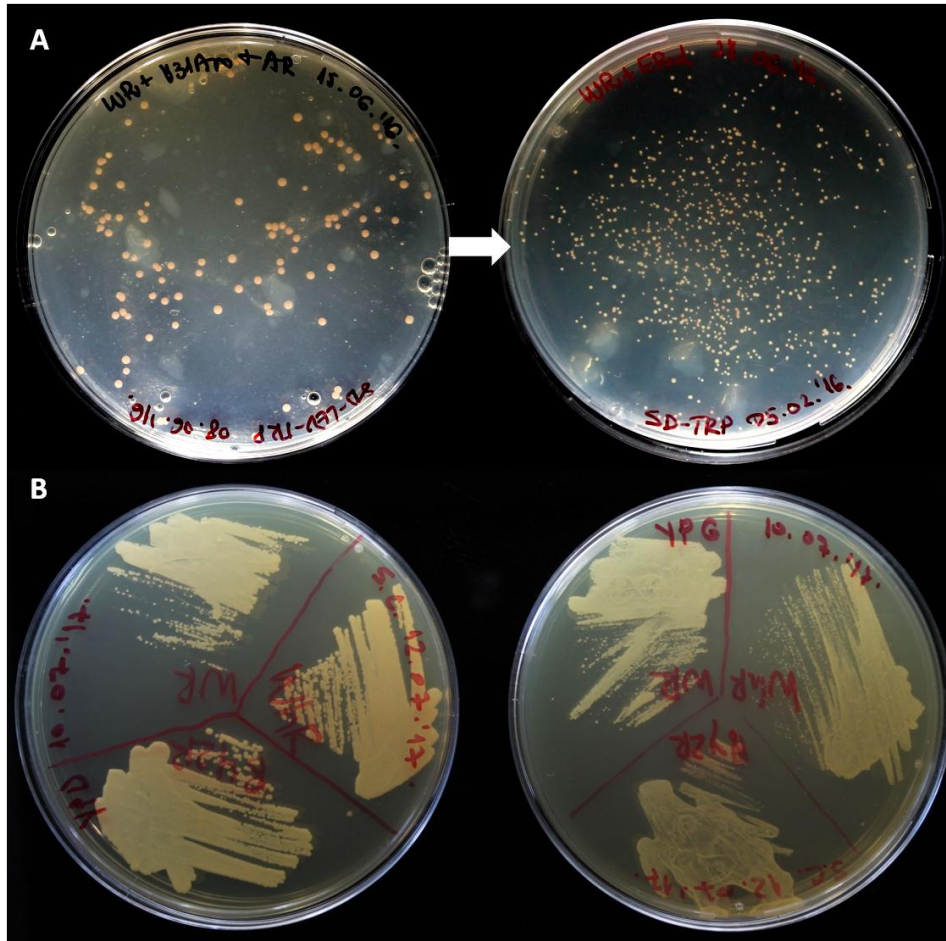
ćelijskog zida, ali tačan mehanizam je i dalje nepoznat [275,276]. Interesantno, Murata i saradnici su otkrili da DMSO, osim što narušava ćelijski integritet, utiče i na ekspresiju gena uključenih u biosintezu fosfolipida ćelijske membrane, čime se delimično „ublažava“ štetni efekat [209]. Soni i saradnici su pokazali da je stimulacija LiAc/PEG-posredovane transformacije DMSO rastvaračem najefikasnija kada je njegova koncentracija 10%, koliko je i ovde korišćeno, i da je tada postignut balans između povećanja efikasnosti usvajanja plazmidne DNK i vijabilnosti ćelija [275], dok su Tripp i saradnici pokazali da dodavanje DMSO-a može uticati na efikasnost čak i kod transformacije ćelija u stacionarnoj fazi rasta [210]. U drugom protokolu neuspeh transformacije je verovatno posledica duže inkubacije na povišenoj temperaturi, dok se u trećem čini da „oporavak“ tretiranih ćelija u kompletnom medijumu pre zasejavanja nije dovoljan za efikasno usvajanje plazmida ako nisu dodati aditivi-DMSO i ssDNK. Osvrtom na standardni protokol, gde se za redukciju disulfidnih mostova membranskih proteina u cilju olakšavanja ulaska DNK u ćeliju koristi DTT [210], pretpostavlja se da bi kombinovanje opisana tri protokola sa dodatkom ovog agensa moglo uticati na povećanje njihove efikasnosti.



Slika 50. Efikasnost transformacije W(hR) soja pRS425-Aro plazmidom upotrebom tri različita protokola.

Ćelije W(R) i W(hR) sojeva su crvene boje zahvaljujući mutacijama u genima odgovornim za biosintezu adenina (*ade2*), zbog čega dolazi do nakupljanja crvenog pigmenta usled oksidacije intermedijera ovog puta. U toku eksperimentalnog rada kolonije W(R) soja su nakon određenog vremena promenile boju iz crvene u belu i došlo je do smanjenja njihove veličine (**Slika 51.A**). Beli fenotip kod *ade2* mutanata se može objasniti mutacijama u okviru istog biosintetskog puta, zaduženim za reakcije uzvodno od reakcije odgovorne za sintezu crvenog pigmenta, čime se blokira njegovo nakupljanje i rezultat je pojava belih kolonija [277].

Odsustvo nakupljanja crvenog pigmenta se često javlja kao posledica oštećenja oksidativnog metabolizma, odnosno respiracije ćelija usled gubitka funkcije mitohondrija [278], pa su tako kolonije sa gubitkom respiratorne kompetentnosti male i nazivaju se „petite“ (*fr.* mali) [279].



Slika 51. A) Promene u boji i veličini kolonija W(R) soja nakon određenog vremenskog perioda i više ciklusa odmrzavanja glicerolskog štok rastvora ćelija B) Rast ćelija W(R) soja na fermentabilnom (glukoza, YPD) (levo) i nefermentabilnom (glicerol, YPG) (desno) izvoru ugljenika nakon 3 dana inkubacije na 30°C.

Da bi se proverila respiratorna sposobnost ćelija, one su zasejane na podlogu sa fermentabilnim (glukoza) i nefermentabilnim (glicerol) izvorom ugljenika, s obzirom na to da su kvasci fakultativni a(na)erobi i u slučaju oštećenja metaboličkog puta oksidativne fosforilacije preživljavaju zahvaljujući fermentaciji [279]. Ćelije W(R) soja su, kao što se na **Slici 51.B** može videti, ipak rasle na podlozi sa glicerolom, što sugerise da njihov respiratorni put nije u potpunosti disfunkcionalan, međutim „petite“ kolonije bele boje su svakako indikator da postoji neka vrsta oštećenja u njihovom genomu. U istraživanjima koja su sledila, kao domaćin je korišćen isključivo W(hR) soj zbog očuvanih metaboličkih puteva i veće otpornosti sistema za ćelijsku respiraciju. Važno je spomenuti da promena fenotipa *Saccharomyces cerevisiae* može

poslužiti i za izučavanje različitih genetskih rearanžmana (rekombinacija, konverzija, aneuploidija) [278], kao i da postoji velika potreba za razvojem metoda za ispitivanje mitohondrijalne disfunkcije, indikovane u razvoju mnogih humanih bolesti, a kvasac je idealan model sistem za to, jer su njegovi biološki mehanizmi u velikoj meri analogni onim u humanim ćelijama [278].

5.7. Mikrozomalna frakcija *Saccharomyces cerevisiae* kao izvor humane aromataze i/ili CPR

Aromataza je koeksprimirana u *Saccharomyces cerevisiae* W(R) soju dizajniranom da pojačano ekspresuje kvašćevu CPR [162] i kompleks ova dva proteina je prečišćen precipitacijom mikrozoma sa CaCl_2 nakon gajenja ćelija u minimalnom medijumu. Mikrozomi predstavljaju delove endoplazmatičnog retikuluma slične vezikulama nakon narušavanja integriteta eukariotske ćelije [280]. U prvim pokušajima da se izoluju oba proteina neophodna za katalitičku aktivnost aromataze korišćen je rekombinantni W(R) soj, međutim, nakon niza neuspelih eksperimenata i sumnje na probleme sa respiracijom ovih ćelija, odlučeno je da se CPR izoluje samo iz mikrozoma W(hR) soja, dok je aromataza eksprimirana u drugom model sistemu (*Escherichia coli*).

U prvoj proceduri 48 h od indukcije ekspresije oba CYP450 proteina galaktozom dobijeno je oko 7 g vlažnog taloga ćelija kvasaca iz 0,5 l tečne kulture, iz čijeg dela (4 g) su izolovani mikrozomi metodom precipitacije solima, kojom se izbegava ultracentrifugiranje. To je upravo glavna prednost ove metode koju je moguće izvesti i u skromnije opremljenim laboratorijama, jer zahtevane brzine ne prelaze 14000 x g, što je dostupno većini centrifuga. Druga velika prednost ove procedure je i što relativno kratko traje (oko 3 h). Iako je prema radu Pompon-a i saradnika za izolaciju mikrozoma iz kultura na manjoj skali (do 500 ml) preporučljivo izvršiti digestiju ćelijskog zida enzimima [231], ovde su ćelije lizirane mehanički upotrebom staklenih kuglica. Upotreba staklenih kuglica je ekonomičnija u odnosu na upotrebu litičkih enzima u cilju dobijanja sferoplasta. Tokom optimizacije protokola, pokazano je da se protein u aktivnom obliku uspešno ekstrahuje iz kvašćevih ćelija nakon 6 ciklusa mehaničkog liziranja staklenim kuglicama uz pauze na ledu, dok se sa povećanjem broja ciklusa povećava i rizik od denaturacije. Dodavanjem 15 mM CaCl_2 u supernatant ekstrakta ćelija istaloženi su proteini mikrozomalne frakcije kao jedva vidljivi tragovi na zidovima tubica i resuspendovani do koncentracije oko 430 $\mu\text{g/ml}$. S obzirom na to da je procedura od gajenja ćelija do izolacije

mikrozoma eksperimentalno zahtevna, a količina dobijenog proteina nedovoljna za testiranje različitih koncentracija precipitanata, ostalo je nejasno da li bi promena ovog faktora uticala na efikasnost. Kappeli i saradnici su pokazali da se precipitacijom sa 12 mM CaCl_2 značajna količina CYP450 proteina gubi tokom ispiranja, dok se već sa 16 mM može istaložiti najveća količina mikrozomalnih proteina [281]. Alternativno, mikrozomi mogu biti istaloženi jednovalentnim solima (NaCl) 10 puta više koncentracije u kombinaciji sa PEG-om [231,282].

Budući da nije očekivana visoka koncentracija proteina i da mikrozomi predstavljaju sirov ekstrakt proteina, kvantitet i kvalitet prečišćene aromataze i CPR nisu praćeni SDS-PAGE elektroforezom. Povećanje čistoće proteina mikrozomalne frakcije verovatno bi se moglo postići dodatnim korakom centrifugiranja supernatanta mitohondrija pre dodavanja CaCl_2 , a povećanje prinosa dodavanjem soli u čvrstom obliku umesto rastvora [281]. Mikrozomi prečišćeni ovde razvijenim postupkom se mogu čuvati mesecima u 20% glicerolu na -80°C u stabilnom obliku i bez gubitka aktivnosti, što značajno olakšava planiranje i/ili izvođenje eksperimenata.

Pomenuti nedostatak reproducibilnosti opisane procedure sa W(R) sojem doveo je do toga da kompletna procedura bude primenjena samo na ćelije W(hR) bez unetog pRS425-Aro plazmida, s tom razlikom što su ćelije gajene u kompletnom medijumu sa 2% rafinozom. Drugačije rečeno, plan je bio iskoristiti ove ćelije kao lako dostupan izvor CPR, umesto skupog komercijalno prečišćenog proteina i izbegavanje komplikovanih procedura prečišćavanja, najčešće iz jetre eksperimentalnih životinja [283,284] ili placentalnih mikrozoma [139].

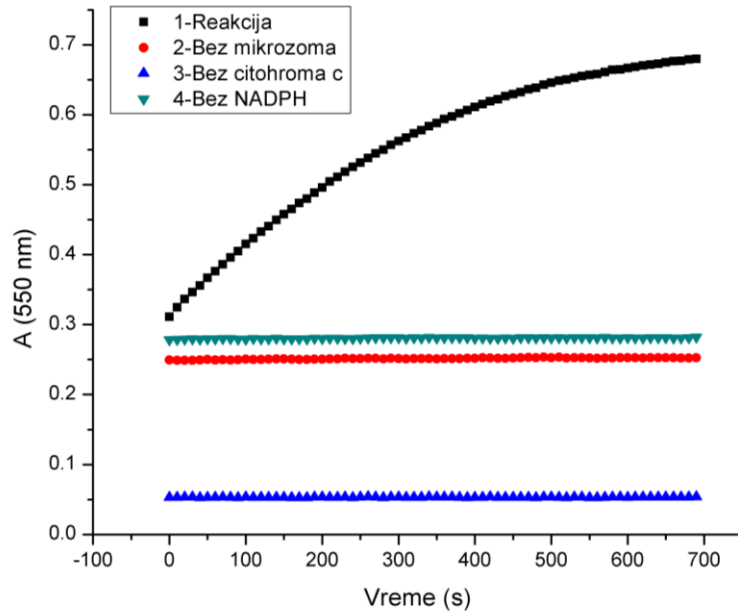
5.7.1. *In vitro* redukcija citohroma c aktivnošću CPR iz mikrozoma

Nakon izolacije mikrozoma iz W(hR) soja sa genomski integrisanom humanom CPR, kontinualnom spektrofotometrijom je okarakterisana njena aktivnost praćenjem redukcije citohroma c, odnosno porastom apsorbanca na 550 nm. Ovaj enzim ima ključnu ulogu u katalitičkoj aktivnosti aromataze, posredujući u prenosu elektrona sa NADPH, stoga je pre izvođenja kuplovanog enzimskog testa bilo neophodno proveriti njegov redukcion kapacitet. Na ovaj način može se sprečiti nepotrebno trošenje reagenasa i proteina u kuplovanom enzimskom testu, u slučaju da je sam CPR enzim izgubio aktivnost tokom prečišćavanja. Na **Slici 52.**, koja predstavlja grafički prikaz promene $A_{550\text{nm}}$ tokom reakcije, jasno se uočava hiperbolični porast apsorbanca kod reakcione smeše mikrozoma kao izvora CPR, NADPH i citohroma c, potvrđujući aktivnost enzima. Ni u jednoj od kontrolnih proba nije došlo do promene apsorbanca, čime je isključena mogućnost da drugi enzimi prisutni u mikrozomima kvasca vrše

transfer elektrona na citohrom c, kao i da se u odsustvu mikrozoama ili citohroma c može promeniti konstantna vrednost apsorbance. Budući da je korišćena mikrozomalna frakcija iz ćelija kvasaca bez eksprimirane humane aromataze, ni aktivnost ovog enzima nije ometala izvođenje testa. Enzimi iz kvasca koji bi generalno mogli interferirati sa testom, odnosno narušavati prenos elektrona sa NADPH na citohrom c posredovan CPR enzimom, su mitohondrijalni enzimi

elektron transportnog lanca, citohrom c reduktaza i citohrom c oksidaza, zatim citohrom c peroksidaza, za koje se citohrom c specifično vezuje preko ostataka lizina [285]. Aktivnost CPR je određena kao količina citohroma c redukovana po ml štok rastvora enzima u min prema uputstvu Guenbercih-a i saradnika [233] i iznosila je 860 nmol cit. c/ml·min, odnosno izraženo preko mase proteina 0,19 nmol cit. c/ μ g·min, s tim što se mora uzeti u obzir da se ovde ne radi o čistom CPR enzimom, nego o mikrozomalnoj frakciji. Iako je aktivnost ovako dobijenog CPR enzima niža od specifične enzimske aktivnosti CPR iz humanih placentalnih mikrozoama [139], ovaj test je pokazao izuzetnu osetljivost. Naime, za detektovanje aktivnosti bilo je dovoljno svega 11,5 μ g ukupnih proteina iz mikrozoama po bunariću mikrotitar ploče, čime je ostvarena ušteda proteina, značajna za buduće eksperimente.

Za praćenje sposobnosti CPR da učestvuje u prenosu elektrona, osim citohroma c koji je ovde upotrebljen, može se koristiti i poznati „hvatač radikala“, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), sa sličnim načinom detekcije [286]. Međutim, iako oba testa mogu da se izvode direktno u tečnom medijumu brzo i jednostavno, citohrom c je, za razliku od sintetskog elektron-



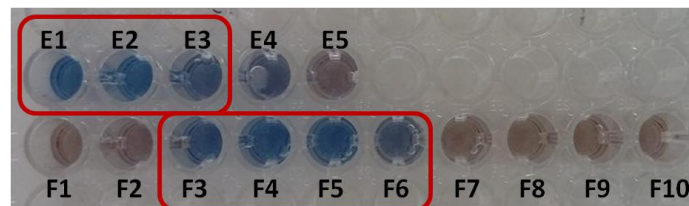
Slika 52. Ispitivanje aktivnosti CPR iz mikrozoama W(hR) soja praćenjem redukcije citohroma c snimanjem $A_{550\text{ nm}}$ tokom 10 min u 4 različite probe. Porast apsorbance označava redukciju citohroma c aktivnošću CPR. 1-Reakcija: 11,5 μ g CPR, 40 μ M citohrom c, 100 μ M NADPH u 10 mM K-fosfatnom puferu, pH 7,4. 2, 3 i 4 probe su istog sadržaja sa izuzetkom mikrozoama, citohroma c ili NADPH, respektivno.

akceptora, DPPH, zastupljen u živom sistemu, što rezultate čini na izgled realističnijim, iako nije u pitanju pravi fiziološki redoks partner CPR, kao što se isprva mislilo. Takođe, struktura CPR-citohrom c kompleksa je poznata [287], što je omogućilo lakše razumevanje njihove međusobne interakcije, za razliku od interakcije sa DPPH. Sa druge strane, potencijalni nedostatak upotrebe citohroma c kao posrednika u određivanju redukcione aktivnosti CPR može biti taj, što njegovu redukciju, osim u potpunosti katalitički aktivne CPR, može izvršiti i ona sa proteolitički razgrađenim N-terminusom za membransko usidravanje, koja je neaktivna prema CYP450 enzimu zbog gubitka aminokiselina koje učestvuju u njihovom kontaktu, ali ovaj tip proteolize u mikrozomima je redak [233]. Izvedeni NADPH-citohrom c redukcioni test, osim za preliminarni skrining aktivnosti koji prethodi kuplovanom enzimskom testu, može poslužiti i kao osnova za izučavanje promena u aktivnosti humane CPR W(hR) ćelija usled eventualnih dodatnih genetskih manipulacija pomenutog soja.

5.8. Strategija za ekspresiju aromataze u bakterijama i izolovanje proteina u ligand-nezavisnoj formi

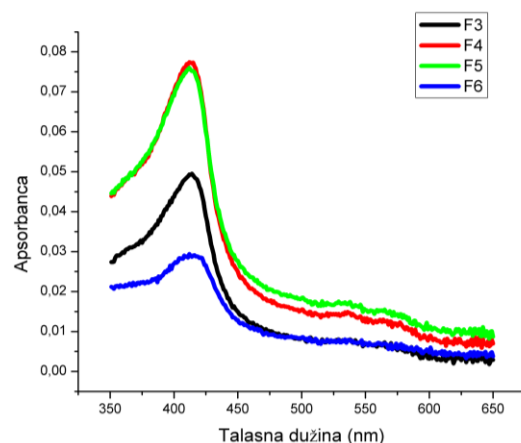
Zbog respiratornih poteškoća kvašćevog W(R) soja, heterologna produkcija aromataze je prebačena u bakterijski sistem. N-terminalno modifikovana humana aromataza klonirana u pCWori+ vektor je heterologno eksprimirana u *Escherichia coli* DH5 α ćelijama, a potom prečišćena na osnovu procedure iz publikacije Nardo-a i saradnika [159], prilagođene postojećoj laboratorijskoj opremi. Budući da je jedan od specifičnih ciljeva ove disertacije ispitivanje vezivanja liganada za slobodnu formu aromataze, vektor koji je ustupio dr Kagawa nije upotrebljen za ekspresiju ovog enzima u bakterijama, jer bi aromataza izolovana na ovaj način bila u kompleksu sa supstratom koji je stabilije [158], ali kojeg je veoma teško naknadno ukloniti. Grupa istraživača iz Italije je prva prečistila ovaj enzim u stabilnom obliku bez liganda [159] i pri tome njihovi uslovi za ekspresiju nisu obuhvatali indukciju GroES i GroEL sistema šaperona za pravilno savijanje proteina [158]. Kao domaćin korišćene su DH5 α ćelije, češće korišćene za amplifikaciju DNK tokom molekularnog kloniranja, a ređe kao ekspresioni sistem. Međutim, prema navodima iz literature, ovaj tip ćelija, kao i *Escherichia coli* JM109, omogućuju visok nivo ekspresije CYP450 proteina i kompatibilni su sa pCWori plazmidom [288–290]. Njegov snažan tac promotor, prepoznat od strane native bakterijske RNK polimeraze, je hibrid regiona lacUV5 i trp promotora sa čak 5 puta većom efikasnošću od samog lacUV5, a ekspresija je pod kontrolom *lacI* represora, koji se inaktivira dodavanjem IPTG-a [289,291].

Zbog nedovoljne sinteze hema u domaćinu, heterologna produkcija CYP450 enzima u formi holoproteina je veoma zahtevna [292], stoga je neophodno dodati prekursor biosintetskog puta porfirina, δ -aminolevulinisku kiselinu. Zajedno sa dodavanjem δ -aminolevuliniske kiseline 1 h pre IPTG-a snižena je i temperatura gajenja na 28°C, da bi se obezbedili povoljni uslovi za pravilno savijanje aromataze. Na temperaturama višim od 28-32°C često je formiranje nefunkcionalnih agregata CYP450 proteina, koji se akumuliraju u bakterijskim inkluzionim telima [290]. Zbog strukturne i funkcionalne kompleksnosti aromataze ekspresija je trajala 48 h u bogatom TB medijumu, koji omogućava veći nivo ekspresije membranskih proteina [291]. Aromataza je prečišćena IMEC hromatografijom zahvaljujući histidinskom tagu, nakon čega je izvršena zamena pufera propuštanjem eluata kroz gel filtracionu kolonu kako bi se enzim mogao skladištiti u optimalnim uslovima. Na **Slici 53**. su označene frakcije nakon obe hromatografske metode prečišćavanja u kojima je kvalitativno potvrđeno prisustvo proteina. Za frakcije F3-F6 snimljeni su i apsorpcioni spektri (**Slika 54**), na osnovu kojih je odlučeno da se F4 i F5 spoje, jer pokazuju najintenzivniji Soretov pik sa maksimumom na oko 415 nm, sugerišući najviši sadržaj CYP450 proteina u niskospinskoj formi, i da se koriste kao najkvalitetniji izvor proteina za planirane eksperimente.



Slika 53. Određivanje sadržaja proteina metodom po Bradfordu u frakcijama nakon prečišćavanja aromataze afinitetnom (E1-E5) i ekskluzionom hromatografijom (F1-F10).

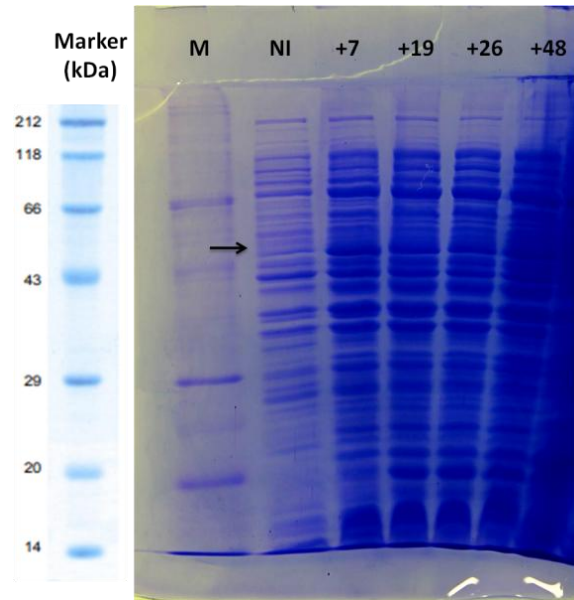
Ekspresija aromataze je vizualizovana na SDS-PAGE gelu (**Slika 55-56**) u različitim vremenskim intervalima nakon indukcije i u različitim fazama prečišćavanja. Proteinskim molekulima su veličine dodeljene na osnovu fragmenata markera (M) u prvom bunariću. Očekivano, u uzorku neindukovanih ćelija nije evidentirano prisustvo aromataze, odnosno nedostaje traka koja odgovara molekulskej masi



Slika 54. Apсорpcioni spektar F3-F6 frakcija sa karakterističnim Soretovim pikom na oko 415 nm.

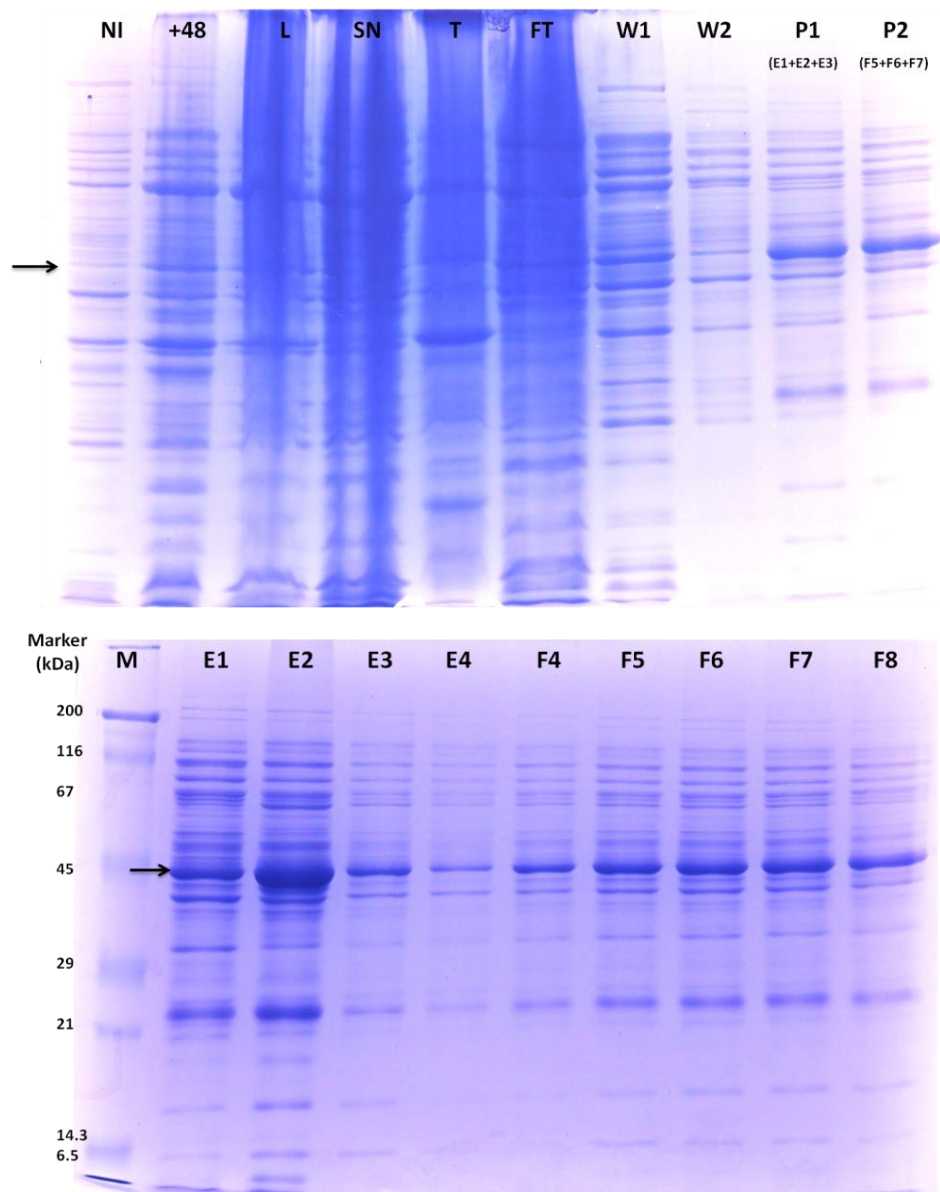
karakterističnoj za ovaj protein. Osvrtom na faze posle indukovanja ekspresije, već 7 h nakon dodavanja IPTG-a se primećuje traka na oko 55 kDa, koja odgovara aromatazi i čiji intenzitet se ne menja značajno ni nakon 48 h, što verovatno znači da bi optimalno vreme ekspresije moglo biti kraće, ali je neophodno ispitati da li će enzim biti pravilno savijen i aktivan. Uzorke lizata, supernatanta, taloga i protočne frakcije zbog razmaza usled visokog sadržaja sporednih proteina je teško protumačiti, ali čini se da nije sav CYP450 protein preveden u solubilnu formu, kao i da se deo ne vezuje za His trap kolonu, što je potvrđeno u frakcijama ispiranja, u kojima enzim koji se nije vezao za Ni^{2+} zaostaje u maloj količini. Najveća koncentracija aromataze je dobijena u prva tri eluata afinitetne hromatografije, koji su potom dodatno prečišćeni ekсклюzionom hromatografijom, što je uticalo na blago razblaživanje proteina. Za enzimske testove F frakcije sa najvišim sadržajem aromataze su spojene, alikvotirane i zamrznute na -80°C , a na gelu su označene sa P2, kako bi se stekao uvid u čistoću i količinu proteina kojom se raspolaže u reakciji.

Finalna koncentracija (ukupnih) proteina se kretala oko 0,9 mg/ml, dakle, ukupan prinos iz 1 l bakterijske kulture je iznosio oko 5 mg, što je oko 4 puta manje u odnosu na originalan rad [159]. Molarna koncentracija aromataze izračunata na osnovu $A_{280\text{nm}}$ iznosila je 16 μM . Nedostatak mogućnosti za ultracentrifugiranje nakon liziranja bakterija i izostanak jonoizmenjivačke hromatografije su uticali da frakcija naneta na His trap kolonu ne bude u dovoljnoj meri čista, što je verovatno povećalo šanse za nespecifična vezivanja. Takođe, niži prinos proteina dobijen ovakvim postupkom je moguće objasniti i potencijalnim variranjem temperaturnih uslova u inkubatoru, dok upotrebom dvostruko niže koncentracije IPTG-a u odnosu na originalni protokol nije uočena značajna razlika u produkciji proteina, te su eksperimenti nastavljeni sa koncentracijom 0,5 mM. Pore biogela korišćenog u ručno



Slika 55. Praćenje ekspresije aromataze pre dodatka IPTG-a (NI) i nakon 7, 19, 26 ili 48 h ekspresije (+7, +19, +26, +48); M-marker.

napravljenoj gel filtracionoj koloni sa gravitacionim protokom nisu zadržale kontaminirajuće proteine veće od 20 kDa, dok je u izvornom radu finalna faza koncentrovanja i prečišćavanja vršena u tubama sa limitom od 30 kDa. Pomenuti koraci su svakako uticali na smanjenu čistoću i koncentraciju proteina i u budućnosti je nužna dodatna optimizacija. Međutim, bez obzira na to, potvrđeno je da je dobijen katalitički aktivan protein u zadovoljavajućoj količini, što je bio postavljeni cilj.



Slika 56. Praćenje ekspresije aromataze pre dodavanja IPTG-a (NI), nakon 48 h ekspresije (+48) i u različitim fazama prečišćavanja (W- frakcije nakon ispiranja His trap kolone vezujućim puferom (W1) i vezujućim puferom u prisustvu 20 mM imidazola (W2), E-eluati nakon Ni-afinitetne hromatografije, F-frakcije nakon ekskluzivne hromatografije, P-spojene frakcije (P1: E1+E2+E3; P2: F5+F6+F7)); M-marker.

Nakon sumiranja ovde predstavljenih rezultata, u budućnosti bi svakako trebalo razmisliti o faktorima koji bi uticali na dobijanje čistijeg proteina, kao što su kloniranje 6xHis taga umesto 4xHis, upotreba duže gel filtracione kolone i primena jonoizmenjivačke hromatografije. Aromataza se u mnogo većem prinosu dobija iz humane placentе [293], međutim, ovaj bogat izvor, osim etički komplikovanih procedura dobijanja dozvola, ima još neke nedostatke, poput nemogućnosti ispitivanja uticaja jedinjenja na gensku ekspresiju i prisustva interferirajućih steroidogenih enzima u placentalnim mikrozomima, koji mogu indirektno ometati aromatizaciju [153,155].

U poređenju sa heterolognom ekspresijom u kvascima, prednosti ekspresije u bakterijama se, pre svega, ogledaju u njihovom bržem rastu, kao i lakšem liziranju ćelija zbog odsustva ćelijskog zida. Takođe, smrzavanje taloga bakterija nije uticalo na karakteristike prečišćenog proteina, dok se kod kvasaca javio problem gubitka enzimske aktivnosti, zbog čega je prečišćavanje moralo da se izvede istog dana kada su ćelije istaložene.

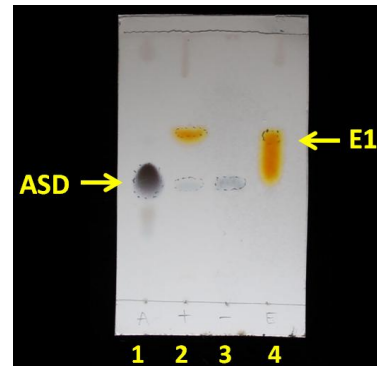
5.9. Aktivnost rekombinantne aromataze u jednokomponentnom i dvokomponentnom enzimskom testu i inhibični efekat odabranih steroidnih derivata

Inhibicija aromataze, ključnog enzima steroidogeneze, koji katalizuje konverziju androgena u estrogene, se zbog velikog farmakološkog značaja u lečenju hormon-zavisnih kancera dojke i drugih reproduktivnih tkiva sve više proučava. U najvećem broju radova objavljenih na temu ispitivanja inhibicije aromataze kao izvor ovog enzima korišćeni su mikrozomi humane placentе za čiju upotrebu u naučne svrhe je neophodan pristanak porodilje i adekvatno čuvanje placentе odmah nakon porođaja, a aktivnost se najčešće meri radioimunoesejem [18,139,294,295], koji, ukoliko se ne preduzmu pravilne mere zaštite, može biti opasan po ljudsko zdravlje i okolinu.

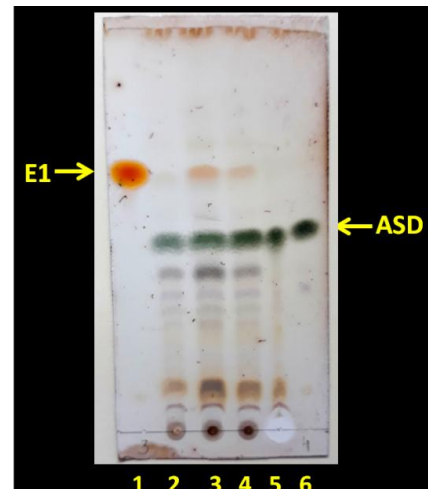
Sa ciljem prevazilaženja pomenutih nedostataka, u sklopu ove doktorske disertacije je razvijen neradioaktivni test za određivanje aktivnosti i inhibicije aromataze detekcijom primenom TLC, koji kao izvor enzima koristi mikrozome rekombinantnih kvašćevih ćelija koje eksprimiraju aromatazu i CPR domaćina (jednokomponentni sistem) ili mikrozome kvašćevih ćelija koje pojačano eksprimiraju humanu CPR i rekombinantnu aromatazu ekspimiranu i prečišćenu iz bakterijskih ćelija (dvokomponentni, kuplovani sistem). U prvom slučaju nivo aromatizacije 80 μ M supstrata, androstendiona, dejstvom funkcionalnog kompleksa aromataza-

CPR iz mikrozoma rekombinantnih ćelija W(R) soja u prisustvu 100 μM NADPH je prikazan na TLC hromatogramu na **Slici 57**. Kolone 1 i 4 se odnose na referentna jedinjenja androstendion i estron, respektivno, a „rep“ se javio zbog nanete velike količine supstance na pločicu. Narandžasta boja je karakteristična za reakciju estrona ili estradiola sa 50% H_2SO_4 nakon zagrevanja, dok se androgeni hormoni (androstendion ili testosteron) boje zeleno-braon [238]. Izolovanom produktu enzimske reakcije, izvedene na 37°C tokom 1 h odgovara kolona 2, iz koje se pouzdano na osnovu upoređivanja retencionih faktora sa retencionim faktorima referentnih jedinjenja (navedenih u nastavku teksta) može zaključiti da je aromatizacijom androstendiona, kao što je i bilo očekivano, nastao estron, dok u negativnoj kontroli u odustvu mikrozoma nije detektovano ni jedno jedinjenje osim polaznog androstendiona. Nažalost, jednokomponentni test nije bio dovoljno reproducibilan, najverovatnije zbog potencijalnih problema sa respiracijom domaćina, te je sistem promenjen.

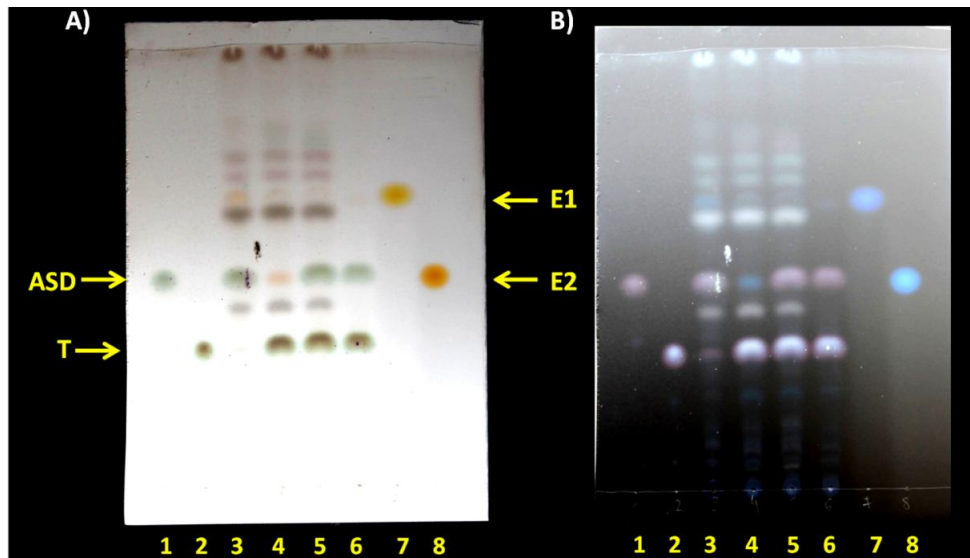
Rezultati razdvajanja steroidnih produkata nastalih u reakciji aromatizacije 100 μM androstendiona u prisustvu 1 mM NADPH u dvokomponentnom sistemu sačinjenom od 230 ili 460 μg mikrozomalnih proteina W(hR) soja i oko 180 μg rekombinantne aromataze prečišćene iz *Escherichia coli* DH5 α soja su prikazani na **Slici 58**. U kolonama 3 i 4, koje predstavljaju ekstrahovane produkte enzimske reakcije u prisustvu 460 ili 230 μg mikrozomalne CPR, respektivno, jasno je uočljiva narandžasta mrlja koja se može dodeliti estronu iste Rf vrednosti (0,65) u razvijaju tolujen:etilacetat = 2:1, što potvrđuje da je u ovom enzimskom testu dokazana katalitička aktivnost aromataze.



Slika 57. TLC hromatogram produkata enzimske reakcije u jednokomponentnom sistemu: 1-ASD, 2- produkt aromatizacije 80 μM ASD u mikrozomima rekombinantnih ćelija W(R) soja u prisustvu 100 μM NADPH, 3-kontrola bez mikrozoma, 4-E1.



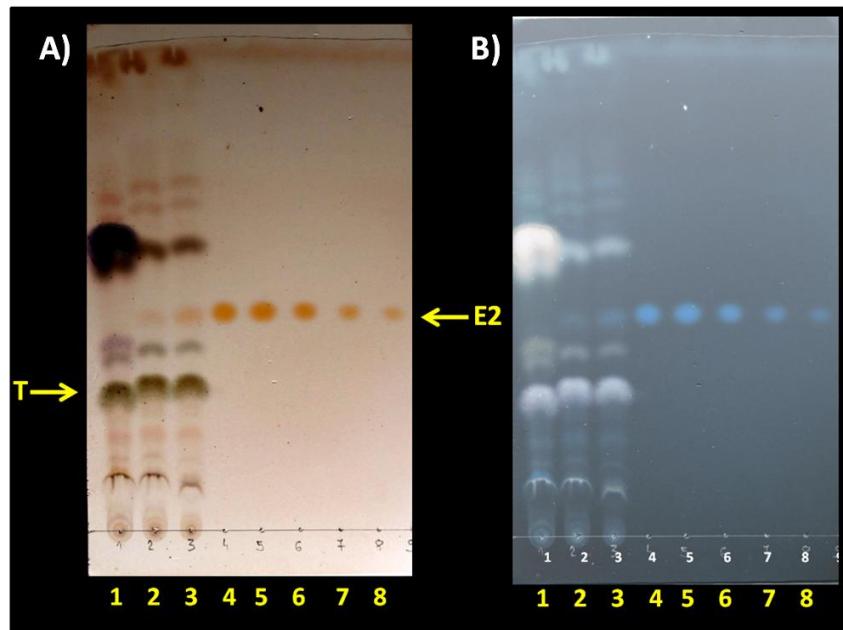
Slika 58. TLC hromatogram produkata enzimske reakcije u dvokomponentnom, kuplovanom sistemu: 1-E1, 2- produkt aromatizacije 100 μM ASD delovanjem rekombinantne aromataze iz bakterija i 460 μg CPR iz kvašćevih mikrozoma u prisustvu 1 mM NADPH, 3- produkt aromatizacije 100 μM ASD delovanjem rekombinantne aromataze iz bakterija i 230 μg CPR iz kvašćevih mikrozoma u prisustvu 1 mM NADPH, 4- kontrola bez aromataze, 5-kontrola bez mikrozoma, 6-ASD.



Slika 59. TLC hromatogram (sa A-originalnim, B-invertovanim bojama) produkata enzimskog testa u dvokomponentnom, kuplovanom sistemu: 1-ASD, 2-T, 3- produkt aromatizacije 100 μ M ASD delovanjem rekombinantne aromataze iz bakterija i CPR iz kvašćevih mikrozoma u prisustvu 1 mM NADPH, 4- produkt aromatizacije 100 μ M T delovanjem rekombinantne aromataze iz bakterija i CPR iz kvašćevih mikrozoma u prisustvu 1 mM NADPH, 5- kontrola bez aromataze, 6-kontrola bez mikrozoma, 7-E1, 8-E2.

Takođe, očigledno je i smanjenje u aktivnosti enzima kada se koncentracija CPR iz mikrozoma dvostruko smanji, međutim nastala količina estrona je i dalje detektibilna TLC hromatografijom. Moguće je da je pri smanjenju odnosa CPR:aromataza došlo do dominantnijeg formiranja C-19-oksidovanih androgenih intermedijera, što su Sethumadhavan i Bellino dokazali da se odvija pri supersaturišućoj koncentraciji aromatazne komponente u odnosu na CPR [139]. Kontrolne probe u odsustvu aromataze, mikrozoma ili supstrata odgovaraju kolonama 2, 5 i 6, respektivno, i na osnovu njih se može zaključiti da dodatne plave i braon mrlje na TLC hromatogramu pripadaju molekulima prirodno prisutnim u kvašćevim mikrozmima, a koji se rastvaraju u ekstrakcionom sredstvu, metilenhloridu. Zbog blizine mrlja ovih sporednih metabolita mrlji željenog produkta, eksperimenti su ponovljeni na isti način, s tim što je kao supstrat upotrebljen testosteron, čiji je produkt aromatizacije, estradiol, polarniji od estrona, odnosno ima nižu Rf vrednost (0,46) u razvijaju toluen:etilacetat = 2:1. Ovi rezultati su prikazani na **Slici 59**, a invertovanjem originalnih boja još je lakše razlikovanje mrlja i upoređivanje sa referentnim jedinjenjima, koja su naneta na prva i poslednja dva mesta na pločici. Reakcije aromatizacije i sa androstendionom (kolona 3) i sa testosteronom (kolona 4) su rezultovale nastankom očekivanih estrogena, s tim što je zbog planirane kvantifikacije nastalog produkta denzitometrijskom analizom, pogodnije bilo eksperimente nastaviti korišćenjem testosterona kao

supstrata. Kontrolne probe u kolonama 5 i 6 se nisu razlikovale u odnosu na prethodne eksperimente.

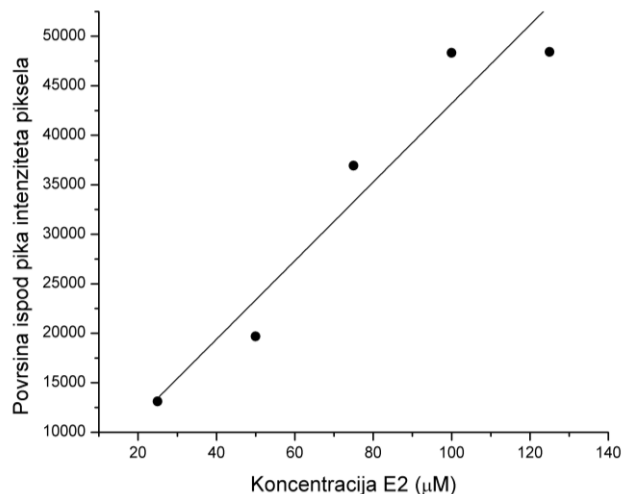


Slika 60. TLC hromatogram (sa A-originalnim, B-invertovanim bojama) produkata enzimskog testa u dvokomponentnom, kuplovanom sistemu: 1-produkt aromatizacije 100 μM T delovanjem rekombinantne aromataze iz bakterija i CPR iz kvašćevih mikrozoma u prisustvu 1 mM NADPH i 1 mM formestana sa preinkubacijom, 2-produkt aromatizacije 100 μM T delovanjem rekombinantne aromataze iz bakterija i CPR iz kvašćevih mikrozoma u prisustvu 1 mM NADPH i 1% DMSO rastvarača sa preinkubacijom, 3- produkt aromatizacije 100 μM T delovanjem rekombinantne aromataze iz bakterija i CPR iz kvašćevih mikrozoma u prisustvu 1 mM NADPH bez preinkubacije, 4-8- 125, 100, 75, 50, 25 μM E2.

Posle optimizacije eksperimentalnih uslova sa prirodnim supstratima aromataze, ispitan je inhibicioni efekat poznatog inhibitora aromataze, formestana, i sintetisanih steroidnih derivata **33**, **52** i **63** u koncentraciji 1000 μM , a specifična enzimska aktivnost je kvantifikovana denzitometrijski. Uslovi koji su prethodili rezultatima prikazanim na **Slici 60.** su podrazumevali preinkubaciju aromataze sa formestanom (kolona 1) ili DMSO rastvaračem (kolona 2) 30 min na 37°C, uobičajen korak u testovima inhibicije da bi se osiguralo vezivanje inhibitora za enzim, nakon čega je nastavljena inkubacija još 2 h u prisustvu ostalih komponenti reakcione smeše (CPR, NADPH i supstrata), dodatih na prethodno opisan način. Osim toga, u cilju kontrole uslova eksperimenta, u jednoj od proba (kolona 3) ispitana je aktivnost aromataze bez preinkubacije sa inhibitorom ili rastvaračem. Kada se upoređi količina nastalog estradiola u prve tri kolone, može se zaključiti da je formestan u testiranoj koncentraciji u potpunosti inhibirao aromatazu, kao i da je preinkubacija aromataze sa DMSO rastvaračem rezultovala smanjenom aktivnošću enzima u odnosu na netretiranu kontrolu. Da bi se nastali estrogini produkt

kvantifikovao, na pločicu je u isto vreme nanet i estradiol u koncentracijama 25, 50, 75, 100 i 125 μM , a kvantitativna analiza je izvršena u ImageJ programu za denzitometriju merenjem (i poređenjem) površine ispod pikova koji odgovaraju intenzitetu piksela zaokruženih mrlja.

Nakon određivanja koncentracije nastalog estrogenog produkta korišćenjem standardne krive (Slika 61) i uzimanja u obzir faktora razblaženja izračunata je specifična enzimska aktivnost aromataze u odsustvu inhibitora 0,1 nmol/mg·min. Ova vrednost je niža u odnosu na specifičnu aktivnost aromataze prečišćene iz placente [294], gde je izolacija ovog membranskog proteina jednostavnija i prinos veći. Kada je utvrđeno da preinkubacija sa samim DMSO rastvaračem može uticati na smanjenje

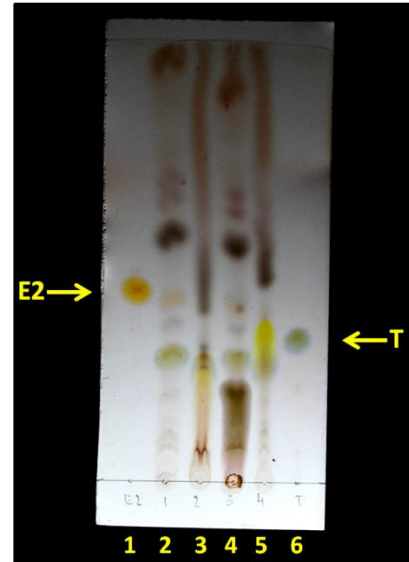


Slika 61. Standardna kriva zavisnosti površine ispod pika intenziteta piksela mrlje E2 od koncentracije.

aktivnosti aromataze, u sledećem ciklusu eksperimenata enzim je bio izložen steroidnim derivatima **33**, **52** i **63** u koncentraciji 1000 μM tokom 2 h na 37°C, bez preinkubacije. D-homo lakton sa modifikacijom na C-19 (**33**) i 17 α -pikolil androstanski derivat **63** su, kao i formestan, potpuno inhibirali aromatazu (Slika 62, kolone 3 i 5, respektivno), dok je u prisustvu oksima **52** došlo do slabe inhibicije od 29% (kolona 4). Kada se uporede strukture ovih jedinjenja i procenti inhibicije aromataze dobijeni enzimskim testom, moglo bi da se pretpostavi da je njihov inhibitorski kapacitet povezan sa prisustvom 4-en-3-on sistema, koji imaju i prirodni supstrati ovog enzima, androstendion i testosteron, a koji omogućava vezivanje za aktivni centar enzima. Izmeren jak potencijal za inhibiranje aromataze i izostanak estrogene/androgene aktivnosti (Tabela 20) čini steroidna jedinjenja **33** i **63** veoma interesantnim kandidatima za dalja istraživanja u polju terapije kancera dojke, u kojem je konstantna težnja za razvojem novih netoksičnih terapeutika sa specifičnim načinom delovanja, ali ne treba zanemariti da su ovde testirani u visokim koncentracijama i da bi u budućim istraživanjima trebalo ispitati niži opseg koncentracija i odrediti IC₅₀ vrednost. Đurendić i saradnici su za jedinjenje sa 17 α -pikolil supstituentom u homogenatu jajnika ženki pacova tretiranih PMSG hormonom (gonadotropin iz seruma ždrebnih kobila, *engl.* pregnant mare's serum gonadotropin) odredili umerenu inhibiciju

(51,5%) aromataze u koncentraciji 20 puta nižoj od ovde testirane [296]. U enzimskom testu gde je kao izvor CPR umesto mikrozoama korišćen ekstrakt lizata ćelija kvasaca, aktivnost aromataze nije detektovana (rezultati nisu prikazani).

Enzimski test je u dvokomponentnom, kuplovanom sistemu pokazao bolju reproducibilnost od jednokomponentnog, ali je njegov glavni nedostatak duži proces ekspresije i prečišćavanja, s obzirom na to da je neophodno izolovati dva proteina iz odvojenih model organizama. Tokom optimizacije uslova u kuplovanom sistemu je određena proporcija aromatazne i reduktazne komponente neophodna za katalitičku aktivnost, što je dobra osnova za istraživače koji bi u budućnosti u istom sistemu testirali inhibiciju aromataze. S obzirom na to da strategijski pristup smanjenja tkivne produkcije estrogena inhibicijom aromataze daje obećavajuće rezultate u lečenju pacijenata obolelih od kancera dojke [64] i da je put do odobrenog leka na tržištu veoma dugačak i zahtevan, značaj ovde razvijenog *in vitro* testa je u identifikaciji modifikovanih steroida sa efektom inhibiranja aktivnosti aromataze što, u stvari, čini „prvi stepenik na lestvici“ za dalja *in vitro*, *in vivo*, preklinička i klinička ispitivanja, kao i u eliminaciji jedinjenja bez značajne aktivnosti, čime se štede resursi u istraživanjima.

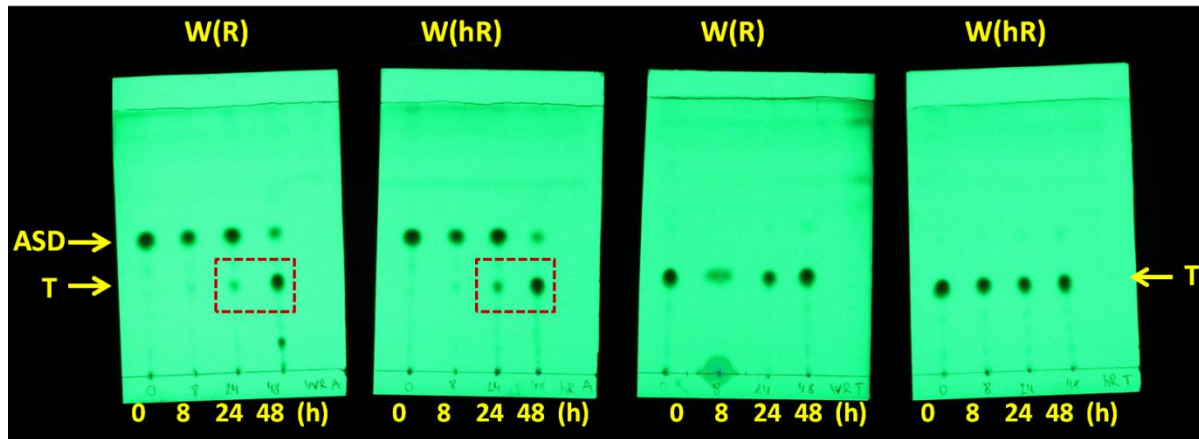


Slika 62. TLC hromatogram produkata enzimskog testa u dvokomponentnom, kuplovanom sistemu 1 h nakon izvođenja: 1-E2, 2-produkt aromatizacije 100 μ M T delovanjem rekombinantne aromataze iz bakterija i CPR iz kvašćevih mikrozoama u prisustvu 1 mM NADPH, 3, 4, 5- produkt aromatizacije 100 μ M T delovanjem rekombinantne aromataze iz bakterija i CPR iz kvašćevih mikrozoama u prisustvu 1 mM NADPH i 1 mM jedinjenja **33**, **52** i **63**, respektivno, bez preinkubacije, 6-T.

5.9.1. Rezultati ispitivanja aktivnosti aromataze ostalim testovima

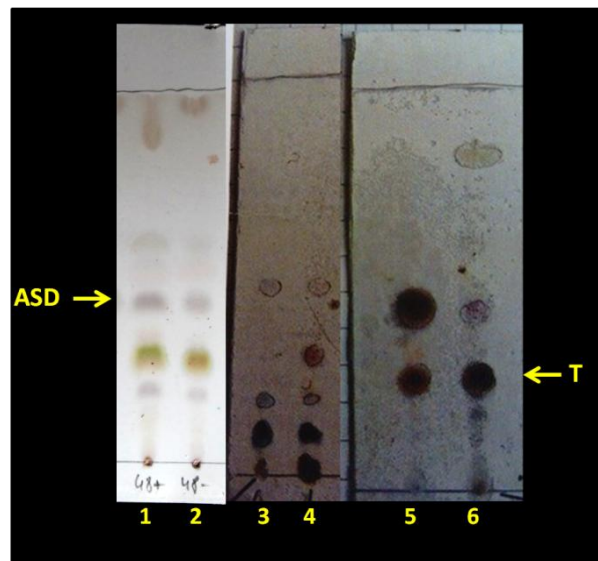
Pored opisanih bioloških testova za ispitivanje aktivnosti aromataze, sa težnjom da se broj eksperimentalnih faza redukuje, detekcija proizvoda enzimske reakcije izvede direktno kuplovanim fluorescentnim testom u kvascu umesto TLC hromatografijom ili smanji količina potrebnog proteina za analizu i aktivnost indirektno prati oksidacijom kofaktora, u okviru disertacije su razvijani dodatni testovi. U prvom je praćeno vremenski-zavisno formiranje steroidnih produkata u konverziji androstendiona/testosterona delovanjem *Saccharomyces cerevisiae* W(R)/W(hR) soja koji eksprimira aromatazu. Biokonverzija je praćena u vremenskom intervalu od 48 h posle indukcije ekspresije galaktozom i dodavanja supstrata, nakon čega su

steroidni produkti, ekstrahovani iz reakcione smeše organskim rastvaračem, identifikovani TLC hromatografijom (Slika 63).



Slika 63. TLC hromatogrami nakon ekstrakcije steroidnih produkata u različitim vremenskim intervalima biokonverzije ASD/T dejstvom *Saccharomyces cerevisiae* W(R) i W(hR) sojeva koji ekspimiraju aromatazu.

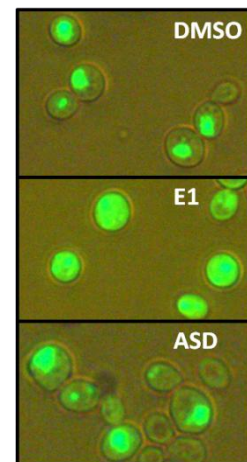
U ćelijama tretiranim testosteronom u koncentraciji 200 μM nije došlo do njegove detektibilne konverzije u estradiol, dok je androstendion u oba slučaja nakon 48 h skoro potpuno redukovano do testosterona, što je otvorilo novo pitanje-da li je za metabolizam androstendiona u ovoj biokonverziji dominantno odgovorna kvašćeva 17 β -HSD, analogna onoj kod sisara? Iako u ovom sistemu nije dokazana aktivnost aromataze kao što je bilo predviđeno, njegova važnost se ogleda u mogućnosti ispitivanja aktivnosti drugog steroidnog enzima (17 β -HSD) na jednostavan način, direktno iz tečne kulture bez potrebe za izolacijom mikrozoama. Rezultati ispitivanja uticaja inhibitora ove hidrosisteroid-dehidrogenaze, ibuprofena [297], na intracelularnu konverziju



Slika 64. TLC hromatogrami nakon ekstrakcije steroidnih produkata nakon 48 h biokonverzije steroidnog supstrata dejstvom *Saccharomyces cerevisiae* FY250 ili W(R) soja koji ekspresuje aromatazu u različitim uslovima (1- biokonverzija ASD u W(R) soju sa ekspimiranom aromatazom u prisustvu inhibitora 17 β SD, 2- biokonverzija ASD u W(R) soju sa ekspimiranom aromatazom bez inhibitora 17 β SD, 3- biokonverzija ASD u FY250 soju sa ekspimiranom aromatazom, 4- biokonverzija T u FY250 soju sa ekspimiranom aromatazom) i W(R) sojeva bez ekspimiranog enzima (5-6).

androstendiona u testosteron, prikazani na **Slici 64.** (kolone 1 i 2), pokazuju veću koncentraciju neizreagovalog supstrata u probi sa inhibitorom (kolona 1) u odnosu na onu bez (kolona 2), što bi moglo predstavljati potvrdu da se zaista radi o pretpostavljenom tipu enzima i osnovu za ispitivanje delovanja drugih (potencijalnih) inhibitora. Nakon 48 h inkubacije supstrata u medijumu bez ćelija dokazana je stabilnost ovog jedinjenja, čime je još jednom potvrđeno da je pomenuta konverzija rezultat aktivnosti isključivo enzima prisutnog u ovom soju kvasca. Pretpostavka da je odsustvo enzimske aktivnosti aromataze bilo uzrokovano nedostatkom kofaktora i nedovoljno visokom temperaturom biokonverzije je dovela do novih eksperimentalnih uslova u kojima je NADPH dodat u tečnu kulturu gajenu na 36°C, ali ni u ovom slučaju nije detektovana aktivnost. Zatim, u FY250 soju sa eksprimiranom aromatazom u procesu biokonverzije androstendiona (kolona 3)/testosterona (kolona 4) nastaje polarnije jedinjenje od polaznog, za koje nije bio dostupan referentni standard da bi se okarakterisalo, dok se u domaćinima bez unetog gena za aromatazu (kolona 6) ili bez indukovane ekspresije aromataze (kolona 5) dominantno odvijala konverzija androstendiona u testosteron. Da bi se povećao prinos ciljnog produkta, rešenje bi možda moglo biti inaktiviranje gena za enzime, koji su odgovorni za ovu neželjenu dominantnu biokonverziju steroida [241], u ovom slučaju 17 β -HSD.

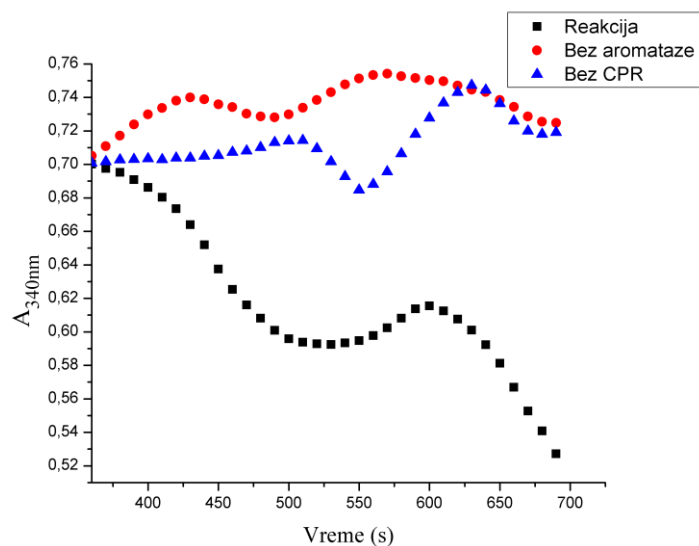
Narednim testom, koji je dizajniran tako da proizvodi, nastali biohemijomskom reakcijom aromataze unutar rekombinantne ćelije kvasca sa koeksprimiranim ER β LBD-YFP, budu detektovani optimizovanim fluorescentnim biosenzorom u kuplovanom sistemu, nisu dobijeni očekivani rezultati ni u slučaju FY250, niti W(hR) domaćina. To svakako ne umanjuje značaj ove originalne ideje na čijem razvoju u naučnoj zajednici još uvek nije rađeno, a pregled prepoznate dragocene primene enzimskih biosenzora u biomedicinskim istraživanjima su dali Rocchitta i saradnici [298]. Ćelije tretirane estronom su pokazale jak intenzitet fluorescencije raspoređen po čitavoj citoplazmi, dok su ćelije izložene androstendionu u istoj koncentraciji pokazale lokalizovan, znatno niži fluorescentni signal, sličan kontrolnim ćelijama u odsustvu steroida (**Slika 65**), što znači da nije postignuta konverzija u estrogeni proizvod, estron, delovanjem eksprimirane aromataze. Izostanak identifikacije estrogena u



Slika 65. Fluorescencija rekombinantnih ćelija kvasca FY250 soja sa koeksprimiranom aromatazom i ER β LBD-YFP tretiranih 1% DMSO rastvaračem, 10 μ M E1 i ASD.

ovom fluorescentnom enzimskom biosenzoru može biti objašnjen sledećim činjenicama: heterologna ekspresija aromataze u ovim domaćinima nije optimizovana, nedostatak CPR esencijalne za aktivnost aromataze u FY250 soju, dejstvo metabolišućih enzima kvasca na supstrate (dokazano u prethodnom testu), nedovoljna osetljivost fluorescentnog biosenzora na koncentraciju nastalih estrogena ili interferencija testa sa komponentama medijuma, i drugo.

Stepen oksidacije NADPH, praćen smanjenjem apsorbance na 340 nm usled potrošnje ovog molekula u reakciji aromatizacije, predstavljao je još jedan od načina da se dokaže aktivnost aromataze. Reakcija je izvedena u puferu čija je osnova 100 mM K-fosfat, jer postoje podaci da aromataza nije stabilna u rastvoru niže jonske jačine [242]. Nakon inicijacije reakcije dodavanjem NADPH u reakcionu smešu rekombinantne aromataze iz *Escherichia coli* DH5 α soja, mikrozoma iz W(hR) soja sa eksprimiranom kvaščevom i humanom CPR i testosterona u odgovarajućem puferu, $A_{340\text{nm}}$ je snimana u intervalima od 10 sekundi tokom 10 min. Rezultati su predstavljeni na **Slici 66.** i prikazuju promenu $A_{340\text{nm}}$ počevši od 6 min nakon inicijacije reakcije, tj. nakon što su prestale početne oscilacije u signalu. Vrednosti su normalizovane, tako da počinju iz iste tačke radi lakšeg poređenja. U probi koja je označena kao „reakcija“, odnosno gde ništa nije ometalo izvođenje reakcije aromatizacije testosterona u prisustvu CPR, zabeležen je najveći pad $A_{340\text{nm}}$, odnosno najveće iskorišćenje NADPH kofaktora. U kontrolnim probama odsustvo aromataze ili CPR je rezultovalo skoro konstantnom vrednošću $A_{340\text{nm}}$ tokom vremena, ukazujući da verovatno ni u jednom od ova dva uzorka proteina nakon prečišćavanja nisu prisutni enzimi koji bi mogli izvršiti transfer elektrona na NADPH i da je visok stepen oksidacije NADPH rezultat samo funkcionalne



Slika 66. Ispitivanje aktivnosti rekombinantne aromataze iz *Escherichia coli* DH5 α soja praćenjem oksidacije NADPH snimanjem $A_{340\text{nm}}$ tokom 10 min u 3 različite probe. Pad apsorbance označava oksidaciju NADPH aktivnošću aromataze. Reakcija: 76,5 μg CPR, 1,4 μM aromataza, 200 μM T, 200 μM NADPH u 100 mM K-fosfatnom puferu, pH 7,4; 20% glicerol, 0,1% Tween20. Ostale dve probe su istog sadržaja sa izuzetkom aromataze ili CPR.

aromataze u prisustvu CPR. U ovom testu zahvaljujući visokoj osetljivosti UV-VIS spektroskopije, dodata je čak 10 puta manja količina oba proteina u odnosu na kuplovani enzimski test, čime je njihova upotreba svedena na minimum.

Sohl i Guengerich su po istom principu spektrofotometrijski detektovali oksidaciju NADPH, uzrokovanu aktivnošću aromataze [242] upotrebom različitih liganada, pri čemu je najveći stepen oksidacije uočen kod androstendiona, zatim intermedijera, 19-hidroksi androstendiona i 19-oksoandrostendiona, i na kraju estrona. Ovim jednostavnim testom je opisana i aktivnost drugih enzima, poput aldoketoreduktaza [191], CYP1A2 [299] i drugih.

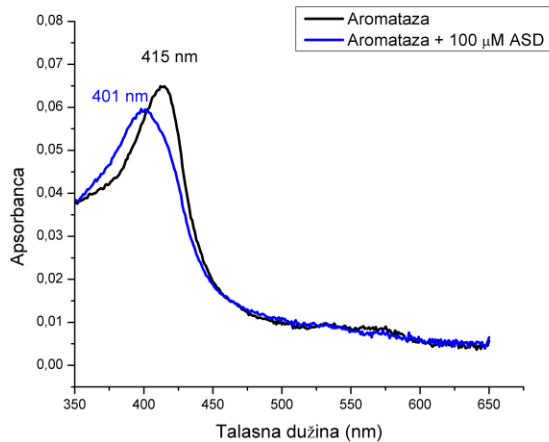
5.10. Skrining vezivanja liganada za aromatazu apsorpcionom spektroskopijom

Sposobnost rekombinantne aromataze da veže ligande potvrđena je apsorpcionom spektroskopijom. Nakon vezivanja 100 ili 500 μM androstendiona, Soretov maksimum u apsolutnom spektru se sa 415-416 nm pomerio ka nižim talasnim dužinama (401-403 nm) (**Slika 67.A i C**), što je tipično za vezivanje supstrata koji istiskuje molekul vode menjajući stanje hemskog Fe iz niskospinskog heksakoordinovanog u visokospinsko pentakoordinovano [165]. Tokom optimizacije eksperimenta ispitano je da li 15-minutna inkubacija proteina sa supstratom na 25°C utiče na vezivanje. Nisu zabeležene razlike u odnosu na apsolutni spektar snimljen odmah po dodavanju liganada. Diferencijalni spektar vezivanja androstendiona za aromatazu prikazan na **Slici 67.B i D** takođe potvrđuje tip I spektralne promene, sa maksimumom na 388-390 i minimumom na 419 nm.

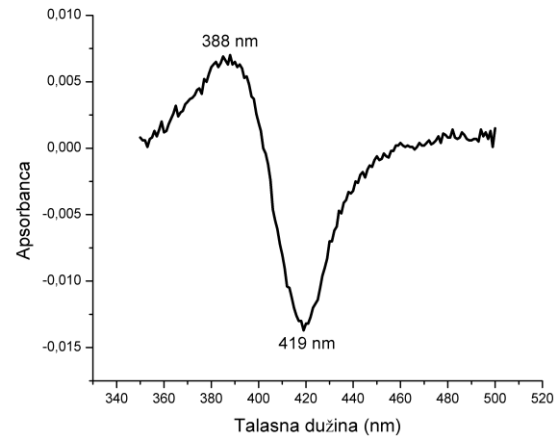
Nardo i saradnici su takođe detektovali spektralne promene tipa I prilikom vezivanja androstendiona za aromatazu, sa pomeranjem Soretovog maksimuma sa 418 na 394 nm [159]. Potpuni prelazak iz niskospinskog u visokospinsko stanje može zavisiti od pH pufera u kom se protein nalazi, pa tako pri vrednostima višim od pH 7 efikasnost ovog prelaska može biti smanjena [172], kao što je slučaj ovde. Vezivanje 500 μM eksemestana je rezultovalo sličnom spektralnom promenom, odnosno pomeranjem Soretovog maksimuma sa 413 na 400 nm (**Slika 68.A**), upućujući na to da se eksemestan vezuje za supstrat-vezujuće mesto enzima, te ga inhibira, što je u skladu sa podacima iz literature [300]. Manje pomeranje Soretovog maksimuma izazvano vezivanjem eksemestana u odnosu na podatke iz literature (gde je maksimum pomeren sa 418 na 394 nm) [172] moglo bi da se dovede u vezu sa eksperimentalnim uslovima, konkretno pH vrednošću pufera, s obzirom na to da je u ovom slučaju korišćen pufer pH vrednosti 7,4.

Prilikom interakcije proteina sa formestanom, u istoj koncentraciji kao eksemestan, došlo je do promene spektra prikazane na **Slici 68.B**. Pomeranje maksimuma Soretovog pika ka nižim talasnim dužinama karakteristično je za strukturne analoge supstrata, androstendiona, kakav je i formestan (4-hidroksiandrostendion), koji je u ovom slučaju izazvao blago pomeranje od 412 do 408 nm.

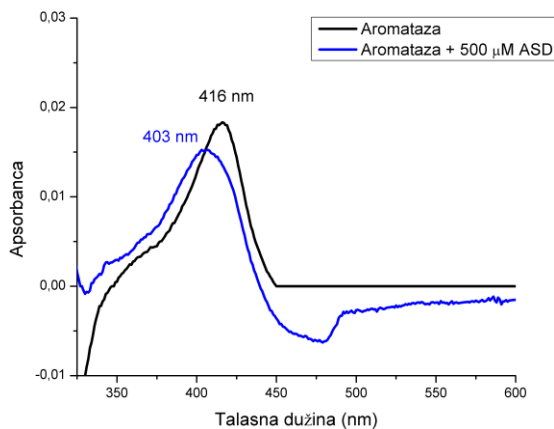
A



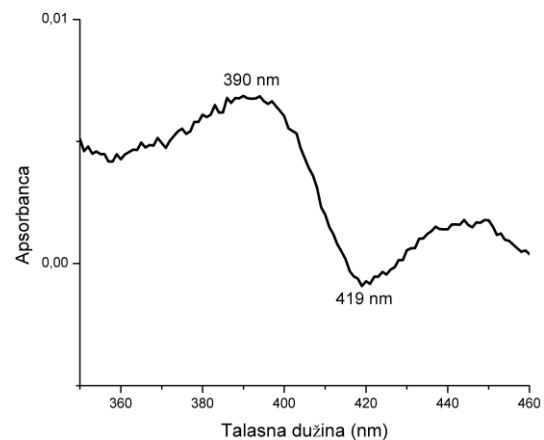
B



C



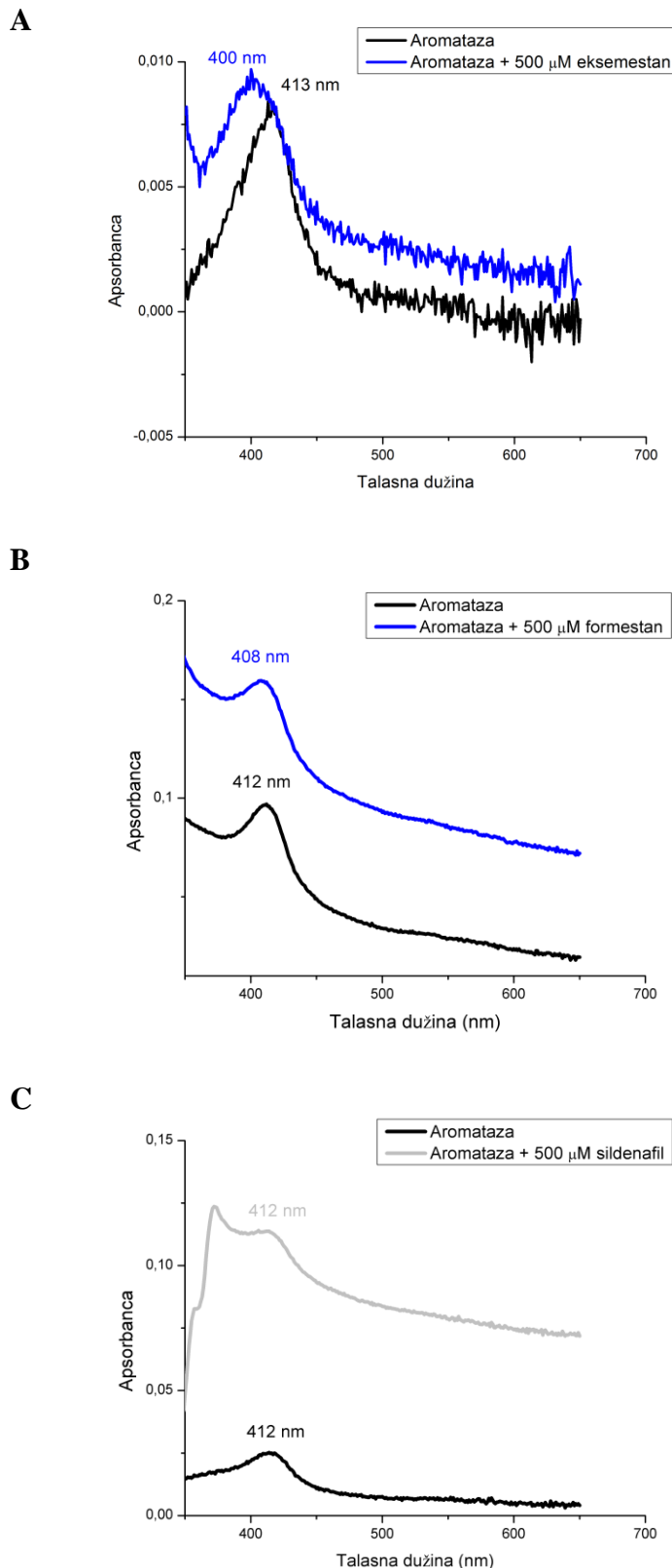
D



Slika 67. A/C) Apsolutni spektar aromataze u 100 mM K-fosfatnom puferu, pH 7,4; 20% glicerol, 0,1% Tween20 sa i bez dodatog 100 μ M/500 μ M ASD, B/D) Diferencijalni spektar dobijen oduzimanjem apsolutnog spektra nevezanog oblika aromataze od vezanog sa 100 μ M/500 μ M ASD.

Vezivanje sildenafilu za aromatazu nije detektovano, tj. nije došlo do pomeranja Soretovog maksimuma nakon dodavanja sildenafilu (**Slika 68.C**), iako je na osnovu rezultata Baravalle-a i saradnika bilo očekivano da dođe do blagog pomeranja ka većim talasnim dužinama, s obzirom

na to da se radi o molekulu koji u svojoj strukturi poseduje atome azota preko kojih se može koordinativno vezati za hemske Fe ili indirektno vodoničnim vezama sa šestim aksijalnim ligandom, vodom [134]. Razlog za izostanak spektralnih promena, može biti nedovoljna čistoća molekula sildenafilila, tj. uticaj interferirajućih komponenti iz DMSO ekstrakta Sildena® tablete na rezultate. Blage varijacije u Soretovom maksimumu proteina u odsustvu liganda u različitim eksperimentalnim ciklusima (412-416 nm) možda bi se mogle pripisati promenama u stabilnosti proteina, osetljivom na oksidaciju. Apsorpcionom spektroskopijom je ispitano i vezivanje šest odabranih steroidnih derivata za aromatazu: **42**, **52**, **53**, **55**, **63** i **64**. Steroidi za ispitivanje interakcija apsorpcionom spektroskopijom su odabrani iz baze modifikovanih steroida na osnovu prisustva 4-en-3-on sistema, kao kod prirodnih liganada (D-homolakton **42**) ili prisustva atoma azota u strukturi D prstena (**52**, **53**, **55**, **63**, **64**), za koje je

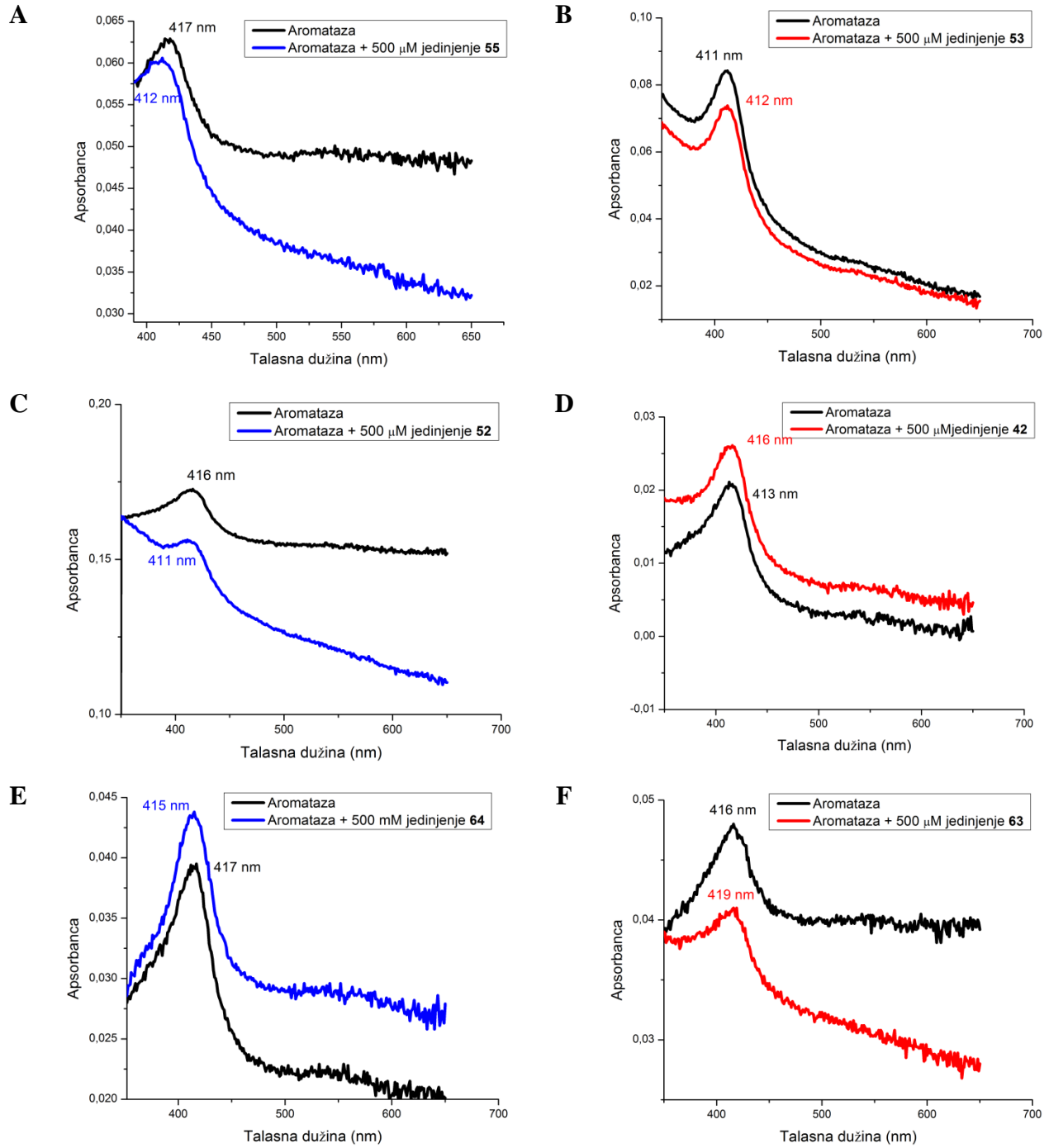


Slika 68. Apsolutni spektar aromataze u 100 mM K-fosfatnom puferu, pH 7,4; 20% glicerol, 0,1% Tween20 sa i bez dodatog 500 μ M eksemestana (A), 500 μ M formestana (B), 500 μ M sildenafilila (C).

potencijalno moguća koordinacija sa hemskim gvožđem, neophodna za vezivanje liganda. Među ispitivanim jedinjenjima, jedinjenja **55** i **52** su dovela do najvećeg pomeranja Soretovog maksimuma ovog CYP450 enzima (za 5 nm ka plavom delu spektra), dok je za jedinjenja **42** i **63** on bio pomeren u suprotnom smeru za 3 nm (**Slika 69**). Interakcija jedinjenja **53**, koje se od **55** razlikuje samo po funkcionalnoj grupi na položaju 16, sa aromatazom nije dovela do promena u spinu, sugerišući značaj oksimino funkcije u ovom položaju steroidnog skeleta za vezivanje za enzim.

Jedinjenje **64** nije dovelo do značajnih promena u položaju Soretovog maksimuma, što bi se verovatno moglo objasniti prisustvom rigidnog pikolinilidenskog supstituenta u položaju 17 ovog steroida. Korelacijom sa rezultatima dobijenim u testovima inhibicije, može se pretpostaviti da jedinjenje **63**, koje dovodi do tipa II spektralnih promena, možda preko koordinativnog vezivanja sa atomom azota fleksibilnog 17-pikolil supstituenta stabilizuje niskospinsko stanje Fe iz hema, delujući kao šesti ligand nakon istiskivanja vode, te na taj način inhibira aktivnost aromataze.

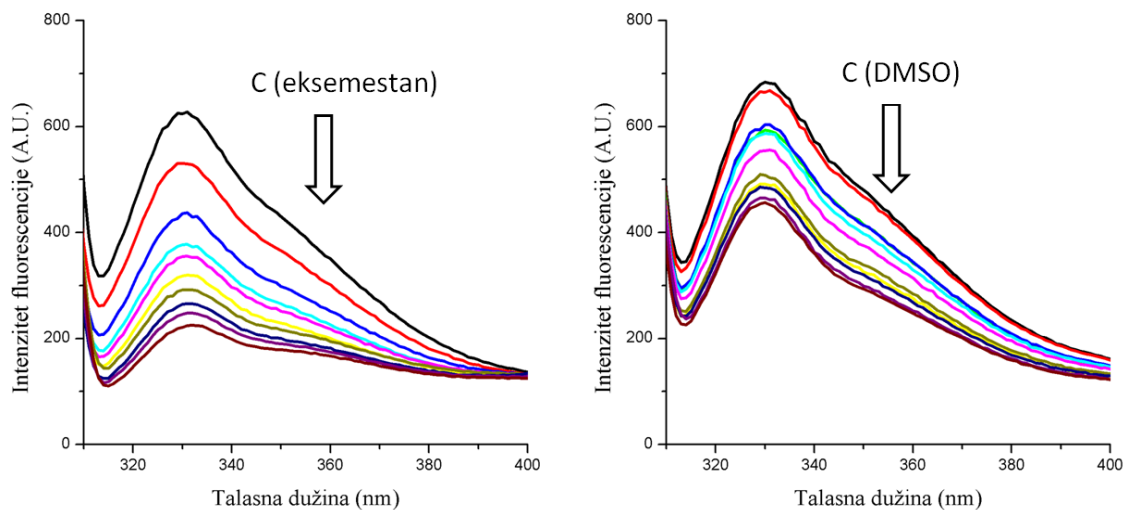
Sa druge strane, jedinjenje **52** je pokazalo slabu inhibiciju, što je u saglasnosti sa tipom spektralne promene koju izaziva, odnosno verovatno dolazi do kompeticije sa prirodnim supstratom za vezujuće mesto. S obzirom na to da se radi o veoma blagim promenama u Soretovom maksimumu, može se pretpostaviti i to da se ispitivana jedinjenja možda vezuju na periferiji aktivnog centra i na indirektan način menjaju okolinu hem grupe, za šta su potrebna dodatna istraživanja. Osim testiranih modifikovanih steroida, vezivanje između nesteroidnih tetrazola **57** i **58** i aromataze je takođe ispitano apsorpcionom spektroskopijom, ali bez izmerenog značajnog afiniteta.



Slika 69. Apsolutni spektar aromataze u 100 mM K-fosfatnom puferu, pH 7,4; 20% glicerol, 0,1% Tween20 sa i bez dodatog 500 μ M jedinjenja **55** (A), **53** (B), **52** (C), **42** (D), **64** (E), **63** (F). Plavom bojom su označena pomeranja ka plavom delu spektra, a crvenom ka crvenom delu spektra.

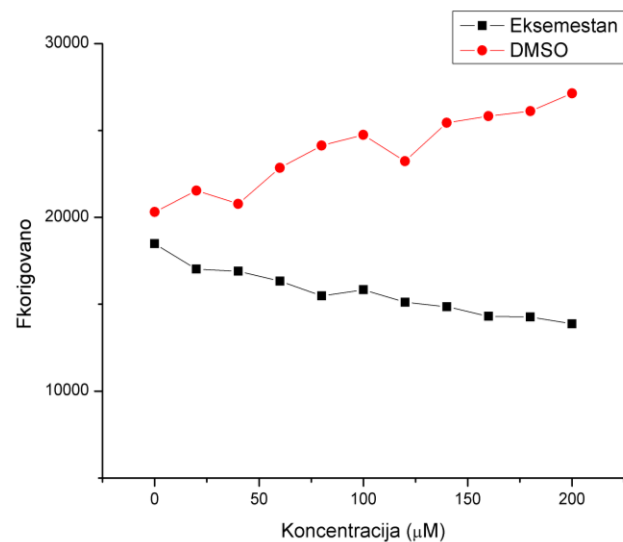
5.11. Promene u konformaciji aromataze usled vezivanja liganda praćene fluorescencijom triptofana

Za selekciju potencijalnih liganada aromataze apsorpciona spektroskopija je najčešće korišćena procedura, međutim Nardo i saradnici, pioniri u proučavanju dinamike i fleksibilnosti ovog enzima fluorescentnom spektroskopijom, navode prednosti ove tehnike [159]. Ova istraživačka grupa je zahvaljujući promenama u fluorescentnom spektru aromataze dokazala vezivanje anastrozola i androstendiona, dok je u okviru disertacije fluorescentnom spektroskopskom tehnikom prvi put ispitan uticaj poznatih inhibitora, eksemestana i formestana, na konformaciju rekombinantne humane aromataze, kao i vezivanje odabranih steroidnih derivata. Rezultati dobijeni snimanjem fluorescentnih spektara prečišćene rekombinantne aromataze na talasnim dužinama karakterističnim za ekscitaciju i emisiju Trp su pokazali maksimum na oko 330 nm, tipično za indolni prsten ove aminokiseline u hidrofobnom okruženju. Od pet ostataka triptofana prisutnih u molekulu aromataze, jedan se nalazi unutar aktivnog centra, pa je na ovaj način izvršena dodatna evaluacija aktivnosti odabranih jedinjenja, čijim vezivanjem su nastale promene u okruženju hem grupe, detektovane apsorpcionom spektroskopijom. Na dinamiku Trp ostatka, odnosno na „gašenje“ unutrašnje fluorescencije je najviše uticalo dodavanje eksemestana (**Slika 70**).



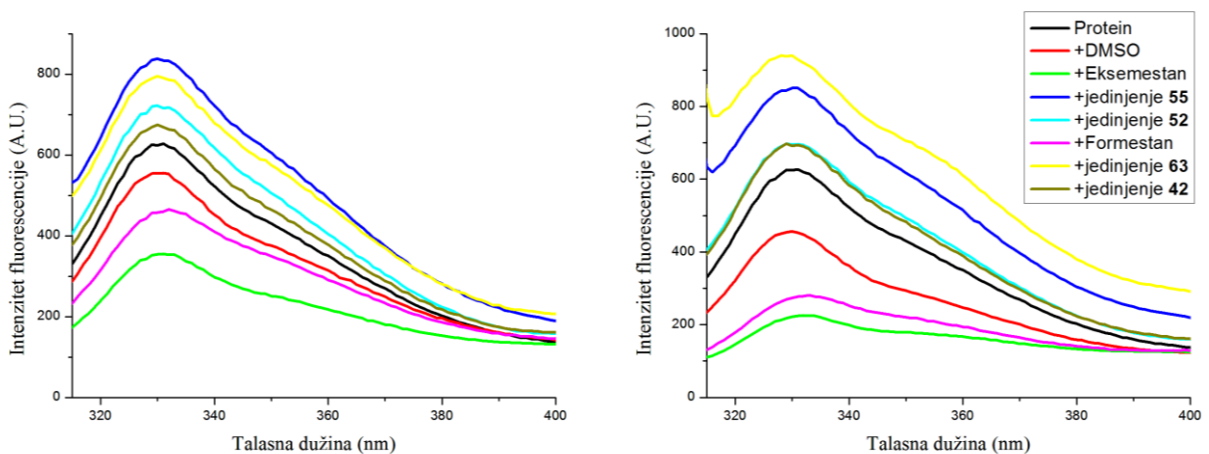
Slika 70. Fluorescentni emisijski spektri rekombinantne aromataze tretirane sa 0-200 μ M eksemestanom (levo) i DMSO rastvaračem (desno) u porcijama istih zapremina (po 2 μ l).

Enzim je tretiran rastvorom 10 mM eksemestana u porcijama od 2 μl i, radi kontrole, DMSO rastvaračem u istim zapreminama. Poređenjem fluorescentnih spektara ovih proba primećuje se mnogo veći pad intenziteta fluorescencije Trp prilikom tretiranja inhibitorom, koji svojim jakim vezivanjem, koje je potvrđeno i apsorpcionom spektroskopijom, verovatno menja konformaciju aromataze. Osim u vidu sirovih spektara, ovi rezultati su na **Slici 71.** predstavljeni i u obliku zavisnosti intenziteta korigovane fluorescencije (Fkorigovano) od koncentracije dodatog eksemestana, odakle se takođe jasno vidi uticaj ovog agensa na fluorescenciju triptofana.



Slika 71. Zavisnost korigovane vrednosti fluorescencije Trp od koncentracije eksemestana i DMSO-a dodatog u istim zapreminama.

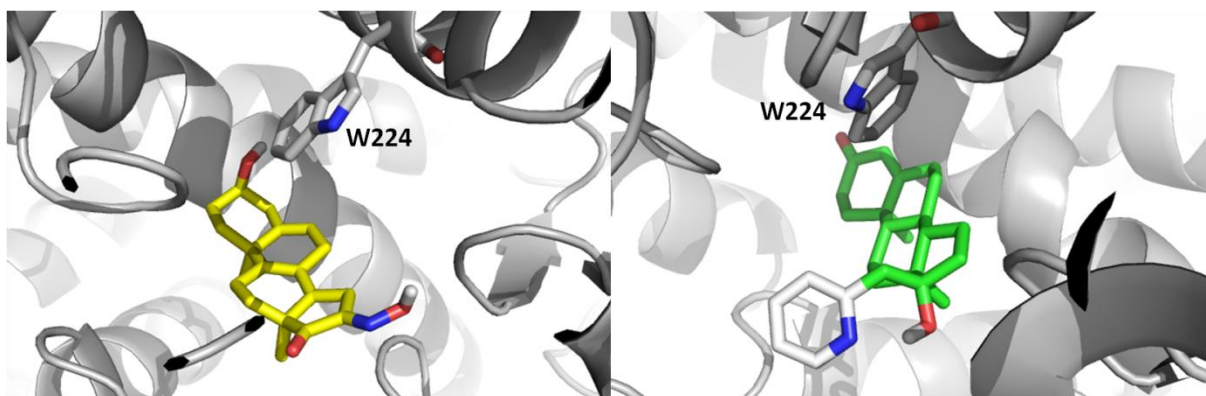
Takođe, prilikom tretiranja proteina formestanom ili ispitivanim steroidnim derivatima u finalnim koncentracijama 100 i 200 μM intenziteti maksimuma fluorescentnih spektara i njihov položaj u odnosu na spektar slobodnog proteina su se razlikovali (**Slika 72**).



Slika 72. Fluorescentni emisijski spektri rekombinantne aromataze tretirane DMSO rastvaračem i ispitivanim jedinjenjima u koncentracijama 100 μM (levo) i 200 μM (desno).

Naime, posle eksemestana najveći efekat „gašenja“ unutrašnje proteinske fluorescencije je izazvao formestan, što je bilo i očekivano na osnovu rezultata apsorpcione spektroskopije, u

kojima je pomeranje Soretovog pika indukovano ovim inhibitorom. U odsustvu liganda uticaj DMSO-a na fluorescenciju je pri nižoj dodatoj zapremini blag, dok pri višoj značajno smanjuje intenzitet fluorescencije, ali ne u meri u kojoj to čine inhibitori, eksemestan i formestan. Kada su u pitanju steroidni derivati, koji su u testovima apsorpcione spektroskopije pokazali najveću sklonost ka vezivanju (jedinjenja **42**, **52**, **55** i **63**), rezultati dobijeni fluorescentnom spektroskopijom su pokazali da svi oni izazivaju promenu u fluorescentnom spektru nativnog proteina porastom intenziteta fluorescencije triptofana, od kojih najviše jedinjenja **63**, **55** i **52**. S obzirom na to da na fluorescenciju triptofana, osim polarnosti mikrookoline, može da utiče i promena u terciarnoj strukturi u blizini ove fluorofore, poput formiranja intra- ili intermolekulskih vodoničnih veza i drugih nekovalentnih interakcija, kao i elektronski i energetski transferi [176], za dobijene rezultate se može reći da su obećavajući, odnosno da ispitivani modifikovani steroidi zaista dovode do konformacionih promena u blizini aktivnog centra, međutim za kompletno rasvetljavanje mehanizma su neophodne dodatne studije. **Slika 73** prikazuje molekularnim dokingom predviđeni položaj jedinjenja **52** i **63** u odnosu na Trp224 (W224) u aktivnom centru aromataze, na osnovu čega se može pretpostaviti da piridinski prsten pikolina **63** učestvuje u nekovalentnim interakcijama sa indolnim sistemom Trp224 ili okolnim aromatičnim aminokiselinama koje indirektno utiču na promenu u njegovoj unutrašnjoj fluorescenciji, a da jedinjenje **52** utiče na ovaj fenomen formiranjem vodoničnih veza sa Trp224.



Slika 73. Predviđeni položaj jedinjenja **52** (žuto) i **63** (zeleno) u odnosu na Trp224 (W224) u aktivnom centru aromataze (PDB ID: 3EQM).

Na kraju, ovom jednostavnom metodom za ispitivanje protein-ligand interakcija je potvrđeno da jedinjenja koja su uticala na promene u položaju Soretovog pika aromataze kao potencijalni ligandi, zaista mogu opravdati tu ulogu, s obzirom na to da u kontaktu sa proteinom indukuju i promene u fluorescentnom emisionom spektru Trp ostataka (od kojih je jedan u

aktivnom centru enzima), sugerišući postojanje interakcija. Kombinacijom osjetljivih metoda apsorpcione i fluorescentne spektroskopije, potencijalni ligandi aromataze mogu biti testirani na ekološki prihvatljiv način, upotrebom male količine proteina.

6. ZAKLJUČAK

U okviru ove doktorske disertacije uspešno su realizovani postavljeni ciljevi istraživanja. U prvom delu disertacije je, kroz više eksperimentalnih faza, optimizovan test u kvascu, koji se ne zasniva na praćenju transkripcije niti korišćenju radioaktivnih proba, nego na merenju intenziteta fluorescencije u cilju ispitivanja relativnog afiniteta vezivanja širokog spektra derivata steroidnih hormona za LBD ER α , ER β i/ili AR, sa visokom specifičnošću i osetljivošću. S obzirom na to da je emitujuća fluorescencija posledica FRET fenomena između dva YFP molekula usled dimerizacije LBD domena steroidnog receptora nakon vezivanja liganda, intenzitet fluorescentnog signala je korelirao sa relativnim afinitetom vezivanja liganda. U poređenju sa transkripcionim testovima, koje istraživači najčešće upotrebljavaju za ispitivanje estrogenog ili androgenog potencijala molekula, prednost fluorescentnog testa u kvascu je mogućnost identifikacije svih jedinjenja koja ostvare vezivanje za LBD, bez aktivacije transkripcione mašinerije, kao i izostanak upotrebe dodatnih supstrata za vizuelizaciju. Osim toga, nije neophodno lizirati ćelije, jer se fluorimetrom direktno meri intenzitet fluorescencije celih ćelija u suspenziji, dok su za detaljniju analizu na nivou pojedinačne ćelije, uglavnom kod odabranih liganada koji su pokazali značajno vezivanje, umesto sortiranja protočnom citometrijom, koja zahteva skupu specijalizovanu opremu, ćelije fotografisane pod fluorescentnim mikroskopom i analizirane odgovarajućim dostupnim programom za denzitometriju, pri čemu su dobijeni rezultati pokazali odličnu korelaciju.

Ovim testom otvorena su vrata novom načinu identifikacije i kvantifikacije vezivanja jedinjenja iz čitavih biblioteka liganada steroidnih receptora, kao što su steroidni derivati. Veliki značaj studije ogleđa se u primeni preciznog i jednostavnog fluorescentnog ćelijskog testa kao skrining „alatke“ u identifikaciji potencijalnih antikancerskih agenasa koji deluju putem modulacije signalnih puteva posredovanih steroidnim receptorima. Ograničenje koje treba uzeti u obzir je nemogućnost da se njegovom upotrebom odgovori na pitanje da li vezano jedinjenje deluje kao agonist ili antagonist, te je neophodna njegova kombinacija sa drugim metodama za procenu aktivnosti. Posebno je značajno naglasiti i da ovaj brz i pouzdan test u kvascu omogućava direktnu proveru biološke aktivnosti velikog broja jedinjenja odmah nakon njihove sinteze, pri čemu bi se sinteza jedinjenja mogla usmeriti na osnovu prepoznavanja farmakofora važnih za ispoljavanje aktivnosti.

Procenjeno je da se androstanski D-homolaktone **5**, **9** i **18** i D-seko estranski derivati **2** i **3** vezuju za ER α , slično kao prirodni ligandi, dok su kao ligandi sa visokim afinitetom za ER β izoformu identifikovani estranski derivati **2**, **3**, **59**, **60** i **73**. Što se liganada visokog afiniteta AR tiče, izdvojena su jedinjenja androstanske serije **72**, **75** i **76**. Ispostavilo se da su neki od identifikovanih liganada (**2**, **3**, **59**, **60**, **73**, **75** i **76**) posedovali strukturne sličnosti u A prstenu sa prirodnim supstratom odgovarajućeg receptora, sugerišući značaj tog dela molekula u vezivanju za LBD. Suprotno, kod nekih jedinjenja sa istom strukturnom karakteristikom nije identifikovano vezivanje, što je razumljivo, jer čak i minimalne razlike u strukturi mogu dovesti do drastičnih razlika u načinu i afinitetu vezivanja. Razlozi za to mogu biti brojni-od prisustva velikih supstituenta u ključnim položajima steroidnog skeleta, koji dovode do sternih smetnji i onemogućavaju smeštanje jedinjenja u „džep“ za vezivanje, zatim razlike u aranžmanu nezasićenih veza koje menjaju planarnost i geometriju molekula, odsustvo farmakofora bitnih za formiranje polarnih kontakata i mnogi drugi. S obzirom na to da se kod dizajniranja novih lekova teži njihovom što specifičnijem načinu delovanja, kod jedinjenja **2**, **3** i **18** se može javiti problem unakrsne aktivnosti prema obe izoforme ER, a kod jedinjenja **9** neselektivno vezivanje za ER α i AR. Sa druge strane, kod razvoja novih inhibitora pojedinih enzima steroidogeneze ili onemogućavanja drugih endokrinih signalnih puteva u terapijske svrhe često je važno isključiti moguću interakciju sa steroidnim receptorima, odnosno neželjena androgena i/ili estrogena svojstva, gde fluorescentni ćelijski biosenzor može omogućiti brzu eliminaciju jedinjenja sa takvim karakteristikama iz daljeg ispitivanja.

Rezultati fluorescentnog ćelijskog testa potvrđeni su simulacijama molekularnog dokinga, dok je poređenjem ovih rezultata i antiproliferativnog efekta odabranih liganada prema ćelijama kancera dojke koje eksprimiraju ER proučavan mehanizam delovanja ovih jedinjenja. Izračunata energija vezivanja D-seko estranskog bromnog derivata **2** i predviđena orijentacija slična kao kod estradiola u vezujućem mestu obe izoforme ER u studijama molekularnog dokinga, kao i izmereni *in vitro* antiproliferativni efekat prema ćelijskoj liniji ER+ kancera dojke (IC₅₀ vrednost 26,22 μ M), u saglasnosti su sa identifikovanim visokim afinitetom vezivanja za ER testom u kvascu. Kombinacijom navedenih metoda dobijen je bolji uvid u mehanizam delovanja ispitivanih jedinjenja, pa su tako rezultati dobijeni za jedinjenje **2** ukazali na to da postoji mogućnost da je mehanizam njegovog antiproliferativnog delovanja posredovan blokiranjem signalnog puta putem ER.

Afinitet vezivanja između fitoestrogena i ER β , pa time i estrogini potencijal ekstrakata virka, crvene deteline i sladića su takođe ispitani optimizovanim fluorescentnim ćelijskim testom u kvascu, što predstavlja još jednu, do sada neistraženu, mogućnost primene ove metode u biohemiji i karakterizaciji biljnih ekstrakata za ispitivanje postojanja fitoestrogena u odabranim biljkama ili ksenoestrogena u okolini. Naime, u ovoj doktorskoj disertaciji ustanovljene su optimalne vrednosti ispitivanih koncentracija standarda fitoestrogena: genisteina, daidzeina, formononetina, biohanina A i gliciteina, pri kojima se detektuje značajno vezivanje, a usled pada intenziteta fluorescencije nakon tretiranja rekombinantnih ćelija pojedinim predstavnicima (biohanin A, glicitein) pretpostavljena je njihova toksičnost u visokim dozama. Svi ispitivani fitoestrogeni su u finalnoj koncentraciji 10 μ M pri fluorimetrijskoj kvantifikaciji pokazali snažno vezivanje za ER β , u rangu sa prirodnim ligandom, estradiolom, što je potvrđeno i detekcijom fluorescencije ćelija pod mikroskopom, koja je obuhvatala čitavu citoplazmu, za razliku od lokalizovane fluorescencije koja se javlja kod kontrolnih ćelija tretiranih rastvaračem (DMSO). Rezultati ispitivanja biljnih ekstrakata su pokazali da je ekstrakcija fitoestrogenih komponenata iz virka bila uspešnija maceracijom u 70% etanolu u odnosu na vodeni ekstrakt, koji je ispoljio afinitet vezivanja za ER β tek pri 100 puta višoj koncentraciji, a za etanolne ekstrakte crvene deteline i sladića detektovan je zavidan estrogini potencijal pri koncentracijama 0,5 mg/ml i 0,1 mg/ml, respektivno, sve zajedno sugerišući značajan farmakološki potencijal biljaka sa ovih prostora, bogatih bioaktivnim molekulima. Istraživanja u čijem su fokusu strukturni analozi estrogenih hormona koji dospevaju u organizam ishranom ili izloženošću se dramatično povećao u poslednjih nekoliko godina. Za naučnu javnost fitoestrogeni i dalje predstavljaju intrigantnu temu i dok se sa jedne strane njihova terapijska ili preventivna upotreba odobrava, sa druge se odbacuje zbog još uvek nepotpuno istražene bezbednosti po reproduktivno zdravlje žena. Razvoj ovde opisane metode za ispitivanje njihove aktivnosti prema ER β predstavlja dobru osnovu za rasvetljavanje efekata koje ispoljavaju.

Inhibitori aromataze danas spadaju među terapijske agense koji najviše obećavaju kada je u pitanju lečenje estrogen-zavisnih kancera, stoga je drugi deo ove doktorske disertacije posvećen razvoju procedura za ispitivanje aktivnosti ovog enzima steroidogeneze i njegovih inhibitora korišćenjem kvasca i/ili bakterije kao model-sistema. Na osnovu poznatih povoljnih redoks karakteristika *Saccharomyces cerevisiae* W(R) soja za ekspresiju CYP450 proteina, enzimski test je prvobitno razvijen u jednokomponentnom sistemu, odnosno upotrebom

kompleksa aromataza-CPR iz jednog izvora-mikrozoma rekombinantnih W(R) ćelija, dizajniranih da pojačano eksprimiraju kvašćevu CPR, transformisanih genom za aromatazu. Međutim, nakon dokazane katalitičke aktivnosti aromataze u ovom sistemu nije bilo moguće uspešno ponoviti proceduru, verovatno usled problema sa ćelijskom respiracijom, koji se spontano pojavljuje u ovom soju kvasca nakon izvesnog vremena. Iz tog razloga, razvijen je nešto kompleksniji, dvokomponentni enzimski test u kome se mikrozomi respiratorno kompetentnih ćelija W(hR) soja, sa genomski integrisanom humanom CPR, kombinuju sa izolovanom rekombinantnom humanom aromatazom eksprimiranom u DH5 α ćelijama *Escherichia coli*. Ovim testom je, od svih ispitivanih modifikovanih steroida, prepoznato dva androstanska jedinjenja kao inhibitora aromataze, D-homo lakton **33** i 17 α -pikolil derivat **63**, sa inhibitorynim potencijalom sličnim poznatom inhibitoru aromataze, formestanu, u ispitivanoj koncentraciji 1000 μ M. Značajno je i to što za ova jedinjenja nije detektovana androgena niti estrogena aktivnost fluorescentnim ćelijskim testom u kvascu, ukazujući na to da, zahvaljujući mogućnosti modulacije aktivnosti aromataze specifičnim načinom delovanja bez aktiviranja ER i AR, ovi steroidni derivati zaslužuju dalja ispitivanja u polju razvoja selektivnih terapeutika za lečenje estrogen-zavisnih kancera dojke i drugih reproduktivnih tkiva žene. Osim poboljšane reproducibilnosti testa za ispitivanje aktivnosti aromataze, u dvokomponentnom sistemu je određen i optimalan odnos koncentracija obe komponente aromataza-CPR kompleksa, neophodan za katalitičku funkciju.

U okviru ove doktorske disertacije proučavana je i mogućnost vezivanja pojedinih steroida za aromatazu i izazivanje konformacionih promena koje se manifestuju promenama u unutrašnjoj fluorescenciji proteina ili promenama spinskog stanja Fe iz hem grupe praćenjem položaja Soretovog maksimuma proteina. Izvođenjem dodatnih biohemijskih eksperimenata koji su uključivali apsorpcionu i fluorescentnu spektroskopiju, kao jedinjenja sa potencijalom da se vežu za aromatazu su okarakterisani steroidni derivati **52**, **55** i **63**. Sumiranjem rezultata dobijenih u okviru drugog specifičnog cilja ove doktorske disertacije, može se zaključiti da postoji odlična saglasnost između ovde razvijenih eksperimentalnih metoda za merenje vezivanja za aromatazu, koji su, zajedno sa testom inhibicije enzimske aktivnosti aromataze od esencijalnog značaja kada je u pitanju otkriće novih inhibitora sa terapeutskim svojstvima u lečenju kancera dojke, globalno rasprostranjene bolesti i vodećeg uzročnika smrti među ženskom populacijom, naročito u postmenopauzi.

Strategijski pristup smanjenju produkcije steroidnih hormona inhibicijom steroidogenih enzima i/ili modulaciji njihovog delovanja preko steroidnih receptora omogućio bi efektivnije lečenje steroid hormon-zavisnih bolesti, najčešće reproduktivnih tkiva. Stoga, kombinacija ovde razvijenih *in vitro* testova za identifikaciju liganada ER α , ER β i AR i inhibitora aromataze, uz dodatne *in silico* studije i ispitivanje uticaja na proliferaciju ćelija steroid hormon-zavisnih kancera, predstavlja preliminarnu fazu ispitivanja koja prethodi daljim *in vitro*, *in vivo*, prekliničkim i kliničkim testovima i od ključne je važnosti za selekciju jedinjenja-kandidata, koja zaslužuju dalju pažnju na dugom putu razvoja leka. Slikovito, značaj metoda razvijenih u ovoj doktorskoj disertaciji može se uporediti sa važnošću jednog komada slagalice za njenu celovitost, odnosno ulozi koju ovde razvijene metode imaju u procesu identifikacije, razotkrivanja kompleksnog mehanizma delovanja i farmakološkog potencijala budućeg leka u polju estrogen- i androgen-zavisnih bolesti, i ne mogu funkcionisati nezavisno od ostalih metoda sa istim ciljem, odnosno od drugih delova slagalice.

7. LITERATURA

- [1] A.C. Herington, L.K. Chopin, P. Jeffery, L. De Amorim, T. Veveris-Lowe, L. Bui, J.A. Clements, Hormone-dependent cancers: new approaches to identification of potential diagnostic and/or therapeutic biomarkers, *Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 18 (2010) 63–66.
- [2] M.O. Palumbo, P. Kavan, W.H. Miller, L. Panasci, S. Assouline, N. Johnson, V. Cohen, F. Patenaude, M. Pollak, R.T. Jagoe, G. Batist, Systemic cancer therapy: Achievements and challenges that lie ahead, *Front. Pharmacol.* 4 (2013) 1–9.
- [3] W.R. Miller, S.P. Langdon, Steroid hormones and cancer: (III) Observations from human subjects, *Eur. J. Surg. Oncol.* 23 (1997) 163–183.
- [4] R. Kumar, B.H. Johnson, E.B. Thompson, Overview of the structural basis for transcription regulation by nuclear hormone receptors, *Essays Biochem.* 40 (2004) 27–39.
- [5] J. Hartman, A. Ström, J.Å. Gustafsson, Estrogen receptor beta in breast cancer-diagnostic and therapeutic implications, *Steroids.* 74 (2009) 635–641.
- [6] R.W. Brueggemeier, J.C. Hackett, E.S. Diaz-Cruz, Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer, *Endocr. Rev.* 26 (2005) 331–345.
- [7] W. Bai, B. Oliveros-Saunders, Q. Wang, M.E. Acevedo-Duncan, S. V Nicosia, Estrogen stimulation of ovarian surface epithelial cell proliferation, *Vitr. Cell Dev Biol Anim.* 36 (2000) 657–666.
- [8] C.A. Heinlein, C. Chang, Androgen receptor in prostate cancer, *Endocr. Rev.* 25 (2004) 276–308.
- [9] L. Gennari, D. Merlotti, R. Nuti, Selective estrogen receptor modulator (SERM) for the treatment of osteoporosis in postmenopausal women: focus on lasofoxifene, *Clin. Interv. Aging.* 5 (2010) 19–29.
- [10] J. V. Pinkerton, S. Thomas, Use of SERMs for treatment in postmenopausal women, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 142 (2014) 142–154.
- [11] E.J. Routledge, J.P. Sumpter, Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen, *Environ. Toxicol. Chem.* 15 (1996) 241–248.
- [12] S. Lin, C.L. Bock, D.B. Gardner, J.C. Webster, M.F. Favata, J.M. Trzaskos, K.R. Oldenburg, A high-throughput fluorescent polarization assay for nuclear receptor binding utilizing crude receptor extract, *Anal. Biochem.* 300 (2002) 15–21.
- [13] C. Féau, L.A. Arnold, A. Kosinski, R.K. Guy, A high-throughput ligand competition binding assay for the androgen receptor and other nuclear receptors, *J. Biomol. Screen.* 14 (2009) 43–48.
- [14] R. Bolger, T.E. Wiese, K. Ervin, S. Nestich, W. Checovich, Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity, *Environ. Health Perspect.* 106 (1998) 551–557.
- [15] S. Chumsri, T. Howes, T. Bao, G. Sabnis, A. Broodie, Aromatase, aromatase inhibitors, and breast cancer, *J. Steroid Biochem Mol Biol.* 125 (2012) 13–22.
- [16] N. Harada, Aberrant expression of aromatase in breast cancer tissues, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 61 (1997) 175–184.
- [17] P.E. Lønning, Pharmacology of new aromatase inhibitors, *The Breast.* (1996) 202–208.
- [18] E.D. Lephart, E.R. Simpson, Assay of aromatase activity, *Methods Enzymol.* 206 (1991) 477–483.
- [19] H. Taniguchi, H.R. Feldmann, M. Kaufmann, W. Pyerin, Fast liquid chromatographic aromatase activity, *Anal. Biochem.* 171 (1989) 167–171.

- [20] D. Zhou, D. Pompon, S. Chen, Stable expression of human aromatase complementary DNA in mammalian cells: a useful system for aromatase inhibitor screening, *Cancer Res.* 50 (1990) 6949–6954.
- [21] D.M. Stresser, S.D. Turner, J. McNamara, P. Stocker, V.P. Miller, C.L. Crespi, C.J. Patten, A high-throughput screen to identify inhibitors of aromatase (CYP19), *Anal. Biochem.* 284 (2000) 427–430.
- [22] X. Li, E. Nokkala, W. Yan, T. Streng, N. Saarinen, A. Wärri, I. Huhtaniemi, R. Santti, S. Mäkelä, M. Poutanen, Altered structure and function of reproductive organs in transgenic male mice overexpressing human aromatase, *Endocrinology.* 142 (2001) 2435–2442.
- [23] A. Gupta, B.S. Kumar, A.S. Negi, Current status on development of steroids as anticancer agents, *J. Steroid Biochemistry Mol. Biol.* 137 (2013) 242–70.
- [24] D. Zips, H.D. Thames, M. Baumann, New anticancer agents: In vitro and in vivo evaluation, *In Vivo (Brooklyn).* 19 (2005) 1–7.
- [25] F. Sherman, Getting Started with Yeast, u: *Methods in Enzymology*, 2002: 3–41.
- [26] D. V Henley, J. Lindzey, K.S. Korach, *Steroid Hormones*, u: *Endocrinology*, Humana Press, 2005: 49–65.
- [27] W. Stillwell, *Bioactive lipids*, u: *An Introduction to Biological Membranes*, Elsevier Science & Technology, 2016.
- [28] N. Ahmad, R. Kumar, Steroid hormone receptors in cancer development: A target for cancer therapeutics, *Cancer Lett.* 300 (2011) 1–9.
- [29] G. Guerriero, Vertebrate sex steroid receptors: Evolution, ligands, and neurodistribution, *Ann N Y Acad Sci.* 1163 (2009) 154–168.
- [30] J.P. Holst, O.P. Soldin, T. Guo, S.J. Soldin, Steroid hormones: relevance and measurement in the clinical laboratory, *Clin Lab Med.* 24 (2004) 105–118.
- [31] A. Kasal, Structure and nomenclature of steroids, u: *Steroid Analysis*, Springer, 2010: 1–25.
- [32] B. Kleine, W.G. Rossmanith, *Hormones: Some Definitions*, u: *Hormones and Endocrine Systems*, Springer International Publishing Switzerland, 2016: 11–17.
- [33] J.T. Sanderson, The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals, *Toxicol. Sci.* 94 (2006) 3–21.
- [34] A.H. Payne, D.B. Hales, Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones, *Endocr. Rev.* 25 (2004) 947–970.
- [35] W.L. Miller, Molecular biology of steroid hormone synthesis, *Endocr. Rev.* 9 (1988) 295–318.
- [36] W.L. Miller, R.J. Auchus, The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders, *Endocr. Rev.* 32 (2011) 81–151.
- [37] P.A. Fail, C.S. Sloan, J.D. Johnson, V.J. Brown, Draft detailed review paper on steroidogenesis screening assays and endocrine disruptors, 2002.
- [38] R.M. Losel, E. Falkenstein, M. Feuring, A. Schultz, H.C. Tillmann, K. Rossol-Haseroth, M. Wehling, Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers, *Physiol. Rev.* 83 (2003) 965–1016.
- [39] L. Björnström, M. Sjöberg, Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes, *Mol. Endocrinol.* 19 (2005) 833–842.
- [40] A.K.L. Herald, R. Alves-Lopes, A.C. Montezano, S.F. Ahmed, R.M. Touyz, Genomic and non-genomic

- effects of androgens in the cardiovascular system: clinical implications, *Clin. Sci.* 131 (2017) 1405–1418.
- [41] F. Mauvais-Jarvis, Estrogen and androgen receptors: Regulators of fuel homeostasis and emerging targets for diabetes and obesity, *Trends Endocrinol. Metab.* 22 (2011) 24–33.
- [42] B.J. Harvey, S. Condliffe, C.M. Doolan, Sex and salt hormones: rapid effects in epithelia, *News Physiol. Sci.* 16 (2001) 174–177.
- [43] A.W. Norman, M. T. Mizwicki, D.P.G. Norman, Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model, *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (2004) 27–41.
- [44] S.R. Hammes, E.R. Levin, Extranuclear steroid receptors: nature and actions, *Endocr. Rev.* 28 (2007) 726–741.
- [45] C.P. Capper, J.M. Rae, R.J. Auchus, The metabolism, analysis, and targeting of steroid hormones in breast and prostate cancer, *Horm. Cancer.* 7 (2016) 149–164.
- [46] E.J. Folkler, M. Dowsett, Influence of sex hormones on cancer progression, *J. Clin. Oncol.* 28 (2010) 4038–4044.
- [47] M. Steinberg, Hormonal therapies in breast and prostate cancers, *Oncologies.* 32 (2007) 14–26.
- [48] J. Russo, I.H. Russo, The role of estrogen in the initiation of breast cancer, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 102 (2006) 89–96.
- [49] W. Yue, J.P. Wang, Y. Li, P. Fan, G. Liu, N. Zhang, M. Conaway, H. Wang, K.S. Korach, W. Bocchinfuso, R. Santen, Effects of estrogen on breast cancer development: role of estrogen receptor independent mechanisms, *Int. J. Cancer.* 127 (2010) 1748–1757.
- [50] J.G. Liehr, Genotoxic effects of estrogens, *Mutat. Res.* 238 (1990) 269–276.
- [51] L. Yaghjian, G.A. Colditz, Estrogens in the breast tissue: a systematic review, *Cancer Causes Control.* 22 (2011) 529–540.
- [52] P.E. Lønning, B.P. Haynes, A.H. Straume, A. Dunbier, H. Helle, S. Knappskog, M. Dowsett, Recent data on intratumor estrogens in breast cancer, *Steroids.* 76 (2011) 786–791.
- [53] R.S. Rittmaster, 5 α -reductase inhibitors in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer risk reduction, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 22 (2008) 389–402.
- [54] S.M. Green, E.A. Mostaghel, P.S. Nelson, Androgen action and metabolism in prostate cancer, *Mol. Cell. Endocrinol.* 360 (2012) 3–13.
- [55] M. Bosland, A. Mahmoud, Hormones and prostate carcinogenesis: androgens and estrogens, *J. Carcinog.* 10 (2011) 33.
- [56] J.E. Michaud, K.L. Billups, A.W. Partin, Testosterone and prostate cancer: an evidence-based review of pathogenesis and oncologic risk, *Ther. Adv. Urol.* 7 (2015) 378–387.
- [57] M. Grossmann, A.S. Cheung, J.D. Zajac, Androgens and prostate cancer; pathogenesis and deprivation therapy, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 27 (2013) 603–616.
- [58] D. Archampong, H. Sweetland, Endocrine therapy in cancer care, *Surgery.* 33 (2015) 122–126.
- [59] A. Jameera Begam, S. Jubie, M.J. Nanjan, Estrogen receptor agonists/antagonists in breast cancer therapy: a critical review, *Bioorg. Chem.* 71 (2017) 257–274.
- [60] M.E. Tan, J. Li, H.E. Xu, K. Melcher, E.L. Yong, Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and

- drug discovery, *Acta Pharmacol. Sin.* 36 (2015) 3–23.
- [61] V.C. Craig Jordan, B.J.A. Furr, An introduction to the regulation of sex steroids for the treatment of cancer, u: *Hormone Therapy in Breast and Prostate Cancer*, Humana Press, 2002: 1–13.
- [62] M.A. Tantawy, M.S. Nafie, G.A. Elmegeed, I.A.I. Ali, Auspicious role of the steroidal heterocyclic derivatives as a platform for anti-cancer drugs, *Bioorg. Chem.* 73 (2017) 128–146.
- [63] M.M. Abdelhalim, E.M. Kamel, S.T. Rabie, N.R. Mohamed, Synthesis and biological evaluation of some nitrogen containing steroidal heterocycles, *Steroids.* 76 (2011) 78–84.
- [64] É. Frank, G. Schneider, Synthesis of sex hormone-derived modified steroids possessing antiproliferative activity, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 137 (2013) 301–315.
- [65] M.M. Abd Elhalim, N.S.M. Ismail, S.M. M Yahya, Y.Y. Omar, A.A. Abd Rabou, D.S. Lasheen, M.F. Zawrah, G.A. Elmegeed, Synthesis, characterization, and evaluation of cytotoxic effects of novel hybrid steroidal heterocycles as PEG based nanoparticles, *Asian Pac J Cancer Prev.* 18 (2017) 1937–1946.
- [66] R. Bansal, S. Guleria, S. Thota, S.L. Bodhankar, M.R. Patwardhan, C. Zimmer, R.W. Hartmann, A.L. Harvey, Design, synthesis and evaluation of novel 16-imidazolyl substituted steroidal derivatives possessing potent diversified pharmacological properties, *Steroids.* 77 (2012) 621–629.
- [67] A.R. Nikolić, E.T. Petri, O.R. Klisurić, A.S. Čelić, D.S. Jakimov, E.A. Djurendić, K.M. Penov Gaši, M.N. Sakač, Synthesis and anticancer cell potential of steroidal 16,17-seco-16,17a-dinitriles: identification of a selective inhibitor of hormone-independent breast cancer cells, *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 703–711.
- [68] G.A. Elmegeed, W.K.B. Khalil, R.M. Mohareb, H.H. Ahmed, M.M. Abd-Elhalim, G.H. Elsayed, Cytotoxicity and gene expression profiles of novel synthesized steroid derivatives as chemotherapeutic anti-breast cancer agents, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 6860–6872.
- [69] L. Yin, Q. Hu, CYP17 inhibitors - Abiraterone, C17,20-lyase inhibitors and multi-targeting agents, *Nat. Rev. Urol.* 11 (2014) 32–42.
- [70] E.A. Djurendić, J.J. Ajduković, M.N. Sakač, J.J. Csanádi, V. V. Kojić, G.M. Bogdanović, K.M. Penov Gaši, Synthesis and cytotoxic activity of some 17-picolyl and 17-picolinylidene androstane derivatives, *Eur. J. Med. Chem.* 54 (2012) 784–792.
- [71] N. Szabo, J.J. Ajdukovic, E.A. Djurendic, M.N. Sakac, I. Ignath, J. Gardi, G. Mahmoud, O.R. Klisuric, S. Jovanović-Šanta, K.M. Penov-Gaši, M. Szecsi, Determination of 17 α -hydroxylase-C17,20-lyase (P45017 α) enzyme activities and their inhibition by selected steroidal picolyl and picolinylidene compounds, *Acta Biol Hung.* 66 (2015) 41–51.
- [72] J.J. Ajduković, E.A. Djurendić, E.T. Petri, O.R. Klisurić, A.S. Čelić, M.N. Sakač, D.S. Jakimov, K.M.P. Gaši, 17(E)-Picolinylidene androstane derivatives as potential inhibitors of prostate cancer cell growth: Antiproliferative activity and molecular docking studies, *Bioorganic Med. Chem.* 21 (2013) 7257–7266.
- [73] C. Bolego, A. Poli, A. Cignarella, R. Paoletti, Phytoestrogens: pharmacological and therapeutic perspectives, *Curr Drug Targets.* 4 (2003) 77–87.
- [74] A.C. Moreira, A.M. Silva, M.S. Santos, V.A. Sardão, Phytoestrogens as alternative hormone replacement therapy in menopause: what is real, what is unknown, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 143 (2014) 61–71.
- [75] M.G. Glazier, M.A. Bowman, A review of the evidence for the use of phytoestrogens as a replacement for traditional estrogen replacement therapy, *Arch. Intern. Med.* 161 (2001) 1161–1172.
- [76] M.N. Chen, C.C. Lin, C.F. Liu, Efficacy of phytoestrogens for menopausal symptoms: a meta-analysis and systematic review, *Climacteric.* 18 (2015) 260–269.

- [77] H.B. Patisaul, W. Jefferson, The pros and cons of phytoestrogens, *Front Neuroendocr.* 31 (2010) 400–419.
- [78] A.B. Cadwallader, C.S. Lim, D.E. Rollins, F. Botrè, The androgen receptor and its use in biological assays: looking toward effect-based testing and its applications, *J. Anal. Toxicol.* 35 (2011) 594–607.
- [79] R. Kumar, I.J. McEwan, Allosteric modulators of steroid hormone receptors: structural dynamics and gene regulation, *Endocr. Rev.* 33 (2012) 271–299.
- [80] S.S. Muddana, B.R. Peterson, Fluorescent cellular sensors of steroid receptor ligands, *ChemBioChem.* 4 (2003) 848–855.
- [81] M.A. Carson-Jurica, W.T. Schrader, B.W. O'Malley, Steroid receptor family: structure and functions, *Endocr. Rev.* 11 (1990) 201–220.
- [82] P. Huang, V. Chandra, F. Rastinejad, Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics, *Annu Rev Physiol.* 72 (2010) 247–272.
- [83] M. Beato, J. Klug, Steroid hormone receptors: an update, *Hum. Reprod. Update.* 6 (2000) 225–236.
- [84] R. Kumar, G. Litwack, Structural and functional relationships of the steroid hormone receptors' N-terminal transactivation domain, *Steroids.* 74 (2009) 877–883.
- [85] R. Kumar, E.B. Thompson, The structure of the nuclear hormone receptors, *Steroids.* 64 (1999) 310–319.
- [86] B.J. Deroo, K.S. Korach, Estrogen receptors and human disease, *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 561–570.
- [87] M. Jia, K. Dahlman-Wright, J.Å. Gustafsson, Estrogen receptor alpha and beta in health and disease, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 29 (2015) 557–568.
- [88] Z. Bai, R. Gust, Breast cancer, estrogen receptor and ligands, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 342 (2009) 133–149.
- [89] P. Ascenzi, A. Bocedi, M. Marino, Structure-function relationship of estrogen receptor α and β : Impact on human health, *Mol. Aspects Med.* 27 (2006) 299–402.
- [90] H.R. Lee, T.H. Kim, K.C. Choi, Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER α and ER β , identified by estrogen receptor knockout mouse, *Lab. Anim. Res.* 28 (2012) 71–76.
- [91] F. Cordera, V.C. Jordan, Steroid receptors and their role in the biology and control of breast cancer growth, *Semin. Oncol.* 33 (2006) 631–641.
- [92] A.C. Tecalco-Cruz, I.A. Pérez-Alvarado, J.O. Ramírez-Jarquín, L. Rocha-Zavaleta, Nucleo-cytoplasmic transport of estrogen receptor alpha in breast cancer cells, *Cell. Signal.* 34 (2017) 121–132.
- [93] M.J. Duffy, Estrogen receptors: role in breast cancer, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 43 (2006) 325–347.
- [94] M. Warner, J.Å. Gustafsson, The role of estrogen receptor β (ER β) in malignant diseases—a new potential target for antiproliferative drugs in prevention and treatment of cancer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396 (2010) 63–66.
- [95] E. Di Zazzo, G. Galasso, P. Giovannelli, M. Di Donato, G. Castoria, Estrogens and their receptors in prostate cancer: therapeutic implications, *Front. Oncol.* 8 (2018) 1–7.
- [96] F. Caiazza, E.J. Ryan, G. Doherty, D.C. Winter, K. Sheahan, Estrogen receptors and their implications in colorectal carcinogenesis, *Front. Oncol.* 5 (2015) 1–9.
- [97] R.A. Davey, M. Groszmann, Androgen receptor structure, function and biology: from bench to bedside, *Clin Biochem Rev.* 37 (2016) 3–15.

- [98] R. Narayanan, C.C. Coss, J.T. Dalton, Development of selective androgen receptor modulators (SARMs), *Mol. Cell. Endocrinol.* 465 (2018) 134–142.
- [99] S.M. Dehm, D.J. Tindall, Androgen receptor structural and functional elements: role and regulation in prostate cancer, *Mol. Endocrinol.* 21 (2007) 2855–2863.
- [100] E.A. Mostaghel, S.R. Plymate, B. Montgomery, Molecular pathways: targeting resistance in the androgen receptor for therapeutic benefit, *Clin. Cancer Res.* 20 (2014) 791–798.
- [101] C. Dai, H. Heemers, N. Sharifi, Androgen signaling in prostate cancer, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 7 (2017) 1–19.
- [102] E. Giorgetti, A.P. Lieberman, Polyglutamine androgen receptor-mediated neuromuscular disease, *Cell. Mol. Life Sci.* 73 (2016) 3991–3999.
- [103] V. Beck, A. Pfitscher, A. Jungbauer, GFP-reporter for a high throughput assay to monitor estrogenic compounds, *J. Biochem. Biophys. Methods.* 64 (2005) 19–37.
- [104] T.F.H. Bovee, R.J.R. Helsdingen, A.R.M. Hamers, M.B.M. Van Duursen, M.W.F. Nielen, R.L.A.P. Hoogenboom, A new highly specific and robust yeast androgen bioassay for the detection of agonists and antagonists, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 1549–1558.
- [105] J.L. Raucy, J.M. Lasker, Current in vitro high throughput screening approaches to assess nuclear receptor activation, *Curr. Drug Metab.* 11 (2010) 806–814.
- [106] F. Köhler, A. Zimmermann, M. Hager, A.E. Sippel, A genetic, non-transcriptional assay for nuclear receptor ligand binding in yeast, *Gene.* 337 (2004) 113–119.
- [107] C. Zhang, S.K. Nordeen, D.J. Shapiro, Fluorescence anisotropy microplate assay to investigate the interaction of full-length steroid receptor coactivator-1a with steroid receptors, *Methods Mol Biol.* 977 (2013) 339–351.
- [108] Protocol for in vitro estrogen receptor (ER) binding assay using the CER1 human recombinant ER α ligand binding domain protein., 2014.
- [109] L.M.J.W. Swinkels, H.A. Ross, T.J. Benraad, Scintillation proximity assay: determination of steroid hormones without separation of antibody-bound and free ligand, *Ann. Clin. Biochem.* 28 (1991) 87–90.
- [110] A. Griekspoor, W. Zwart, J. Neeffjes, R. Michalides, Visualizing the action of steroid hormone receptors in living cells, *Nucl. Recept. Signal.* 5 (2007) 1–9.
- [111] R.B. Sekar, A. Periasamy, Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations, *J. Cell Biol.* 160 (2003) 629–633.
- [112] P. Branduardi, B. Dujon, H. Feldman, C. Gaillardin, D. Porro, *Yeast*, Wiley-VCH Verlag & Co, 2010.
- [113] J.C. Mell, S.M. Burgess, *Yeast as a model genetic organism*, in: *Encyclopedia of Life Sciences*, Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group, 2002: 1–8.
- [114] L. Jacob, J.P. Vert, Protein-ligand interaction prediction: an improved chemogenomics approach, *Bioinformatics.* 24 (2008) 2149–2156.
- [115] D.B. Roche, L.J. MCGuffin, In silico identification and characterization of protein-ligand binding sites, *Methods Mol Biol.* 1414 (2016) 1–21.
- [116] N. Ai, M.D. Krasowski, W.J. Welsh, S. Ekins, Understanding nuclear receptors using computational methods, *Drug Discov Today.* 14 (2009) 486–494.

- [117] L.G. Ferreira, R.N. Dos Santos, G. Oliva, A.D. Andricopulo, *Molecular docking and structure-based drug design strategies*, 2015.
- [118] X.Y. Meng, H.X. Zhang, M. Mezei, M. Cui, *Molecular Docking: a powerful approach for structure-based drug discovery*, *Curr. Comput. Aided. Drug Des.* 7 (2011) 146–157.
- [119] S. Forli, R. Huey, M.E. Pique, M. Sanner, D.S. Goodsell, A.J. Olson, *Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite*, *Nat Protoc.* 11 (2016) 905–919.
- [120] P.T. Lang, T. Aynechi, D. Moustakas, B. Shoichet, I.D. Kuntz, N. Brooijmans, C.M. Oshiro, *Molecular docking and structure-based design*, u: *Drug Discovery Research*, John Wiley & Sons, 2007: 3–24.
- [121] D.B. Kitchen, H. Decornez, J.R. Furr, J. Bajorath, *Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications*, *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (2004) 935–949.
- [122] V. Zoete, A. Grosdidier, O. Michielin, *Docking, virtual high throughput screening and in silico fragment-based drug design*, *J. Cell. Mol. Med.* 13 (2009) 238–248.
- [123] S. Ekins, J. Mestres, B. Testa, *In silico pharmacology for drug discovery: applications to targets and beyond*, *Br. J. Pharmacol.* 152 (2007) 21–37.
- [124] J. De Ruyck, G. Brysbaert, R. Blossey, M.F. Lensink, *Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel*, *Adv. Appl. Bioinforma. Chem.* 9 (2016) 1–11.
- [125] H.J. Chan, K. Petrossian, S. Chen, *Structural and functional characterization of aromatase, estrogen receptor, and their genes in endocrine-responsive and -resistant breast cancer cells*, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 161 (2016) 73–83.
- [126] S.E. Bulun, Z. Lin, G. Imir, S. Amin, M. Demura, B. Yilmaz, R. Martin, H. Utsunommya, S. Thung, B. Gurates, M. Tamura, D. Langoi, S. Deb, *Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment*, *Pharmacol. Rev.* 57 (2005) 359–383.
- [127] D. Ghosh, J. Griswold, M. Erman, W. Pangborn, *Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase*, *Nature.* 457 (2009) 219–223.
- [128] E.R. Simpson, C. Clyne, G. Rubin, W.C. Boon, K. Robertson, K. Britt, C. Speed, M. Jones, *Aromatase-a brief overview*, *Annu. Rev. Physiol.* 64 (2002) 93–127.
- [129] J.F. Russell, J.C. Wong, M.M. Grumbach, *Aromatase deficiency and aromatase excess*, u: *Genetic Steroid Disorders*, Academic Press, 2014: 165–190.
- [130] J. Lo, G. Di Nardo, J. Griswold, C. Egbuta, W. Jiang, G. Gilardi, D. Ghosh, *Structural basis for the functional roles of critical residues in human cytochrome P450 aromatase*, *Biochemistry.* 52 (2013) 5821–5829.
- [131] M.P. Thomas, B.V.L. Potter, *The structural biology of oestrogen metabolism*, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 137 (2013) 27–49.
- [132] Y. Hong, H. Li, Y.C. Yuan, S. Chen, *Molecular characterization of aromatase*, *Ann N Y Acad Sci.* 1155 (2009) 112–120.
- [133] E.R. Simpson, M. Dowsett, *Aromatase and its inhibitors: significance for breast cancer therapy*, *Recent Prog. Horm. Res.* 57 (2002) 317–338.
- [134] R. Baravalle, F. Valetti, G. Catucci, G. Gambarotta, M. Chiesa, S. Maurelli, E. Giamello, I. Barone, S. Catalano, S. Andò, G. Di Nardo, G. Gilardi, *Effect of sildenafil on human aromatase activity: from in vitro structural analysis to catalysis and inhibition in cells*, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 165 (2017) 438–447.

- [135] M.M. Grumbach, R.J. Auchus, Estrogen: consequences and implications of human mutations in synthesis and action, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84 (1999) 4677–4694.
- [136] A. Larionov, *Resistance to aromatase inhibitors in breast cancer*, Springer, 2015.
- [137] F.K. Yoshimoto, F.P. Guengerich, Mechanism of the third oxidative step in the conversion of androgens to estrogens by cytochrome P450 19A1 steroid aromatase, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 15016–15025.
- [138] A. Conley, M. Hinshelwood, Mammalian aromatases, *Reproduction.* 121 (2001) 685–695.
- [139] K. Sethumadhavan, F.L. Bellino, Human placental estrogen synthetase (aromatase). Effect of environment on the kinetics of protein-protein and substrate-protein interactions and the production of 19-oxygenated androgen intermediates in the purified reconstituted cytochrome P450 enzyme system, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 39 (1991) 381–394.
- [140] S.L. Gantt, I.G. Denisov, Y.V. Grinkova, S.G. Sligar, The critical iron-oxygen intermediate in human aromatase, *Biochem Biophys Res Commun.* 387 (2009) 169–173.
- [141] R.W. Brueggemeier, Aromatase inhibitors-mechanisms of steroidal inhibitors, *Breast Cancer Res. Treat.* 30 (1994) 31–42.
- [142] C.J. Fabian, The what, why and how of aromatase inhibitors: hormonal agents for treatment and prevention of breast cancer, *Int. J. Clin. Pract.* 61 (2007) 2051–2063.
- [143] J. Narashimamurthy, A.R. Rao, G.N. Sastry, Aromatase inhibitors: a new paradigm in breast cancer treatment, *Curr. Med. Chem. Agents.* 4 (2004) 523–534.
- [144] G. Séralini, S. Moslemi, Aromatase inhibitors: past, present and future, *Mol. Cell. Endocrinol.* 178 (2001) 117–131.
- [145] I.E. Smith, M. Dowsett, Aromatase inhibitors in breast cancer: an overview, *N Engl J Med.* 348 (2003) 2431–2442.
- [146] P. Lombardi, Exemestane, a new steroidal aromatase inhibitor of clinical relevance, *Biochim Biophys Acta.* 1587 (2002) 326–337.
- [147] E. Di Salle, G. Ornati, D. Giudici, M. Lassus, T.R.J. Evans, R.C. Coombes, Exemestane (FCE 24304), a new steroidal aromatase inhibitor, *J Steroid Biochem Mol Biol.* 43 (1992) 137–143.
- [148] L.W.L. Woo, A. Purohit, B.V.L. Potter, Development of steroid sulfatase inhibitors, *Mol. Cell. Endocrinol.* 340 (2011) 175–185.
- [149] H. Tinwell, J.B. Rascole, S. Colombel, I. Al Khansa, A. Freyberger, R. Bars, A novel method for measuring aromatase activity in tissue samples by determining estradiol concentrations, *J. Appl. Toxicol.* 31 (2011) 446–454.
- [150] K. Matsui, S. Nishii, M. Oka, P450 aromatase inhibition assay using a competitive ELISA, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38 (2005) 307–312.
- [151] K.A. Salminen, J. Leppa, J.I. Vena, M. Pasanen, S. Auriola, R.O. Juvonen, H. Raunio, Simple, direct, and informative method for the assessment of CYP2C19 enzyme inactivation kinetics, *Drug Metab Dispos.* 39 (2011) 412–418.
- [152] E.R. Trösken, K. Fischer, W. Völkel, W.K. Lutz, Inhibition of human CYP19 by azoles used as antifungal agents and aromatase inhibitors, using a new LC-MS/MS method for the analysis of estradiol product formation, *Toxicology.* 219 (2006) 33–40.
- [153] G.E. Timm, Final detailed review paper on aromatase, 2005.

- [154] X. Li, E. Nokkala, W. Yan, T. Streng, N. Saarinen, A. Wärrri, I. Huhtaniemi, R. Santti, S. Mäkelä, M. Poutanen, Altered structure and function of reproductive organs in transgenic male mice overexpressing human aromatase, *Endocrinology*. 142 (2001) 2435–2442.
- [155] R.W. Brueggemeier, Integrated summary report on aromatase, 2007.
- [156] J. Lodge, P. Lund, S. Minchin, Gene cloning principles and applications, Taylor & Francis Group, 2007.
- [157] T.A. Brown, Gene cloning and DNA analysis, 6th ed., John Wiley & Sons, 2010.
- [158] N. Kagawa, H. Hori, M.R. Waterman, S. Yoshioka, Characterization of stable human aromatase expressed in *E. coli*, *Steroids*. 69 (2004) 235–243.
- [159] G. Di Nardo, M. Breitner, S.J. Sadeghi, S. Castrignanò, G. Mei, A. Di Venere, E. Nicolai, P. Allegra, G. Gilardi, Dynamics and flexibility of human aromatase probed by FTIR and time resolved fluorescence spectroscopy, *PLoS One*. 8 (2013) 1–10.
- [160] J.P. Renaud, M.A. Peyronneau, P. Urban, G. Truan, C. Cullin, D. Pompon, P. Beaune, D. Mansuy, Recombinant yeast in drug metabolism, *Toxicology*. 82 (1993) 39–52.
- [161] Y. Yabusaki, Expression of mammalian cytochromes P450 in yeast, *Methods Mol Biol*. 107 (1998) 195–202.
- [162] G. Truan, C. Cullin, P. Reisdorf, P. Urban, D. Pompon, Enhanced in vivo monooxygenase activities of mammalian P450s in engineered yeast cells producing high levels of NADPH-P450 reductase and human cytochrome b5, *Gene*. 125 (1993) 49–55.
- [163] P. Urban, G. Truan, J.C. Gautier, D. Pompon, Xenobiotic metabolism in humanized yeast: engineered yeast cells producing human NADPH-cytochrome P-450 reductase, cytochrome b5, epoxide hydrolase and P-450s, *Biochem Soc Trans*. 21 (1993) 1028–1034.
- [164] I.F. Sevriukova, T.L. Poulos, Current approaches for investigating and predicting cytochrome P450 3A4-ligand interactions, *Adv. Exp. Med. Biol*. 851 (2015) 83–105.
- [165] E.M. Isin, F.P. Guengerich, Substrate binding to cytochromes P450, *Anal Bioanal Chem*. 392 (2008) 1019–1030.
- [166] K.P. Conner, A.A. Cruce, M.D. Krzyaniak, A.M. Schimpf, D.J. Frank, P.O. de Montellano, W.M. Atkins, M.K. Bowman, Drug modulation of water–heme interactions in low-spin P450 complexes of CYP2C9d and CYP125A1, *Biochemistry*. 54 (2017) 1198–1207.
- [167] A.G. Roberts, A.P. Campbell, W.M. Atkins, The thermodynamic landscape of testosterone binding to cytochrome P450 3A4: Ligand binding and spin state equilibria, *Biochemistry*. 44 (2005) 1353–1366.
- [168] M.M. Lockart, C.A. Rodriguez, W.M. Atkins, M.K. Bowman, CW EPR parameters reveal cytochrome P450 ligand binding modes, *J. Inorg. Biochem*. 183 (2018) 157–164.
- [169] S. Maurelli, M. Chiesa, E. Giamello, G. Di Nardo, V.E. Valentina, G. Gilardi, S. Van Doorslaer, Direct spectroscopic evidence for binding of anastrozole to the iron heme of human aromatase. Peering into the mechanism of aromatase inhibition, *Chem. Commun*. 47 (2011) 10737–10739.
- [170] P.J. Mak, A. Luthra, S.G. Sligar, J.R. Kincaid, Resonance Raman spectroscopy of the oxygenated intermediates of human CYP19A1 implicates a compound i intermediate in the final lyase step, *J. Am. Chem. Soc*. 136 (2014) 4825–4828.
- [171] V.E.V. Ferrero, G. Di Nardo, G. Catucci, S.J. Sadeghi, G. Gilardi, Fluorescence detection of ligand binding to labeled cytochrome P450 BM3, *Dalt. Trans*. 41 (2012) 2018–2025.

- [172] G. Di Nardo, M. Breitner, A. Bandino, D. Ghosh, G.K. Jennings, J.C. Hackett, G. Gilardi, Evidence for an elevated aspartate pKa in the active site of human aromatase, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 1186–1196.
- [173] C.W. Locuson, J.M. Hutzler, T.S. Tracy, Visible spectra of type II cytochrome P450-drug complexes: evidence that “incomplete” heme coordination is common, *Drug Metab. Dispos.* 35 (2007) 614–622.
- [174] D. Neha, W. Neha, Y. Pryanka, Protein folding using fluorescence spectroscopy, *Imp. J. Interdiscip. Res.* 3 (2017) 785–788.
- [175] S.M.D. Akbar, K. Sreeramulu, H.C. Sharma, Tryptophan fluorescence quenching as a binding assay to monitor protein conformation changes in the membrane of intact mitochondria, *J. Bioenerg. Biomembr.* 48 (2016) 241–247.
- [176] A.B.T. Ghisaidoobe, S.J. Chung, Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 22518–22538.
- [177] E. Matveeva, C. Morisseau, M. Goodrow, C. Mullin, B. Hammock, Tryptophan fluorescence quenching by enzyme inhibitors as a tool for enzyme active site structure investigation: epoxide hydrolase, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10 (2009) 589–599.
- [178] A.S. Ladokhin, Fluorescence spectroscopy in peptide and protein analysis, in: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, 2000: 5762–5779.
- [179] H.F. Crouse, J. Potoma, F. Nejrabi, D.L. Snyder, B.S. Chohan, S. Basu, Quenching of tryptophan fluorescence in various proteins by a series of small nickel complexes, *Dalt. Trans.* 41 (2012) 2720–2731.
- [180] S.S. Bekić, M.A. Marinović, E.T. Petri, M.N. Sakač, A.R. Nikolić, V. V. Kojić, A.S. Čelić, Identification of D-seco modified steroid derivatives with affinity for estrogen receptor α and β isoforms using a non-transcriptional fluorescent cell assay in yeast, *Steroids.* 130 (2018) 22–30.
- [181] H. Lodish, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 4th ed., W. H. Freeman, 2000.
- [182] S.S. Jovanović-Šanta, V.M. Pejanović, J.A. Petrović, A novel route to 3-hydroxy-16,17-seco-estrone derivatives, *J. Serb. Chem. Soc.* 64 (1999) 391–394.
- [183] S. Jovanović-Šanta, J. Petrović, S. Andrić, R. Kovačević, E. Djurendić, M. Sakač, D. Lazar, S. Stanković, Synthesis, structure, and screening of estrogenic and antiestrogenic activity of new 3,17-substituted-16,17-seco-estratriene derivatives, *Bioorg. Chem.* 31 (2003) 475–484.
- [184] M.N. Sakač, D.A. Miljković, K.M. Penov Gaši, M. Popsavin, O.R. Klisurić, S.M. Stanković, S. Andrić, R. Kovačević, Synthesis, X-ray crystal structure and antiestrogenic activity of 17-methyl-16,17-secoestra-1,3,5(10)-triene derivatives, *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* 70 (2005) 63–71.
- [185] I. Kuzminac, O.R. Klisurić, D. Škorić, D. Jakimov, M. Sakač, Structural analysis and antitumor potential of novel 5,6-disubstituted-17 α -homo-17-oxa-androstane derivatives, *Struct Chem.* 28 (2017) 567–576.
- [186] I.Z. Kuzminac, O.R. Klisurić, A.R. Nikolić, M.N. Sakač, Investigation of reaction conditions on synthesis of steroidal bromohydrin and structural analysis of novel 6 α -brom-5 β -hydroxy derivative, *Facta Univ. Physics, Chem. Technol.* 16 (2018) 219–228.
- [187] I. Kuzminac, *Sinteza i antitumorski potencijal C19-derivatizovanih steroidnih D-homo laktona*, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, 2018.
- [188] E.A. Djurendić, M.P. Savić, O.R. Klisurić, M.N. Sakač, G.M. Bogdanović, D.S. Jakimov, K.M. Penov Gaši, Synthesis, X-ray structural analysis, and cytotoxic activity of some new androstane D-homo lactone derivatives, *Struct Chem.* 23 (2012) 1761–1767.

- [189] M.P. Savić, E.A. Djurendić, E.T. Petri, A. Ćelić, O.R. Klisurić, M.N. Sakač, D.S. Jakimov, V. V. Kojić, K.M. Penov Gaši, Synthesis, structural analysis and antiproliferative activity of some novel D-homo lactone androstane derivatives, *RSC Adv.* 3 (2013) 10385–10395.
- [190] E.A. Djurendić, M.N. Sakač, M.P. Zaviš, R. Gaković, Andrea, J.J. Čanadi, S.A. Andrić, O.R. Klisurić, V. V. Kojić, G.M. Bogdanović, K.M. Penov Gaši, Synthesis and biological evaluation of some new A,B-ring modified steroidal D-lactones, *Steroids.* 73 (2008) 681–688.
- [191] M.P. Savić, J.J. Ajduković, J. Plavša, S. Bekić, A.S. Ćelić, O.R. Klisurić, D.S. Jakimov, E.T. Petri, E.A. Djurendić, A-ring fused pyridine D-modified androstane derivatives with selective antiproliferative and AKR1C3 inhibitory activities, *Med Chem Comm.* 9 (2018) 969–981.
- [192] A. Oklješa, *Sinteza i biološka aktivnost novih steroidnih heterocikličnih jedinjenja*, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, 2015.
- [193] V. Raičević, *Sinteza i fizičko-hemijska karakterizacija A-supstituisanih ferocenilmetil estra-1,3,5(10)-trienskih derivata*, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, 2017.
- [194] J.J. Ajduković, K.M. Penov Gaši, D.S. Jakimov, O.R. Klisurić, S.S. Jovanović-Šanta, M.N. Sakač, L.D. Aleksić, E.A. Djurendić, Synthesis, structural analysis and antitumor activity of novel 17 α -picolyl and 17(E)-picolinylidene A-modified androstane derivatives, *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 1557–1568.
- [195] A.R. Nikolić, I.Z. Kuzminac, S.S. Jovanović-Šanta, D.S. Jakimov, L.D. Aleksić, M.N. Sakač, Anticancer activity of novel steroidal 6-substituted 4-en-3-one D-seco dinitriles, *Steroids.* 135 (2018) 101–107.
- [196] M. Rahimzadeh, M. Sadeghzadeh, F. Najafi, S. Arab, H. Mobasheri, Impact of heat shock step on bacterial transformation efficiency, *Mol. Biol. Res. Commun.* 5 (2016) 257–261.
- [197] C. Howe, *Gene cloning and manipulation*, 2nd ed., Cambridge University Press, 2007.
- [198] A.Y. Chang, V.W. Chau, J.A. Landas, Y. Pang, Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation, *JEMI Methods.* 1 (2017) 22–25.
- [199] Bacterial Transformation, (pristupljeno: 01.02.2019). <https://www.addgene.org/protocols/bacterial-transformation/>.
- [200] A. Froger, J.E. Hall, Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method, *J. Vis. Exp.* 6 (2007) 253.
- [201] H.C. Birnboim, J. Doly, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res.* 7 (1979) 1513–1523.
- [202] *Miniprep handbook for purification of molecular biology grade DNA Sample*, 4th ed., QIAprep®, 2015.
- [203] M. Carter, J. Shieh, *Guide to research techniques in neuroscience*, 2nd ed., Elsevier, 2015.
- [204] T. Vincze, J. Posfai, R.J. Roberts, NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 3688–3691.
- [205] R. Baravalle, G. Di Nardo, A. Bandino, I. Barone, S. Catalano, S. Andò, G. Gilardi, Impact of R264C and R264H polymorphisms in human aromatase function, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 167 (2017) 23–32.
- [206] Restriction Enzyme Buffer Reference, (pristupljeno: 06.02.2019). <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/restriction-enzyme-buffer-reference.html>.
- [207] NCBI, (pristupljeno: 22.02.2019). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001347256.1?from=123&to=1634.

- [208] R.D. Gietz, R.A. Woods, Review genetic transformation of yeast, *Biotechniques*. 30 (2001) 816–831.
- [209] S. Kawai, W. Hashimoto, K. Murata, Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi, *Bioeng. Bugs*. 1 (2010) 395–403.
- [210] J.D. Tripp, J.L. Lilley, W.N. Wood, L.K. Lewis, Enhancement of plasmid DNA transformation efficiencies in early stationary-phase yeast cell cultures, *Yeast*. 30 (2013) 191–200.
- [211] D. Gietz, A. St Jean, R.A. Woods, R.H. Schiestl, Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells, *Nucleic Acid Res.* 20 (1992) 1425.
- [212] P. Prochasson, High efficiency transformation of yeast, 2015.
- [213] B.R.D. Gietz, R.A. Woods, Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method, *Methods Enzymol.* 350 (2002) 87–96.
- [214] R.K. Mann, M. Grunstein, Histone H3 N-terminal mutations allow hyperactivation of the yeast GAL1 gene in vivo, *EMBO J.* 11 (1992) 3297–3306.
- [215] R.Y. Tsien, The green fluorescent protein, *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998) 509–544.
- [216] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.Y. Tinevez, D.J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona, Fiji: an open source platform for biological image analysis, *Nat. Methods*. 9 (2012) 676–682.
- [217] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay, *J. Immunol. Methods*. 65 (1983) 55–63.
- [218] W. Strober, Trypan blue exclusion test of cell viability, *Curr. Protoc. Immunol.* 111 (2015) A3.B.1–A3.B.3.
- [219] RCSB Protein Data Bank (PDB), (pristupljeno: 22.02.2019). <http://www.rcsb.org/>.
- [220] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne, The protein data bank, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 235–242.
- [221] D.M. Tanenbaum, Y. Wang, S.P. Williams, P.B. Sigler, Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95 (1998) 5998–6003.
- [222] S. Möcklinghoff, R. Rose, M. Carraz, A. Visser, C. Ottmann, L. Brunsveld, Synthesis and crystal structure of a phosphorylated estrogen receptor ligand binding domain, *ChemBioChem*. 11 (2010) 2251–2254.
- [223] A. Pedretti, L. Villa, G. Vistoli, Atom-type description language: a universal language to recognize atom types implemented in the VEGA program, *Theor. Chem. Acc.* 109 (2003) 229–232.
- [224] Avogadro: an open-source molecular builder and visualization tool. Version 1.1.1., (pristupljeno: 22.02.2019). <https://avogadro.cc/>.
- [225] M.D. Hanwell, D.E. Curtis, D.C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek, G.R. Hutchison, Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualisation, and analysis platform, *J. Chem. Informatics*. 4 (2012) 1–17.
- [226] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility, *J. Comput. Chem.* 30 (2009) 2785–2791.
- [227] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC., (pristupljeno: 22.02.2019). <https://www.pymol.org>.

- [228] J. Ren, N. Williams, L. Clementi, S. Krishnan, W.W. Li, Opal web services for biomedical applications, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) 724–731.
- [229] NBCR-National Biomedical Computation Resource, (pristupljeno: 22.02.2019). <http://nbcrc-222.ucsd.edu/opal2/services>.
- [230] L.K. Wolf, New software and websites for the chemical enterprise, *Chem. Eng. News.* 87 (2009) 48.
- [231] D. Pompon, B. Louerat, A. Bronine, P. Urban, Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments, u: *Methods in Enzymology*, Academic Press, 1996: 51–64.
- [232] J.B. Schenkman, D.L. Cinti, Preparation of microsomes with calcium, *Methods Enzymol.* 52 (1978) 83–89.
- [233] F.P. Guengerich, M.V. Martin, C.D. Sohl, Q. Cheng, Measurement of cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450 reductase, *Nat. Protoc.* 4 (2009) 1245–1251.
- [234] Instructions 71-5027-68 AF HisTrap affinity columns, GE Healthc. (2006) 1–20.
- [235] D.M. Bollag, M.D. Rozycki, S.J. Edelstein, *Protein methods*, 2nd ed., Wiley-Liss, 1996.
- [236] Quick start Bradford protein assay, Instruction Manual, BIO-RAD
- [237] M.A. Peyronneau, J.P. Renaud, G. Truan, P. Urban, D. Pompon, D. Mansuy, Optimization of yeast-expressed human liver cytochrome P450 3A4 catalytic activities by reductase and cytochrome b5, *Eur. J. Biochem.* 207 (1992) 109–116.
- [238] S.A. Bhawani, O. Sulaiman, R. Hashim, M.N. Mohamad Ibrahim, Thin-layer chromatographic analysis of steroids: a review, *Trop. J. Pharm. Res.* 9 (2010) 301–313.
- [239] E. Heftmann, *Chromatography of steroids*, Elsevier Scientific Publishing Company, 1976.
- [240] M. Olech, Ł. Komsta, R. Nowak, Ł. Ciesla, M. Waksmundzka-Hajnos, Investigation of antiradical activity of plant material by thin-layer chromatography with image processing, *Food Chem.* 132 (2012) 549–553.
- [241] V.M. Shkumatov, N.S. Frolova, E.V. Rudaya, Y.V. Faletrov, S. Mauersberger, G. Barth, Range of substrates and steroid bioconversion reactions performed by recombinant microorganisms *Saccharomyces cerevisiae* and *Yarrowia lipolytica* expressing cytochrome P450c17, *Appl. Biochem. Microbiol.* 42 (2006) 472–478.
- [242] C.D. Sohl, F.P. Guengerich, Kinetic analysis of the three-step steroid aromatase reaction of human cytochrome P450 19A1, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 17734–17743.
- [243] pET-17b vector map, (pristupljeno: 10.04.2019). [https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pet_and_duet_vectors_\(novagen\)&plasmid=pET-17b](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pet_and_duet_vectors_(novagen)&plasmid=pET-17b).
- [244] N. Kagawa, Efficient expression of human aromatase (CYP19) in *E. coli*, u: *Methods in Molecular Biology*, Springer Humana Press, 2011: 109–122.
- [245] T. Oyama, N. Kagawa, K. Sugio, H. Uramoto, O. Hatano, N. Harada, K. Kaneko, T. Kawamoto, K. Yasumoto, Expression of aromatase CYP19 and its relationship with parameters in NSCLC, *Front Biosci.* 14 (2009) 2285–2292.
- [246] pRS425 vector map, (pristupljeno: 10.04.2019). https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=yeast_plasmids&plasmid=pRS425.
- [247] M. Krnjajić, Funkcionalna karakterizacija novih steroidnih inhibitora aromataze (CYP19A1) upotrebom neradioaktivnih metoda i molekularnog modelovanja, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, 2013.

- [248] T. Schmidt, K. Friehs, M. Schleef, C. Voss, E. Flaschel, Quantitative analysis of plasmid forms by agarose and capillary gel electrophoresis, *Anal. Biochem.* 274 (1999) 235–240.
- [249] J.A. Petrović, V.M. Pejanović, D.A. Miljković, J.T. Hranisavljević, Synthesis and estrogen activity screening of some new D-secoestrone derivatives, *Steroids.* 55 (1990) 276–278.
- [250] Estrogen receptor and androgen receptor binding and transcriptional activation assays, u: ICCVAM, NIH Publication, 2003.
- [251] E. Barnard, N. V. McFerran, A. Trudgett, J. Nelson, D.J. Timson, Development and implementation of split-GFP-based bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays in yeast, *Biochem. Soc. Trans.* 36 (2008) 479–482.
- [252] D.L. Stenoien, A.C. Nye, M.G. Mancini, K. Patel, M. Dutertre, B.W. O'Malley, C.L. Smith, A.S. Belmont, M.A. Mancini, Ligand-mediated assembly and real-time cellular dynamics of estrogen receptor alpha-coactivator complexes in living cells, *Mol. Cell. Biol.* 21 (2001) 4404–4412.
- [253] S. Tai, Y. Sun, J.M. Squires, W.K. Oh, H. Zhang, C.Z. Liang, J. Huang, PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma, *Prostate.* 71 (2011) 1668–1679.
- [254] S. Cosconati, S. Forli, A.L. Perryman, R. Harris, S. David, A.J. Olson, Virtual screening with AutoDock: theory and practice, *Expert Opin. Discov.* 5 (2010) 597–607.
- [255] L.P. Wolters, F.M. Bickelhaupt, Halogen bonding versus hydrogen bonding: a molecular orbital perspective, *ChemistryOpen.* 1 (2012) 96–105.
- [256] E.S. Manas, R.J. Unwalla, Z.B. Xu, M.S. Malamas, C.P. Miller, H.A. Harris, C. Hsiao, T. Akopian, W.T. Hum, K. Malakian, S. Wolfrom, A. Bapat, R.A. Bhat, M.L. Stahl, W.S. Somers, J.C. Alvarez, Structure-based design of estrogen receptor-beta selective ligands, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 15106–15119.
- [257] T. Stanković, J. Dinić, A. Podolski-Renić, L. Musso, S.S. Burić, S. Dallavalle, M. Pešić, Dual inhibitors as a new challenge for cancer multidrug resistance treatment, *Curr Med Chem.* 26 (2019) 6074–6106.
- [258] M.E. Baker, R. Lathe, The promiscuous estrogen receptor: evolution of physiological estrogens and response to phytochemicals and endocrine disruptors, *J Steroid Biochem Mol Biol.* 184 (2018) 29–37.
- [259] J.A. Kohn, K. Deshpande, E.A. Ortlund, Deciphering modern glucocorticoid cross-pharmacology using ancestral corticosteroid receptors, *J Biol Chem.* 287 (2012) 16267–16275.
- [260] K.P. De Jésus-Tran, P.L. Côté, L. Cantin, J. Blanchet, F. Labrie, R. Breton, Comparison of crystal structures of human androgen receptor ligand-binding domain complexed with various agonists reveals molecular determinants responsible for binding affinity, *Protein Sci.* 15 (2006) 987–999.
- [261] A.C.W. Pike, A.M. Brzozowski, R.E. Hubbard, A structural biologist's view of the oestrogen receptor, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 74. 74 (2000) 261–268.
- [262] A.M. Brzozowski, A.C.W. Pike, Z. Dauter, R.E. Hubbard, T. Bonn, O. Engström, L. Ohman, G.L. Greene, J.A. Gustafsson, M. Carlquist, Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor, *Nature.* 389 (1997) 753–758.
- [263] P.M. Matias, P. Donner, R. Coelho, M. Thomaz, C. Peixoto, S. Macedo, N. Otto, S. Joschko, P. Scholz, A. Wegg, S. Basler, M. Schafer, U. Egner, M.A. Carrondo, Structural evidence for ligand specificity in the binding domain of the human androgen receptor, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 26164–26171.
- [264] W.N. Jefferson, E. Padilla-Banks, G. Clark, R.R. Newbold, Assessing estrogenic activity of phytochemicals using transcriptional activation and immature mouse uterotrophic responses, *J. Chromatogr. B.* 777 (2002) 179–189.

- [265] M. Bistan, M. Podgorelec, R. Marinšek Logar, T. Tišler, Yeast estrogen screen assay as a tool for detecting estrogenic activity in water bodies, *Food Technol. Biotechnol.* 50 (2012) 427–433.
- [266] H. Kohno, K. Kouda, R. Tokunaga, Y. Sonoda, Detection of estrogenic activity in herbal teas by in vitro reporter assays, *Eur Food Res Technol.* 225 (2007) 913–920.
- [267] B.M. Collins, J.A. McLachlan, S.F. Arnold, The estrogenic and antiestrogenic activities of phytochemicals with the human estrogen receptor expressed in yeast, *Steroids.* (1997) 365–372.
- [268] P. De Boever, W. Demaré, E. Vanderperren, K. Cooreman, P. Bossier, W. Verstraete, Optimization of a yeast estrogen screen and its applicability to study the release of estrogenic isoflavones from a soygerm powder, 109 (2001) 691–697.
- [269] M. Suetsugi, L. Su, K. Karlsberg, Y.C. Yuan, S. Chen, Flavone and isoflavone phytoestrogens are agonists of estrogen-related receptors, *Mol. Cancer Res.* 1 (2003) 981–991.
- [270] T. Matsumoto, M. Kobayashi, T. Moriwaki, S. Kawai, S. Watabe, Survey of estrogenic activity in fish feed by yeast estrogen-screen assay, *Comp. Biochem. Physiol.* 139 (2004) 147–152.
- [271] S. Schmidt, S. Rainieri, S. Witte, U. Matern, S. Martens, Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* glucosidase that hydrolyzes flavonoid glucosides, *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (2011) 1751–1757.
- [272] S. Vlaisavljević, B. Kaurinović, M. Popović, S. Vasiljević, Profile of phenolic compounds in *Trifolium pratense* L. extracts at different growth stages and their biological activities, *Int. J. Food Prop.* 20 (2017) 3090–3101.
- [273] S. Vlaisavljević, F. Šibul, I. Sinka, I. Zupko, I. Ocsovszki, S. Jovanović-Šanta, Chemical composition, antioxidant and anticancer activity of licorice from Fruska Gora locality, *Ind. Crop. Prod. J.* 112 (2018) 217–224.
- [274] C. Cullin, D. Pompon, Synthesis of functional mouse cytochromes P-450 P1 and chimeric P-450 P3-1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Gene.* 65 (1988) 203–217.
- [275] R. Soni, J.P. Carmichael, J.A.H. Murray, Parameters affecting lithium acetate-mediated transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and development of a rapid and simplified procedure, *Curr. Genet.* 24 (1993) 455–459.
- [276] J. Hill, K.A.I. Donald, D.E. Griffiths, DMSO-enhanced whole cell yeast transformation, *Nucleic Acids Res.* 19 (1991) 5791.
- [277] S. Ugolini, C. V Bruschi, The red/white colony color assay in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: epistatic growth advantage of white *ade8-18, ade2* cells over red *ade2* cells, *Curr Genet.* 30 (1996) 485–492.
- [278] G. Kim, H. Sikder, K.K. Singh, A colony color method identifies the vulnerability of mitochondria to oxidative damage, *Mutagenesis.* 17 (2002) 375–381.
- [279] K.S. Dimmer, S. Fritz, F. Fuchs, M. Messerschmitt, N. Weinbach, W. Neupert, B. Westermann, Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Biol. Cell.* 13 (2002) 847–853.
- [280] I. Stansfield, S.L. Kelly, Purification and quantification of *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome P450, u: *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, 1996: 355–366.
- [281] O. Kappeli, M. Sauer, A. Fiechter, Convenient procedure for the isolation of highly enriched, cytochrome microsomal fraction from *Candida tropicalis*, *Anal. Biochem.* 126 (1982) 179–182.
- [282] J.J. Stegeman, L. Behrendt, B.R. Woodin, A. Kubota, B. Lemaire, D. Pompon, J.V. Goldstone, P. Urban, Functional characterization of zebra fish cytochrome P450 1 family proteins expressed in yeast, *Biochim.*

- Biophys. Acta. 1850 (2015) 2340–2352.
- [283] M. Kuzu, M. Ciftci, Purification and characterization of NADPH-cytochrome P450 reductase from Lake Van fish liver microsomes and investigation of some chemical and metals' effects on the enzyme activity, *Turkish J. Chem.* 39 (2015) 149–158.
- [284] E. Arinç, H. Lelik, Biochemical characteristics of purified beef liver NADPH-cytochrome P450 reductase, *J Biochem Mol. Toxicol.* 16 (2002) 286–297.
- [285] R. Rider, H.R. Bosshard, Comparison of the binding sites on cytochrome c for cytochrome c oxidase, cytochrome bc1, and cytochrome c1, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 4732–4739.
- [286] S.K. Yim, S.J. Yun, C.H. Yun, A continuous spectrophotometric assay for NADPH-cytochrome P450 reductase activity using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, *Biochem. Mol. Biol.* 37 (2004) 629–633.
- [287] S.L. Freeman, A. Martel, J.M. Devos, J. Basran, E.L. Raven, G.C.K. Roberts, Solution structure of the cytochrome P450 reductase-cytochrome c complex determined by neutron scattering, *J.Biol.Chem.* 293 (2018) 5210–5219.
- [288] S. Cornelissen, M.K. Julsing, A. Schmid, B. Bühler, Comparison of microbial hosts and expression systems for mammalian CYP1A1 catalysis, *J Ind Microbiol Biotechnol.* 39 (2012) 275–287.
- [289] S. Zelasko, A. Palaria, A. Das, Optimizations to achieve high-level expression of cytochrome P450 proteins using *Escherichia coli* expression systems, *Protein Expr. Purif.* 92 (2013) 77–87.
- [290] M.R. Watermann, M. Hildebrand, Assessment of the use of single cytochrome P450 enzymes in drug research, Springer, 1994.
- [291] J. Samuleson, Bacterial systems, u: Production of Membrane Proteins: Strategies for Expression and Isolation, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 2011.
- [292] Y. Honda, K. Nanasawa, H. Fujii, Coexpression of 5-aminolevulinic acid synthase gene facilitates heterologous production of thermostable cytochrome P450, CYP119, in holo form in *Escherichia coli*, *ChemBioChem.* 19 (2018) 2156–2159.
- [293] C. Egbuta, J. Lo, D. Ghosh, Mechanism of inhibition of estrogen biosynthesis by azole fungicides, *Endocrinology.* 155 (2014) 4622–4628.
- [294] J.A. Van Meeuwen, S. Nijmeijer, T. Mutarapat, S. Ruchirawat, P.C. De Jong, A.H. Piersma, M. Van Den Beng, Aromatase inhibition by synthetic lactones and flavonoids in human placental microsomes and breast fibroblasts-a comparative study, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 228 (2008) 269–276.
- [295] T. Dintinger, J.L. Gaillard, S. Moslemi, I. Zwain, P. Silberzahn, Androgen and 19-norandrogen aromatization by equine and human placental microsomes, *J. Steroid Biochem.* 33 (1989) 949–954.
- [296] K.M. Penov Gaši, M.D. Djurendić Brenesel, E. Djurendić, M.N. Sakač, J.J. Čanadi, J.J. Daljev, T. Armbruster, S. Andrić, D.M. Sladić, T.T. Bozic, I.T. Novaković, Z.D. Juranić, Synthesis and biological evaluation of some 17-picolyl and 17-picolinylidene androst-5-ene derivatives, *Steroids.* 72 (2007) 31–40.
- [297] M.C. Byrns, Y. Jin, T.M. Penning, Inhibitors of type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3): overview and structural insights, *J Steroid Biochem Mol Biol.* 125 (2011) 95–104.
- [298] G. Rocchitta, A. Spanu, S. Babudieri, G. Latte, G. Madeddu, G. Galleri, S. Nuvoli, P. Bagella, M.I. Demartis, V. Fiore, R. Manetti, P.A. Serra, Enzyme biosensors for biomedical applications: strategies for safeguarding analytical performances in biological fluids, *Sensors.* 16 (2016) 1–21.
- [299] C.H. Yun, G.P. Miller, F.P. Guengerich, Rate-determining steps in phenacetin oxidations by human cytochrome P450 1A2 and selected mutants, *Biochemistry.* 39 (2000) 11319–11329.

- [300] S. Chen, S. Masri, Y. Hong, X. Wang, S. Phung, Y.C. Yuan, X. Wu, New experimental models for aromatase inhibitor resistance, *J Steroid Biochem Mol Biol.* 106 (2007) 8–15.
- [301] pRF4-6 vector map, (pristupljeno: 10.04.2019). <http://proteome.wayne.edu/vectorsandstrains.html>.
- [302] pCW vector map, (pristupljeno: 10.04.2019). <https://www.addgene.org/69554/>.

Biografija



Sofija Bekić je rođena 09.09.1990. godine u Novom Sadu. U istom gradu završava Osnovnu školu „Miloš Crnjanski“, kao đak generacije, i Gimnaziju „Jovan Jovanović Zmaj“, kao nosilac diplome „Vuk Stefanović Karadžić“. Odmah nakon srednjoškolskog obrazovanja, 2009. godine upisuje osnovne akademske studije biohemije na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu, koje završava u predviđenom roku 2013. godine, sa prosečnom ocenom 9,85. Naredne godine završava master akademske studije biohemije sa prosečnom ocenom 10,00. Nakon sticanja zvanja master biohemičar, oktobra 2014. godine upisuje doktorske akademske studije biohemije na istom fakultetu i polaže sve ispite predviđene planom i programom sa prosečnom ocenom 10,00.

Više puta tokom osnovnih studija Univerzitet u Novom Sadu je nagrađuje za postignut uspeh u toku prethodnih godina studija, a 2014. godine dobija i specijalno priznanje Srpskog hemijskog društva za izuzetan uspeh. Sofija je bila stipendista Fonda za mlade talente Republike Srbije „Dositeja“ za najbolje studente završnih godina osnovnih i master akademskih studija, kao i Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije za studente doktorskih studija. U zvanje istraživača-pripravnika za užu naučnu oblast Biohemija izabrana je 2015., a u zvanje istraživača-saradnika 2018. godine. Od aprila 2018. godine zaposlena je na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije 172021 pod nazivom „Sinteza, karakterizacija i biološka ispitivanja steroidnih derivata i njihovih molekulskih agregata“. Tokom doktorskih studija angažovana je na izvođenju praktične nastave na predmetima Biohemija, Biohemija hormona i Biohemija steroida-viši kurs na Katedri za biohemiju i hemiju prirodnih proizvoda, Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu.

Sofija je obogatila svoje eksperimentalne veštine iz oblasti biohemije tokom tronedeljnog volonterskog rada u Laboratoriji za mikotoksine Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu. Tokom dosadašnje naučne karijere učestvovala je kao saradnik na 4 međunarodna projekta i tom prilikom boravila i radila na Fakultetu za hemiju i hemijsku tehnologiju u Ljubljani u Sloveniji,

Institutu za organsku hemiju u Pragu, u Češkoj i na Institutu za bioorgansku hemiju Nacionalne akademije nauka Belorusije u Minsku, u Belorusiji. Pored toga, stručno se usavršavala na letnjoj školi „Advances in drug discovery“, u Pragu i na naprednom kursu organizovanom od strane Federacije evropskih biohemijskih društava (FEBS) "Ligand-binding theory and practice" u Novim Hradima i za pohađanje oba kursa je bila nagrađena stipendijom. Pohađala je i niz seminara u Srbiji iz oblasti dizajna lekova, strukturne biologije, recenziranja naučnih radova i TRAIN kurs za usavršavanje akademskog osoblja. Osim toga, doprinela je i popularizaciji nauke učešćem na manifestacijama „Hemijski vikend“ i „Festival nauke“.

Autor i koautor je 2 rada u međunarodnim časopisima kategorija M22 i M23, 13 saopštenja sa međunarodnih naučnih skupova, kao i 7 saopštenja sa skupova od nacionalnog značaja. Član je Srpskog hemijskog društva, Biohemijskog društva Srbije i Srpskog društva za molekularnu biologiju.

Novi Sad, 22.01.2020.

Sofija Bekić

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Autor: AU	Sofija Bekić
Mentori: MN	Dr Suzana Jovanović-Šanta, vanredni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu Dr Anđelka Ćelić, vanredni profesor Prirodno- matematičkog fakulteta u Novom Sadu
Naslov rada: NR	Razvoj bioloških testova za identifikaciju liganada steroidnih receptora i ispitivanje aktivnosti steroidogenog enzima aromataze
Jezik publikacije: JP	Srpski, latinica
Jezik izvoda: JI	Srpski/Engleski
Zemlja publikovanja:	Republika Srbija

ZP	
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2020.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3
Fizički opis rada: FO	Broj poglavlja: 7/ Stranica: 186/ Slika i grafika: 73/ Tabela: 20/ Referenci: 302
Naučna oblast: NO	Hemija
Naučna disciplina: ND	Biohemija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Steroidni receptori, ER α , ER β , AR, modifikovani steroidi, hormonski zavisni kanceri, fitoestrogeni, biomedicinski potencijal, fluorescentni test, ligand, afinitet vezivanja, aromataza, inhibitori aromataze, steroidogeneza
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Prirodno-matematički fakultet, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad
Važna napomena: VN	
Izvod:	U ovoj doktorskoj disertaciji razvijen je fluorescentni test u kvascu za identifikaciju

IZ	<p>potencijalnih prirodnih ili sintetičkih liganada ERα, ERβ ili AR i kvantifikaciju njihovog afiniteta vezivanja sa mogućnošću testiranja čitavih biblioteka modifikovanih steroida i ksenoestrogena. Takođe, opisana je primena optimizovanog biosenzora za procenu estrogenog potencijala sintetskih steroida i odabranih biljnih ekstrakata bogatih jedinjenjima fitoestrogenih osobina. U cilju potpunijeg sagledavanja mehanizma delovanja odabranih modifikovanih steroida ispitana je njihova antiproliferativna aktivnost prema ćelijskim linijama estrogen receptor pozitivnog kancera dojke (MCF-7) i kancera prostate (PC-3), dok su <i>in silico</i> metodom molekularnog dokinga predviđene energije i geometrije vezivanja ovih jedinjenja za ligand-vezujuće domene ERα i ERβ. Drugi deo ovog rada obuhvata razvoj testa za ispitivanje aktivnosti humanog enzima aromataze, heterologno eksprimiranog u ćelijama kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> i/ili bakterija <i>Escherichia coli</i>, u prisustvu ili odsustvu inhibitora. Interakcije modifikovanih steroida, odabranih na osnovu strukture, sa aromatazom ispitane su osetljivim spektroskopskim metodama, praćenjem promene spinskog stanja Fe iz hem grupe ili promene fluorescencije ostatka triptofana iz aktivnog centra usled konformacione promene proteina, izazvane interakcijom sa ligandom. Razvijeni <i>in vitro</i> testovi bez upotrebe radioaktivnih izotopa su, osim visoke efikasnosti i bezbednosti po korisnika i okolinu, pokazali specifičnost i ekonomičnost u preliminarnom skriningu liganada steroidnih receptora i inhibitora aromataze. Jedinjenja kod kojih je detektovana značajna biološka aktivnost mogu potencijalno poslužiti kao osnova za razvoj terapeutika u lečenju hormon-zavisnih bolesti i stanja, koja danas predstavljaju globalni zdravstveni problem.</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	05.10.2017.

Datum odbrane: DO	2020.
Članovi komisije: KO	Dr Edward Petri, vanredni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, predsednik Dr Andrea Nikolić, docent Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, član Dr Suzana Jovanović-Šanta, vanredni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, mentor Dr Anđelka Ćelić, vanredni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, mentor Dr Radivoje Prodanović, redovni profesor Hemijskog fakulteta u Beogradu, član

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES
KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Printed text
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Sofija Bekić
Mentors: MN	Dr Suzana Jovanović-Šanta, Associate Professor Dr Anđelka Ćelić, Associate Professor
Title: TI	Development of biological assays for identification of steroid receptor ligands and determination of activity of steroidogenic enzyme aromatase
Language of text: LT	Serbian, latin
Language of abstract: LA	Serbian/English
Country of publication: CP	Republic of Serbia

Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2020.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Trg Dositaja Obradovića 3
Physical description: PD	Chapters: 7/ Pages: 186/ Figures and graphs: 73/ Tables: 20/ References: 302
Scientific field: SF	Chemistry
Scientific discipline: SD	Biochemistry
Subject, Key words: S/KW	Steroid receptors, ER α , ER β , AR, modified steroids, hormone-dependent cancers, phytoestrogens, biomedical potential, fluorescent assay, ligand, binding affinity, aromatase, aromatase inhibitors, steroidogenesis
UC	
Holding data: HD	Library of the Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, Faculty of Sciences, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad
Note: N	
Abstract: AB	In this doctoral dissertation, a fluorescent assay in yeast was developed for identification of potential natural or synthetic ligands of ER α , ER β or AR and quantification of their binding affinity, as well as

	<p>evaluation of the estrogenic potential of synthetic steroids and selected plant extracts rich in phytoestrogen content. The assay could be used to screen libraries of modified steroids and xenoestrogens. In order to better understand the biomedical potential of selected modified steroids, results were compared to antiproliferative activity against estrogen receptor positive breast cancer (MCF-7) and prostate cancer (PC-3) cell lines. Binding energies and the geometry of binding of these compounds for ERα and ERβ ligand binding domains were predicted <i>in silico</i> by molecular docking methods. The second part of this study includes development of an assay for study of aromatase activity in the presence or absence of inhibitors by heterologous expression of human aromatase in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and/or <i>Escherichia coli</i> cells, as model-organisms. Furthermore, interactions between modified steroids, selected according to their structure, and aromatase were tested using sensitive spectroscopic methods based on ligand-induced changes in the spin state of Fe from the heme group or changes in the fluorescence of a tryptophan residue in the active site. The non-radioactive <i>in vitro</i> assays developed here, besides high efficiency, user and environmental safety, also have greater specificity and are more cost-effective for preliminary screening of steroid receptor ligands and aromatase inhibitors. Additionally, compounds identified to express significant biological activity can serve as a basis for the development of potential therapeutics in the treatment of hormone-dependent diseases and conditions, a global health issue today.</p>
Accepted on Senate on: AS	05.10.2017.
Defended: DE	2020.

Thesis Defend Board: DB	Dr Edward Petri, Associate Professor, Faculty of Sciences, Novi Sad, president Dr Andrea Nikolić, Assistant Professor, Faculty of Sciences, Novi Sad, member Dr Suzana Jovanović-Šanta, Associate Professor, Faculty of Sciences, Novi Sad, mentor Dr Anđelka Ćelić, Associate Professor, Faculty of Sciences, Novi Sad, mentor Dr Radivoje Prodanović, Full Professor, Faculty of Chemistry, Belgrade, member
--------------------------------	--