

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Katarina Petrović-Bulatović

**RAZVOJ VISOKO AUTOMATIZOVANIH
MIKROTITARSKIH TESTOVA NA
SACCHAROMYCES CEREVISIAE ZA
DETEKCIJU JEDINJENJA SA
ANTIFUNGALNIM I CITOSTATSKIM
DEJSTVOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Katarina Petrović-Bulatović

**DEVELOPMENT OF
TWO HIGH-THROUGHPUT
SCREENING METHODS TO IDENTIFY
MOLECULES WITH ANTIFUNGAL AND
CYTOSTATIC ACTIVITY USING
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

MENTOR I ČLANOVI KOMISIJE:

Mentor:

Dr Branka Vuković-Gačić, redovni profesor,
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

Dr Jelena Knežević-Vukčević,
redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Dejan Krnjaić, redovni profesor,
Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane _____ 2018. godine

ZAHVALNICE / ACKNOWLEDGEMENTS

Ova teza je napisana na Katedri za mikrobiologiju, Instituta za Botaniku, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Duboku zahvalnost dugujem profesorki dr Branki Vuković-Gačić, mom mentoru, na izuzetnoj stručnoj pomoći koju mi je pružila u formiranju finalne verzije ove teze. Iznad svega joj se zahvaljujem na velikom razumevanju i osećaju prijateljske podrške koji je učinio pripremu rada lakšim.

Izuzetnu zahvalnost dugujem profesorki dr Jeleni Knežević-Vukčević na vremenu i pažnji koju je posvetila čitanju ove teze. Njene stručne sugestije i komentari i kao i prilike da prodiskutujemo pojedine delove rada su bile od velike pomoći. Posebno sam joj zahvalna na podršci koju sam osećala tokom realizacije ovog rada.

Profesoru dr. Dejanu Krnjaiću sa Katedre za Mikrobiologiju i Imunologiju, Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu i članu komisije se zahvaljujem na pažljivom čitanju teze i izuzetno korisnim sugestijama kao i dragocenim godinama saradnje i strpljivosti kojom je delio svoje veliko znanje.

Posebnu zahvalnost dugujem:

Mojoj Sanji, na velikoj kolegijalnoj i prijateljskoj pomoći, na njenoj neverovatnoj životnoj snazi koja inspiriše.

Neli, na divnoj pozitivnoj energiji koja podstiče i vuče napred.

Ivanu, zato što je moj najbolji drug sve ove godine, kao i za svu tehničku i moralnu podršku koju imam još od pripreme diplomskog rada.

Nati i Sebu, na kumovskoj i svoj drugoj podršci koju imam i na koju uvek mogu da računam.

Mojim roditeljima i roditeljima moje majke, mojoj sestri na bezgraničnoj ljubavi i brizi koju sam uvek osećala. U ovom radu vas ima koliko i mene.

Mom Branislavu, na beskonačnom razumevanju, strpljenju i podršci bez koje ne bih mogla.

Mojoj miloj Olgi, na njenom osmehu bez kojeg sve ovo ne bi imalo smisla. Ti si moj najveći uspeh!

ACKNOWLEDGEMENTS

The work presented here has been carried out in the Developmental & Molecular Pathways group, Novartis Institute for Medical Research (NIBR), in Basel, Switzerland.

My deep gratitude goes to Dr. Stephen Helliwell for all attention he gave to my experimental work. Being in his lab was a great experience, I had freedom to work independently but he was always there with precious advices. Above all, I would like to thank him for all the thoughtfulness and great support in realization of this theses and publication.

I would like to express my gratitude to Dr. Rao Movva for the oportunity to work in Developmental & Molecular Pathways group, for his enthusiasm, passion for science and above all for attention he gave to his team. My appreciation also extends to Dr. Dominic Hoepfner, Dr. Ireos Filipuzzi, Celine Fioretto, Britta Knapp and all dear colleagues from DMP group; working with them was a wonderful experience!

I would also like to thank to Dr. Gunther Scheel and all colleagues from Novartis Screening facility for great collaboration. Especially to Dr. Christian Parker for precious discussions and advices related to development of high-throughput screening assays and Martin Pfeifer from whom I learned all I needed and wanted to know about automatization.

Za Olgu

Rezime

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* je široko upotrebljavan model za istraživanje potencijala malih molekula u modulaciji signalnih puteva relevantnih za nastanak i razvoj bolesti u eukariotskim organizmima. U ovoj tezi je opisan razvoj dva visoko automatizovana testa zasnovana na praćenju ćelijske vijabilnosti kroz merenje fluorescentnog signala redukcijom alamarBlue® (resazurina) ili direktnim merenjem optičke gustine. Obe metode su pogodne za pretragu velikog broja uzoraka, u mikrotitarskim pločama sa 348 i 1536 bunarčića upotrebom diploidnog *pdr5/pdr5* soja *S.cerevisiae* kome nedostaje glavni transmembranski transporter Pdr5p, koji doprinosi multirezistenciji na lekove. Oba testa su pokazala visok kvalitet sa Z' vrednosti $> 0,5$. Korišćenjem alamarBlue® testa ispitano je 1.101.408 jedinjenja male molekulske težine, od kojih je 25.144 inhibiralo rast kvasca. Određivanjem IC_{50} vrednosti, od 1930 odabranih jedinjenja iz primarnog testiranja, inhibitorni potencijal je potvrđen u 868 (45%) u oba ili bar jednom testu. Rezultat dobijeni haplodeficijentnim profilisanjem genoma kvasca su pokazali njihovu visoku raznovrsnost delovanja, 572 odbrana aktivna jedinjenja je uticalo na rast $>25\%$ ukupnog broja ispitivanih sojeva kvasca. Molekuli sa inhibitornom aktivnošću detektovanom na ovakav način predstavljaju impresivnu bazu za dalje istraživanje mehanizama putem kojih suprimiraju proliferaciju i/ili vijabilnost ćelija kvasaca, drugih patogenih gljiva, ali i sisarskih ćelija.

Ključne reči: ultra visoko automatizovani testovi, *Saccharomyces cerevisiae*, alamarBlue®, optička gustina

Naučna oblast: Biologija

Uza naučna oblast: Mikrobiologija

UDK broj: 57.083.1:582.282.23(043.3)

Abstract

The budding yeast *S. cerevisiae* is widely used model organism to elucidate the mechanism of action of low molecular weight compounds in modulation of signaling pathways involved in different diseases in eukaryotic organisms. This thesis describes the development of two high throughput screening methods based on cell viability either by monitoring the reduction of alamarBlue® (resazurin) or by direct optical measurement of cell growth. Both methods can be miniaturized to allow screening of large numbers of samples, in 384 and 1536-well format using the diploid *pdr5/pdr5* strain of *S.cerevisiae* lacking the major transmembrane multi-drug resistance pump Pdr5p. Both tests show high quality with Z' value > 0.5 . With the alamarBlue® approach, 1,101,408 low molecular weight compounds were screened, identifying 25,144 primary hits. Dose response curves (IC_{50}) generated for a subset of 1930 active compounds using both alamarBlue® and optical density methods confirmed inhibitory potential for 868 of them either by both or one method. In genome-wide haploinsufficiency profiling (HIP), 572 of selected hits demonstrated a diverse mechanism of action, affecting $>25\%$ of all yeast strains. These hits represent an impressive basis for further evaluation of mechanisms of action for suppression of yeast's, pathogenic fungi and mammalian cells proliferation and viability.

Keywords: High-Throughput screening, *Saccharomyces cerevisiae*, alamarBlue®, optical density

Research area: Biology

Area of special interest: Microbiology

UDC number: 57.083.1:582.282.23(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Kolekcije hemijskih jedinjenja i „mali molekuli“	1
1.2. Visoko automatizovani testovi	3
1.3. Biološki eseji	6
1.3.1. Merenje citotoksičnosti	7
1.3.2. Neinvazivni testovi za merenje ćelijske vijabilnosti	10
1.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
1.4.1. Faze rasta <i>S. cerevisiae</i>	13
1.4.2. <i>S. cerevisiae</i> kao model organizam	14
1.5. Metoda haplodeficijentnog profilisanja.....	15
1.6. Antifungalni lekovi.....	19
1.7. Citostatici.....	19
1.8. Upotreba kvasca u visoko automatizovanim uslovima	21
2. CILJ RADA.....	23
3. MATERIJAL I METODE.....	24
3.1. Materijal	24
3.1.1. Sojevi kvasca	24
3.1.2. Hranljive podloge i rastvori.....	25
3.1.3. Rastvori za izvođenje lančane reakcije polimeraze i hibridizacije.....	27
3.1.4. Mikrotitarske ploče.....	31
3.1.5. Instrumenti.....	32
3.2. Metode.....	34
3.2.1. Priprema jedinjenja za testiranje.....	34
3.2.2. Gajenje diploidnih wt i mutantnih sojeva <i>S. cerevisiae</i>	35
3.2.3. Određivanje absorpcionog i transmisivnog spektra hranljivih medijuma.....	35
3.2.4. Merenje optičke gustine suspenzije kvasca	35
3.2.5. Standardizacija alamarBlue® eseja u pločama sa 384 bunarčića.....	36
3.2.5.1. Uticaj pH vrednosti i dužine inkubacije alamarBlue® na jačinu fluorescentnog signala.....	36
3.2.5.2. Testiranje „samoredukujućeg efekta“ alamarBlue®	36
3.2.5.3. Određivanje optimalne gustine početne kulture	37
3.2.5.4. Uticaj pufera na razvoj fluorescentnog signala	37
3.2.6. Optimizacija alamarBlue® eseja u mikrotitarskim pločama sa 1536 bunarčića.....	38
3.2.6.1. Uticaj koncentracije alamarBlue® i pH vrednosti na jačinu fluorescentnog signala.....	38
3.2.6.2. Uticaj gustine početne kulture na razvoj fluorescentnog signala	38
3.2.6.3. Uticaj DMSO na rast wt i mutantnih sojeva kvasca.....	39
3.2.6.4. Uticaj volumena ćelijske kulture i koncentracije DMSO na kvalitet eseja	39
3.2.6.5. Uticaj koncentracije DMSO na osetljivost na cikloheksamid.....	39
3.2.6.6. Protokol za izvođenje alamarBlue® eseja u (ultra) visoko automatizovanim uslovima ploča sa 1536 bunarčića	40
3.2.7. Merenje ćelijskog rasta u kulturi	41

3.2.7.1. Određivanje osetljivosti EnVision 2100 multičitača u visoko automatizovanim uslovima	41
3.2.7.2. Efekat volumena i gustine početne kulture kvasca na njegov rast u pločama sa 96 i 384 bunarčića.....	41
3.2.8. Optimizacija eseja u pločama sa 1536 bunarčića	41
3.2.8.1. Efekat volumena kulture na kvalitet eseja	41
3.2.8.2. Merenje homogenosti maksimalnih i minimalnih vrednosti	42
3.2.8.3. Merenje uticaja fizičkih faktora na rast kulture kvasca	42
3.2.8.4. Izračunavanje inhibitorynog efekta 50% (IC ₅₀) cikloheksamida i rapamicina ..	42
3.2.8.5. Uticaj DMSO na rast kvasca	43
3.2.8.6. Protokol za merenje inhibitorne koncentracije IC ₅₀ u ultra visoko automatizovanim uslovima.....	43
3.2.9. Statističko određivanje kvaliteta eseja.....	44
3.2.9.1. Određivanje odnosa između maksimalnog i minimalnog signala	44
3.2.9.2. Izračunavanje Z' vrednosti	45
3.2.10. Obrada podataka	46
3.2.10.1. Normalizacija rezultata u primarnom i validacionom testu.....	46
3.2.10.2. Kriterijum za određivanje aktivnih jedinjenja u primarnom testu.....	46
3.2.11. Analiza rezultata u validacionom eksperimentu	47
3.2.12. Esej haplodeficijentnog profilisanja	48
3.2.12.1. Priprema početnog stoka kvasca za haplodeficijentno profilisanje.....	48
3.2.12.2. Kompetitivno uzgajanje kulture kvasca	49
3.2.12.3. Ekstrakcija genomske DNK	50
3.2.12.4. Umnožavanje jedinstvenih barkodova (TAG) lančanom reakcijom polimeraze	50
3.2.12.5. GeneFlex Tag16K v2 mikročip hibridizacija	51
3.2.12.6. Anliza mikročip (TAG16K v2) rezultata	53
4. REZULTATI	55
4.1. Razvoj fluorescentnog (AlamarBlue®) eseja	56
4.1.1. Standardizacija eseja u mikrotitarskim pločama sa 384 bunarčića	56
4.1.1.1. Uticaj pH vrednosti i dužine inkubacije AlamarBlue® na jačinu fluorescentnog signala.....	57
4.1.1.2. Efekat koncentracije AlamarBlue® u različitim medijumima	58
4.1.1.3. Uticaj gustine početne kulture na jačinu fluorescentnog signala	59
4.1.1.4. Efekat pufera na razvoj fluorescentnog signala.....	60
4.1.2. Standardizacija uslova u mikrotitarskim pločama sa 1536 bunarčića.....	60
4.1.2.1. Efekat koncentracije AlamarBlue® boje i pH vrednosti	61
4.1.2.2. Uticaj početne gustine na kvalitet eseja.....	62
4.1.2.3. Uticaj koncentracije DMSO na rast kulture kvasca.....	63
4.1.2.4. Uticaj smanjenog volumena ćelijske kulture na kvalitet eseja.....	63
4.1.2.5. Uticaj DMSO na osetljivost na cikloheksamid	64
4.1.2.6. Reproducibilnost rezultata	65
4.2. Razvoj eseja zasnovanog na merenju optičke gustine.....	66
4.2.1. Uticaj medijuma na apsorpciju u transmisiju	66
4.2.2. Osetljivost mernog instrumenta u visoko automatizovanim uslovima.....	68
4.2.3. Standardizacija eseja u mikrotitarskim pločama sa 96 i 384 bunarčića	69
4.2.3.1. Rast kvasca u mikrotitarskim pločama sa 96 bunarčića	69
4.2.3.2. Rast kvasca u mikrotitarskim pločama od 384 bunarčića	70

4.2.4. Razvoj eseja za merenje optičke gustine ćelijske kulture u mikrotitarskim pločama sa 1536 bunarčića	72
4.2.4.1. Uticaj volumena kulture na preciznost mernog instrumenta	72
4.2.4.2. Odnos maksimalnog i minimalnog signala i Z' vrednosti.....	73
4.2.4.3. Uticaj fizičkih faktora na homogenost rezultata.....	74
4.2.4.4. Uticaj fizičkih faktora na rast kulture kvasca	75
4.2.4.5. Određivanje IC ₅₀ rapamicina i cikloheksamida.....	76
4.2.4.6. Uticaj DMSO na rast kulture kvasca	78
4.3. Primarno testiranje inhibitorne aktivnosti Novartisove kolekcije jedinjenja.....	79
4.3.1. Selekcija aktivnih jedinjenja iz primarnog testa korišćenjem Bemis i Murko kriterijuma	81
4.4. Validacioni eksperiment	83
4.5. Raznovrsnost delovanja odabranih jedinjenja potvrđenih HIP metodom.....	84
4.5.1. Mehanizam delovanja bioaktivnih jedinjenja.....	85
4.5.2. Profil NGx04 jedinjenja.....	89
5. DISKUSIJA.....	91
5.1. Esej zasnovan na merenju fluorescentnog signala	92
5.2. Esej zasnovan na merenju optičke gustine	95
5.3. Primarno i validaciono testiranje.....	97
5.4. Haplodeficijentno profilisanje	100
6. ZAKLJUČCI	102
7. LITERATURA	104
PRILOG 1.....	117
PRILOG 2.....	120
PRILOG 3.....	126
PRILOG 4.....	133

1. UVOD

Napredak u biološkim istraživanjima je doprineo boljem razumevanju molekularnih mehanizama na kojima su zasnovani ćelijski procesi u prokariotskim i eukariotskim organizmima. Način na koji oni koordiniraju procese u ćeliji i proučavanje poremećaja u njihovoj funkciji odgovornih za nastanak određenih bolesti, predstavljaju važan aspekt u razvoju novih lekova.

Farmaceutske kompanije ulažu ogromne novčane i ljudske resurse u istraživanja kako bi se pronašla ne samo nova jedinjenja sa potencijalnim terapijskim efektom, već i jedinstveni način na koji oni deluju efikasnije i sa manje neželjenih efekata u odnosu na već postojeće lekove. Količina dostupnih podataka iz literature pruža gotovo neiscrpne mogućnosti u koncipiranju novih terapija. Na osnovu literature iz 2006. godine smatra se da postoji oko 324 jedinstvena proteina na koje se može delovati lekovima, od toga se 266 nalazi u humanom genomu, a 58 je poreklom od bakterija, virusa, gljiva i drugih organizama (Overington et al., 2006).

Sa završetkom Projekta humanog genoma 2003. godine analizom dobijenih podataka, ubrzalo se otkrivanje proteina, komponenti signalnih puteva, na koje se može delovati različitim jedinjenjima u cilju terapije određenih bolesti. Razvojem kombinatorne hemije, broj i raznovrsnost hemijskih supstanci koje se mogu koristiti u terapijske svrhe se značajno povećava. Ova istraživanja su podstakla razvoj veoma brzih, selektivnih i pouzdanih testova koji se mogu koristiti u ranim fazama istraživanja novih lekova (Slika 1).

1.1. Kolekcije hemijskih jedinjenja i „mali molekuli“

Za otkrivanje novih lekova je važna kolekcija jedinjenja koja se ispituju, bogatstvo njihove hemijske strukture, kao i fizičke karakteristike (Macarron, 2006; Leeson, 2012).

Prirodni produkti predstavljaju najvažniji izvor novih jedinjenja i najčešće su početne supstance za sintetičke lekove (Newman and Cragg, 2007). Po svom poreklu mogu biti

proizvod mikroorganizama npr. rapamicin (bakterija *Streptomyces higroscopicus*) ili eukariotskih organizama, npr. halikondrin (morski sunder *Halichondria spp*) i supstance biljnog porekla (fitojedinjenja). Poslednja grupa je od posebnog značaja jer je najzastupljenija u tradicionalnoj medicini. Smatra se da samo u Kini i Japanu postoji oko 13.000 supstanci biljnog porekla koje se koriste u medicinske svrhe (Zang et al., 2012). Jedinjenja dobijena hemijskom sintezom, a slična strukturi gore pomenutih jedinjenja se uspešno koriste u onkologiji (Jerusalem et al., 2014; Twelves et al., 2014).

Poslednjih godina, primenom visoko automatizovanih tehnologija, ubrao se proces izolacije i identifikacije prirodnih produkata. Paralelno sa tim, metodama kombinatorne hemije i daljom sintezom organskih molekula (najčešće malih molekulskih težina) ili peptida naglo se povećao broj i raznovrsnost njihovih struktura. Kao rezultat, velike farmaceutske kompanije raspolažu kolekcijama koje mogu imati i do milion hemijskih jedinjenja (Macarron et al. 2011).

Iako se u terapiji raznih oboljenja koriste molekuli širokog spektra karakteristika i masa, ipak u poslednjih 20 godina, velika pažnja se poklanja sintezi jedinjenja male molekulske težine. U farmaceutskoj industriji oni su poznatiji kao mali molekuli (eng. *small molecules*) i predstavljaju organska jedinjenja čija veličina je oko 10 nanometara, a težina ne prelazi 900 daltona. Iako je dostupnost takvih podataka limitirana, interesantno je pomenuti da na osnovu analize oko 21.000 poznatih lekova, samo oko 6% (1357) predstavlja molekule jedinstvene po strukturi, od kojih su 1204 mali molekuli (Overington et al., 2006).

Pažnja koja se poklanja malim molekulima leži u činjenici da imaju sposobnost da se lako apsorbuju, prolaze kroz ćelijsku membranu i deluju unutar ćelije. Istraživanje i sinteza malih molekula je doživelo svoju ekspanziju kroz koncept personalizovane terapije usmerene na razvoj onih lekova koji imaju ciljano delovanje na specifične proteine. Uspeh ovog pristupa je potvrđen kod terapije malignih bolesti. Ovde se mogu izdvojiti kinazni inhibitori EGFR (eng. *Epidermal Growth Factor Receptor*) - gefitinib i erlotinib koji potentno inhibiraju EGFR kod pacijenata sa krupnoćelijskim karcinomom pluća, lapatinib - inhibitor EGFR i HER2 (eng. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) u lečenju karcinoma dojke; everolimus - inhibitor mTORC1 (eng. *Mamalian Target Of Rapamycin 1*) kompleksa u lečenju karcinoma dojke i bubrega i sorafenib - kinazni inhibitor VEGFR (eng. *Vascular Epidermal Growth Factor Receptor*) u lečenju karcinoma bubrega (Hoelder et al., 2012).

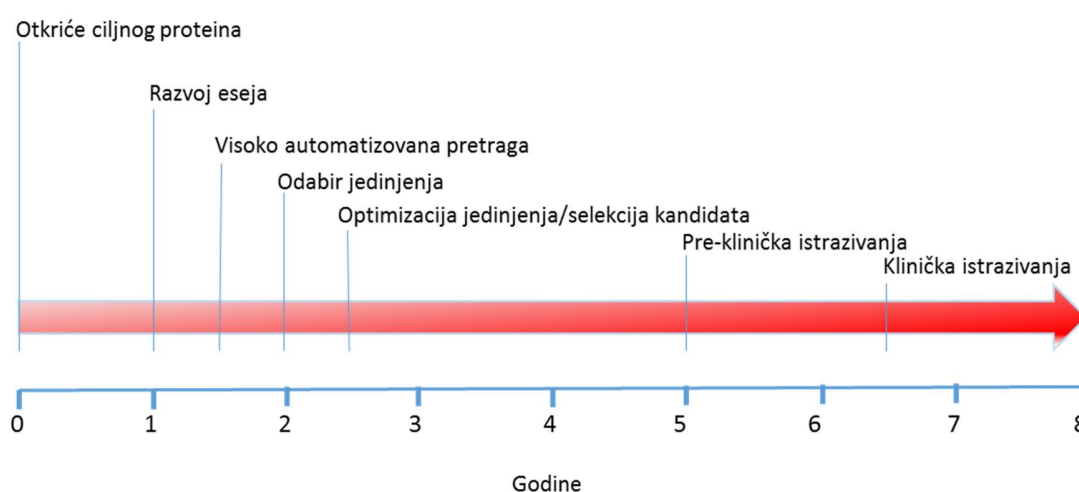
Mali molekuli deluju i na himerne proteine odgovorne za nastanak određenih tipova malignih oboljenja. Imatinib (Gleevec, Novartis) predstavlja jedan od prvih personalizovanih lekova. Koristi se u lečenju hronične mieloidne leukemije koja nastaje usled recipročne translokacije između hromozoma 9 i 22, što ima za posledicu nastanak produženog hromozoma 9 i skraćenog hromozoma 22, koji se još naziva i Filadelfija (eng. *Philadelphia*) hromozom. Segment sa hromozoma 9 na kojem se nalazi ABL (eng. *ABeLson murine leukemia*) gen se spaja sa BCR (eng. *Breakpoint Cluster Region*) genom sa hromozomom 22 čime nastaje fuzioni *BCR-ABL* gen, a njegov proteinski produkt, kontinuirano aktivirana *BCR-ABL* kinaza dovodi do nekontrolisane ćelijske deobe (Rana et al., 2011). Imatinib inhibira aktivnost BCR-ALB protein kinaze (Demetri et al. 2002; O'Brien et al. 2003) i sprečava razmnožavanje malignih ćelija.

Najnoviji primeri hrizotinib (Feizer), ceritinib (Novaris) ili alektinib (Roche) uspešno deluju na inhibiciju funkcije himernog proteina EML4-ALK kinase, produkta fuzionog onkogeno EML4-ALK koji nastaje inverzijom na hromozomu 2 i spajanjem 5' kraja EML4 (eng. *Echinoderm Microtubule-associated protein-Like 4*) sa 3' krajem ALK (eng. *Anaplastic Lymphoma Kinase*) gena (Shackelford and El-Osta, 2015). Ova vrsta mutacije se javlja kod 3-7% pacijenata sa krupnoćelijskim karcinomom pluća, uglavnom nepušača mlađe dobi (Kwak et al., 2010; Shaw et al., 2014).

1.2. Visoko automatizovani testovi

Razvoj novih lekova počinje identifikacijom proteina ili gena koji je vezan za nastanak određene bolesti, a na koje se farmaceutski može delovati. Nakon sagledavanja proteinske strukture i uloge u nastanku oboljenja prelazi se na razvijanje specifičnog eseja i započinje pretraga kolekcije jedinjenja. Cilj je odabir biološki aktivnih komponenata sa potencijalom u modulaciji aktivnosti konkretnog ciljnog molekula, kao i sagledavanje mogućnosti njegovog korišćenja u terapijske svrhe (eng. *safety profile*). Nakon dobijenih rezultata primarnog testiranja, efikasnost hemijskih jedinjenja se dalje proverava sekundarnim esejima, a zatim se odabira nekoliko kandidata (eng. *lead compounds*) koji se detaljno analiziraju u cilju sagledavanja povezanosti između njihove strukture i mehanizama delovanja (eng. *SAR- Structure-Activity Relationship*). Njihova hemijska struktura se može

dalje optimizovati. Najzad, na osnovu dodatnih analiza, izdvaja se jedan molekul koji se dalje testira u animalnim modelima i na kraju u kliničkim studijama. Smatra se da od momenta identifikacije proteina na koji se trapeutski može delovati, pa do predaje rezultata kliničke studije agencijama za registraciju lekova kao što su FDA (eng. *Food and Drug Administration*) ili EMA (eng. *European Medicinal Agency*) prođe najmanje 8 godina (Slika 1), a najčešće je taj proces mnogo duži (Fishman and Porter, 2005).

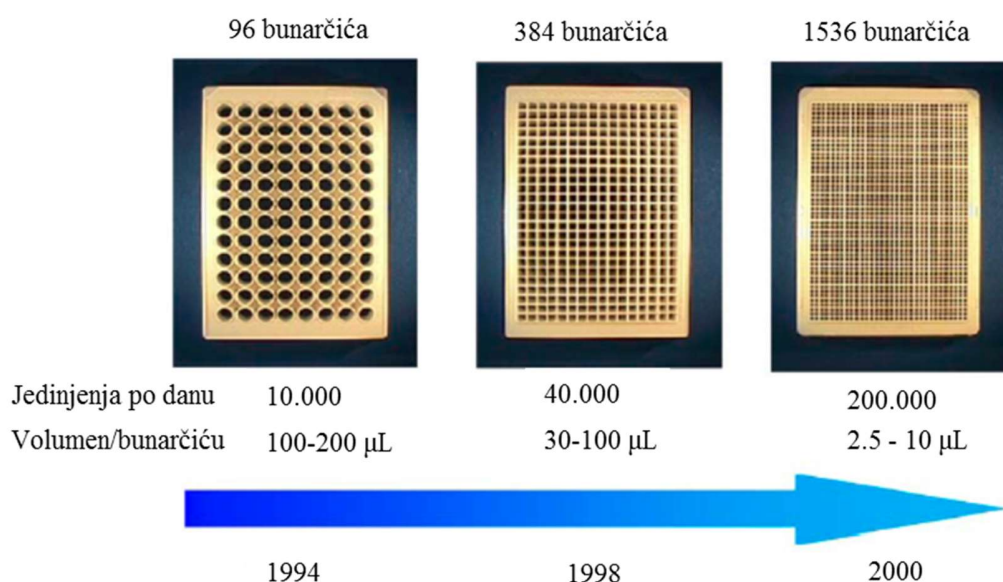


Slika 1. Faze u istraživanju novih lekova (preuzeto iz Fishman i Porter, 2005).

Zbog toga se uočila potreba za razvojem metodologija kojim se velike kolekcije hemijskih jedinjenja, na osnovu njihovih bioloških aktivnosti, efikasno testiraju. Ovaj pristup zahteva automatizaciju, minijaturizaciju testa i efikasnu analizu podataka, a u najvećem broju farmaceutskih kompanija ima centralnu ulogu u istraživanju novih lekova (Mayr and Bojanic, 2009).

Koncept testiranja hemijskih jedinjenja u visoko efikasnim uslovima je relativno mlad, a prvi rad u kome se ove metode opisuju je objavljen 1991. godine. Od momenta kada su počeli da se koriste u laboratorijama pa do danas visoko efikasno testiranje novih lekova je prolazilo kroz nekoliko razvojnih faza. Najpre je bilo samo deo standardnih laboratorijskih pretraživanja fokusiranih na količinu i brzinu dobijanja podataka. U tom periodu tehnologija se ubrzano razvijala kroz usavršavanje i standardizaciju procesa i materijala koji se koriste, mikrotitarskih ploča, multičitača za merenje jačine signala, robotizovanih sistema. Paralelno

sa tim, a na osnovu rastuće potrebe za testiranjem većeg broja molekula u kratkom vremenskom periodu, razvijaju se i koriste mikrotitarske ploče sa više od 96 bunarčića (Slika 2).



Slika 2. Prikaz mikrotitarskih ploča koje se koriste za visoko automatizovane eseje kao i za čuvanje kolekcija hemijskih jedinjenja (Mayr and Bojanic, 2009)

Zatim se, na osnovu prikupljenog iskustva iz kasnijih faza pre-kliničkih istraživanja, uočila se potreba za daljom proverom primarno dobijenih rezultata uvođenjem sekundarnih testova. Sa usavršavanjem molekularnih metoda, efikasno testiranje lekova prestaje da bude fokusirano samo na kvalitet i validaciju dobijenih rezultata, već i na pažljivo biranje strategije kojom će se na najefikasniji i najprecizniji način identifikovati, kako aktivna jedinjenja, tako i specifičnost njihovog delovanja (Wagstaff et al., 2011).

Veliki porast broja molekula kao i raznovrsnost proteina na koje mogu delovati je doveo do fundamentalne promene u istraživanju novih lekova. Kao najvažnije su se izdvojile tehnologije koje su podložne minijaturizaciji, laboratorijskoj automatizaciji i robotici, koje su omogućile testiranje hemijskih jedinjenja u visoko i ultra visoko automatizovanim uslovima u pločama sa 384, 1536 i 3456 bunarčića (Michelini et al., 2010). Ipak, treba imati u vidu da se sa povećanjem broja bunarčića sa 384 na 1536 po ploči

kvalitet pretrage ne poboljšava, ali se vreme izvođenja eseja značajno ubrzava. Iako postoje primeri dalje minijaturizacije u pločama sa 3456 bunarčića, izvođenje testa u tom formatu, u svega 1 μ L kulture nije preporučljivo. Smatra se da gajenje jedne ili nekoliko ćelija u minimalnom volumenu, u gotovo nefiziološkim ulovima, smanjuje preciznost i ponovljivost eseja, ali i njegov biološki smisao (Michelini et al., 2010).

U visoko automatizovanim sistemima, u toku jednog dana, se može testirati od 10.000 do 100.000 jedinjenja, dok je ultra visoko automatizovanim sistemima moguće testirati preko 100.000 jedinjenja po danu (Slika 2).

1.3. Biološki eseji

Animalni modeli predstavljaju tradicionalan način za testiranje terapijskih svojstva određenog molekula. Iako se kroz njih, zbog fiziološke sličnosti sa ljudima, dobija značajna količina važnih podataka, njihova dostupnost je ograničena i skupa, a eksperimenti vremenski zahtevni.

Počeci razvoja automatizovanih testova su vezani za korišćenje biohemijskih eseja, fokusiranih na jedan protein, najčešće praćenjem vezivanja liganda za receptor, ili kroz inhibiciju njegove enzimske aktivnosti tj. praćenjem iskorišćenja substrata ili formiranja produkta (Acker, Michael and Auld, 2014). Prednost ove metode je visoka specifičnost, a reakcija se odvija u striktno kontrolisanoj sredini. Sa druge strane, ovaj pristup zahteva, pored standardizacije testa, veliku količinu proteina, njegovu dugotrajnu izolaciju, prečišćavanje i pripremu za izvođenje eseja. Pored toga, ova metoda je limitirana činjenicom da ne može predvideti sve procese koji se prirodno odvijaju u ćeliji. U tom smislu, ćelija može biti nepropustljiva za odabrani molekul, ili se, ukoliko prođe ćelijsku membranu, unutar ćelije molekul brzo metaboliše u neaktivnu supstancu.

Za razliku od gorepomenutih testova, biološki eseji zasnovani na korišćenju ćelijske kulture ili model organizama su daleko pogodniji za upotrebu, jer se istovremeno može dobiti informacija o biološkoj aktivnosti i načinu delovanja testiranog jedinjenja, (Fishman

and Porter, 2005). Ovi testovi su brzi, osetljivi, jednostavni i jeftini, a zbog svoje sposobnosti da predvide *in vivo* efekte, predstavljaju idealnu sponu između biohemijskih i animalnih testova. Velika prednost bioloških u odnosu na biohemijske eseje je što ne zahtevaju, osim standardizacije samog eseja, dugotrajnu pripremu. Oni daju kompletniju sliku o interakciji određenog jedinjenja u kontekstu ćelijskih procesa kao što su uticaj propustljivosti ćelijske membrane, nespecifično delovanje na druge, slične proteine (eng: *off target effect*), kao i potencijalnoj toksičnosti (Kim et al., 2009).

Korišćenjem ovih testova može se kvantitativno odrediti ćelijska vijabilnost, kroz indirektno merenje fluorescencije, luminescencije ili absorbance (O'Brien et al., 2000; Min et al., 2006; Fleming et al., 2008; Gilbert et al., 2011). Takođe, postoje primeri uspešnog kombinovanja (*multipleksing*) praćenja ćelijske vijabilnosti sa ekspresijom reporter gena (Krysan and Didone, 2008; Didiot et al., 2011).

1.3.1. Merenje citotoksičnosti

U ovoj grupi eseja izdvajaju se testovi koji se zasnivaju na detekciji vijabilnih ćelija u kulturi i testovi kojima se detektuje prisustvo mrtvih ćelija. Smanjen broj vijabilnih ćelija u kulturi pod uticajem eksperimentalnog terapeutika može biti posledica toksičnog delovanja te supstance i indukcije smrti ćelija, ali takođe i posledica inhibicije njihovog proliferativnog potencijala, tako da se procena citotoksičnosti testovima koji se baziraju na kvantifikaciji živih ćelija u kulturi, bez dodatne evaluacije mrtvih, ne može se smatrati pouzdanom.

Testovi zasnovani na detekciji vijabilnih ćelija

Testovi za određivanje broja živih ćelija se zasnivaju na merenju signala čiji je intenzitet u korelaciji sa njihovim brojem u ćelijskoj kulturi. Najčešći parametri, čijom evaluacijom se procenjuje vijabilnost kulture na gore pomenuti način, jesu mitohondrijalna respiracija, količina DNK i proteina ili konstitutivnih enzima poput kisele fosfataze.

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolium bromid) test

U osnovi MTT testa nalazi se činjenica da žive ćelije koriste kiseonik, a ukupna mitohondrijalna respiracija se potom dovodi u korelaciju sa brojem živih ćelija u kulturi. Bezbojni (MTT) ulazi u ćeliju endocitozom, redukuje se u mitohondrijama (posredstvom mitohondrijalnih dehidrogenaza) ili u nekim slučajevima izvan njih, i prevodi u formazan bez uticaja na vijabilnost ćelija. Nakon tretiranja sa MTT ćelije se liziraju sa DMSO koji rastvara nastali formazan, a intenzitet boje, koji je proporcionalan broju živih ćelija, meri se spektrofotometrijski (Almutary and Sanderson, 2016).

Kristal-violet (CV) test

Odredjivanje vijabilnosti kristal-violet bojom je jednostavan test u kome se informacija o relativnom broju ćelija u kulturi dobija na osnovu činjenice da se kristal-violet boja vezuje za DNK ćelija koje su adherirale za podlogu. Nakon rastvaranja, količina boje se kvantifikuje spektrofotometrijski (Saotome, 1989; Almutary and Sanderson, 2016).

Sulforodamin (SRB) test

Test za određivanje vijabilnosti sulforodamin bojom se bazira na merenju ukupnog sadržaja ćelijskih proteina na osnovu kojeg se određuje relativan broj ćelija u kulturi. Metoda je optimizovana, kao i u slučaju kristal-violet testa, za ispitivanje uticaja komponenata na kulturu adheriranih ćelija (Vanicha and Kirtikara, 2006).

Test kisele fosfataze

Test kisele fosfataze se koristi za praćenje relativnog broja vijabilnih ćelija, merenjem aktivnosti pomenutog enzima lociranog u lizozomima. Nakon tretmana, ćelije se liziraju, a enzim prevodi supstrat p-nitrofenil fosfat (pNPP) najpre u p-nitrofenol, a zatim u p-nitrofenolat (žuto obojen), formu koje se kolorimetrijski može kvantifikovati. Ova metoda se uspešno koristi za detekciju uticaja različitih komponenata na vijabilnost ćelija u suspezijama (Connolly et al., 1986; Maksimovic-Ivanic et al., 2015).

Test neutral crvene boje

Reč je o kvantitativnoj metodi za praćenje broja vijabilnih ćelija bojenjem njihovih lizozoma neutral crvenom bojom. Intenzitet boje odražava stepen preživljavanja i meri se spektrofotometrijski.

Cell Titer Glo and BacTiter Glo luminescentni testovi

Cell Titer Glo and BacTiter Glo luminescentni testovi se koriste za praćenje vijabilnosti ćelije, merenjem količine prisutnog ATP kao parametra njene metaboličke aktivnosti. Ova metoda se koristi se za određivanje broja, kako sisarskih ćelija, tako i mikroorganizama u hranljivom medijumu.

Svaki od pomenutih testova ima nedostatke koji mogu usloviti neadekvatnu interpretaciju dobijenih rezultata. Naime, komponente čiji citocidni potencijal testiramo, mogu modulirati neke od fizioloških karakteristika koje u testu služe kao parametri evaluacije broja ćelija. Dobar primer za to je činjenica da mitohondrijalna respiracija može biti inhibirana, ili ređe, potencirana, pod uticajem tretmana. U tom slučaju nivo ukupne respiracije u kulturi neće biti odraz broja ćelija, već utišane/potencirane respiracije. Dalje, ukoliko supstanca koju testiramo deluje na sintezu i stabilnost proteina, test zasnovan na kvantifikaciji broja ćelija na osnovu ukupne količine proteina neće biti dobar izbor. Takođe, u slučaju kada je parametar testa ukupna količina boje koja se vezuje za DNK, povećanje broja ćelija u S i G2/M fazi ćelijskog ciklusa u velikoj meri mogu usloviti odstupanje u tumačenju dobijenih vrednosti apsorbance (Radovic et al., 2012).

Iz svih pomenutih razloga, u cilju ispravnog tumačenja i zaključivanja, u ovim fazama istraživačkog procesa poželjno je kombinovati barem 2 eseja i uz vizuelnu opservaciju ćelijske kulture, odrediti koji od njih je relevantniji u konkretnom sistemu.

Testovi zasnovani na detekciji mrtvih ćelija

Laktat dehidrogenaza (LDH) test

Usled oštećenja ćelijske membrane ćelije oslobađaju citosolni enzim LDH u okolni medijum, a kroz enzimsku redukciju formazana se stvara narandžasto crvena boja koja se

očitava spektrofotometrijski. Ovim testom se kvantifikuje prisustvo mrtvih ćelija, ali je on kvalitativno ograničen na ćelije čija je smrt praćena gubitkom integriteta ćelijske membrane. Pomenuto svojstvo ga pravilnije deklariše kao esej za detekciju smrti nekrozom pre nego test citotoksičnosti (Slater, 2001).

Tripan blue ili propidijum jodid test

Poput LDH eseja, Tripan blue test kao i bojenje propidijum jodidom, bez obzira na biološke molekule za koje se vezuju, zasnovani su na specifičnoj osobini membrane ćelija u nekrozi da gube svojstvo permeabilnosti, te postaju propustljive za pomenute boje. Na taj način nekrotične ćelije se mogu kvantifikovati i odvojiti od populacije živih ćelija sa očuvanom selektivnošću na membranskom nivou. Ove vrednosti, međutim, ne predstavljaju adekvatan odraz broja mrtvih ćelija jer se ćelije u apoptozi, kao i u LDH testu, zbog funkcionalne očuvanosti membrane, na ovaj način ne mogu detektovati (Erdal et al., 2005).

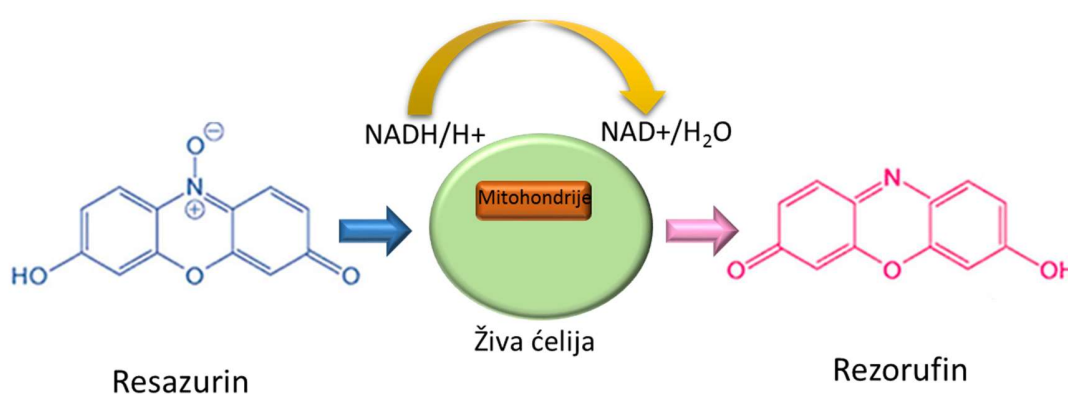
1.3.2. Neinvazivni testovi za merenje ćelijske vijabilnosti

Eseji zasnovani na merenju ćelijske vijabilnosti tokom inkubacije ćelija su interesantni za upotrebu u ranim ispitivanjima, zbog toga što su jednostavni za korišćenje, nedestruktivni i pružaju mogućnost upotrebe intaktnih ćelija za dalje ispitivnje.

AlamarBlue® (rezasurin) je jedan od najčešće korišćenih oksido-reduktivnih indikatora kojim se prati ćelijska vijabilnost merenjem njene aerobne respiracije (Borra et al., 2009; Rampersad 2012; Bonnier and Keating, 2015). AlamarBlue® je plava, slabo fluorescentna boja koja se ireverzibilno redukuje u roze obojen ili visoko fluorescentni rezorufin. Redukcija alamarBlue® se dešava unutar ćelije posredstvom enzima dijaforaza. Dijaforaze su grupa enzima poznatih kao flavoproteini (sadrže FAD, derivat riboflavina). Po funkciji su oksidoreduktaze, a učestvuju u važnim metaboličkim procesima, kao što su Krebsov ciklus, oksidativna fosforilacija itd. Nalaze se u mitohondrijama ili citoplazmi, a posreduju u transferu elektrona sa jednog (donora) na drugi molekul (akceptor). Ova grupa enzima najčešće koristi NADH ili NADPH kao donore elektrona. *In vitro* je potvrđeno da

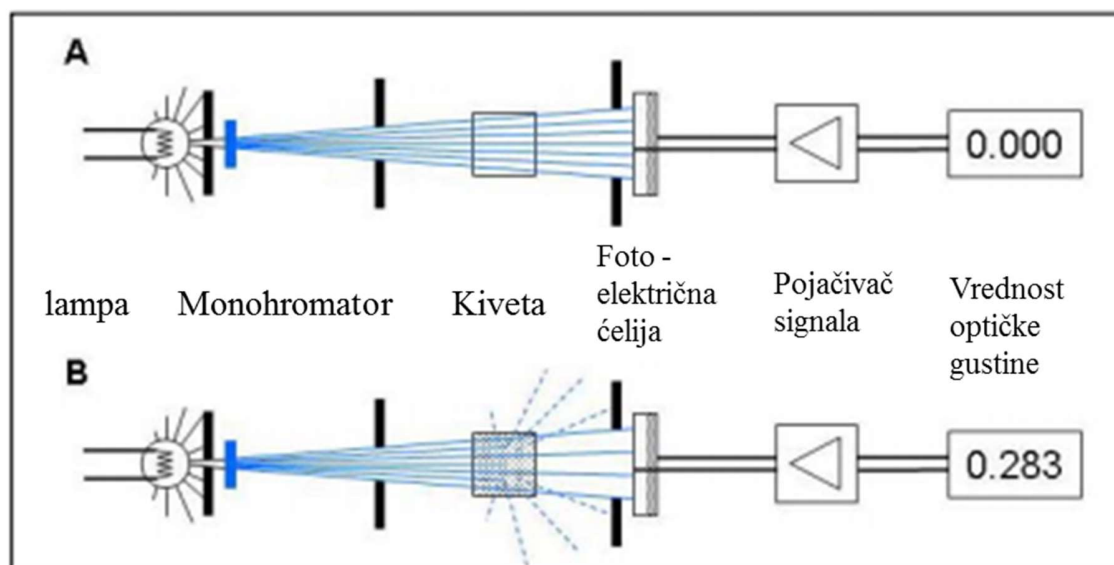
ovi enzimi prevode resazurin u rezorufin (O'Brien et al., 2000). Dijaforaze se nalaze kako u bakterijama tako i ćelijama sisara. Efekat redukcije se može pratiti:

- spektrofotometrijski - merenjem intenziteta boje, resazurin (plavo) se prevodi u rezorufin (ružičastu boju)
- fluorimetrijski - merenjem intenziteta fluorescentnog signala, bezbojni resazurin se redukuje u fluorescentni rezorufin



Slika 3. Princip redukcije alamarBlue® (resazurin).

Merenje optičke gustine (eng. *optical density*) predstavlja jednu od najčešće korišćenih metoda za praćenje rasta i razmnožavanja jednoćelijskih organizama. Princip merenja optičke gustine se zasniva na određivanju broja ćelija na osnovu količine propuštene svetlosti. Vidljiva svetlost ne prolazi kroz ćelije. Spektrofotometrijski metod merenja se zasniva na propuštanju snopa vidljive svetlosti, najčešće talasne dužine 600 nm, kroz medijum zasejan mikroorganizmima i merenja njenog intenziteta nakon prolaska. Što je veći broj ćelija, manja je količina propuštene svetlosti. Prednost ove metode je što ne koristi dodatne hemikalije.



Slika 4. Princip merenja optičke gustine (preuzeto iz rada Theory and Measurement of Bacterial growth, Fridrich Widdel).

1.4. *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* ima veliki značaj kako za nauku, tako i za svet izvan nje. Pored toga što se koristi u industriji, zahvaljujući genetičkoj plastičnosti uspešno se koristi i u istraživanju biohemijskih signalnih puteva (Helliwell et al., 1998; Jungwirth. and Kuchler., 2006).

Prisustvo ćelija kvasca u pivu najpre je uočio Antoan Lavoasije 1680. godine, kada je opisao alkoholnu fermentaciju, a zaslugom Luja Pastera 1876. godine je prvi put potvrđeno da prisustvo živih organizama dovodi do procesa fermentacije. Hansen je 1888. godine izolovao pivski kvasac i ukazao na njegovu važnost u proizvodnji piva.

S. cerevisiae je eukariotski organizam, fakultativni anaerob, koji koristi glukozu kao glavni izvor ugljenika. Količina dostupne glukoze i kiseonika kontroliše prelazak sa respiracije na fermentaciju. Pri optimalnoj količini kiseonika i glukoze ćelije kvasca koriste proces aerobne respiracije. Kroz proces glikolize, koji je zajednički za respiraciju i fermentaciju, ćelije prevode glukozu u piruvat. U respiraciji piruvat ulazi u Krebsov ciklus i

kao krajnji produkti nastaju ATP, H₂O i CO₂. U slučaju povećane količine šećera ili smanjenog/potpunog odsustva kiseonika, ćelije kvasca započinju alkoholnu fermentaciju kojom se dva molekula piruvata, dobijenih glikolizom, prevode u dva acet aldehida i CO₂. Acet aldehyd se dalje redukuje u etil alkohol, tako da su krajnji produkti alkoholne fermentacije alkohol i CO₂. Ovim procesom se dobija manja količina energije u poređenju sa energijom dobijenom u procesu aerobne respiracije.

Kao odgovor na nepovoljne uslove sredine, nedostatak izvora azota i ugljenika, diploidne jedinke kvasca ulaze u proces mejoze formirajući askuse i stvarajući haploidne spore koje mogu ostati u stanju mirovanja i do nekoliko meseci, sve dok uslovi spoljašnje sredine ne postanu povoljni za dalji rast i razmnožavanje (Barros et al., 2010). Haploidne jedinke, nastale iz haploidnih spora, nastavljaju da se dele sve dok ne dođu u kontakt sa feromonima ćelije drugog tipa (eng. *mating type*). Nakon toga ćelijska deoba prestaje, dolazi do fuzije dva ćelijska tipa (α i a) i nastanka diploidne ćelija kvasca, koja nakon toga otpočinje ponovni proces deobe i rasta.

1.4.1. Faze rasta *S. cerevisiae*

Slično kulturama drugih mikroorganizama koje rastu u suspenziji i rast kulture *S. cerevisiae* prolazi kroz sledeće faze:

Lag faza – rast i deoba usporeni usled privikavanja na novi medijum. U zavisnosti od uslova rasta, kao i soja kvasca lag faza može trajati nekoliko sati. Postepeno ćelije počinju da se dele i ulaze u log fazu.

Log faza – (OD₆₀₀ 0,1-0,8) - najbrži rast kvasca i faza u kojoj se ćelije, najčešće, uzimaju za dalje eksperimente. Srednja log faza odgovara OD₆₀₀ 0,3 do 0,8. Vreme potrebno da se broj ćelija udvostruči se naziva „vreme generacije“. Kod divljeg soja (wt) jedinki kvasca, tokom rasta u bogatom medijumu na 30 °C vreme generacije iznosi oko 90 minuta.

Kasna Log faza – (OD₆₀₀ 0,9-1,9) - količina hranljivih materija i šećera u medijumu se smanjuje, a ćelije počinju da usporavaju svoj rast. Ukoliko je za izvođenje eksperimenata, koji ne zahtevaju visoko metabolički aktivne ćelije (npr. izolovanje proteina), potrebna velika količina ćelija, preporučljivo je da se uzimaju u ovoj fazi.

Stacionarna faza – (OD_{600} iznad 2) zbog visokog nivoa produkata metabolizma i veoma niskog nivoa šećera i drugih hranljivih materija u medijumu ćelije zaustavljaju svoj rast. Upotreba ćelija u ovoj fazi nije preporučljiva.

1.4.2. *S. cerevisiae* kao model organizam

Zbog svoje genetičke plastičnosti kao i životnog ciklusa *S. cerevisiae* je najšire korišćeni eukariotski model. Predstavlja prvi eukariotski organizam čiji je genom, veličine 12 Mb (Mega baza) raspoređen na 16 hromozoma, kompletno sekvencioniran, a čime je pokazano da u njegovom genomu postoji 6275 otvorenih okvira čitanja (eng. *Open reading frames - ORF*) koji mogu da kodiraju proteine duže od 100 i više amino kiselina.

Daljim analizama uočena je velika sličnost njegovih gena sa genima viših eukariota. Iako je njihov ukupni broj oko 6 puta manji u poređenju sa humanim genomom (30.000-40.000 gena) veliki broj proteinskih domena, proteina, proteinskih kompleksa i međusobnih proteinskih interakcija je evolutivno konzerviran (Kurtz et al., 2004; Menacho-Márquez and Murguía, 2007; Matuo et al., 2012). Konzerviranost je posebno zastupljena u strukturi i funkciji proteina uključenih u glavne ćelijske procese; metabolizam, DNK replikaciju i reparaciju, ćelijsku deobu (Goffeau et al., 1996). Blizu 60% gena koji su uključeni u humane bolesti ima svog homologa, dok 20% ima ortologni gen u *S. cerevisiae* (Mushegian et al., 1997) što pruža široke mogućnosti u istraživanjima jedinjenja koja imaju identični mehanizam delovanja u kvascu kao u sisarskim ćelijama, kao što je npr. rapamicin i ciklosporina A (Kunz. and and Hall, 1993). Takođe, funkcionalna konzerviranost gena kvasca sa genima drugih patogenih gljiva omogućava njegovo uspešno korišćenje u istraživanju lekova sa antifungalnim dejstvom (Krysan and Didone, 2008; Mann et al., 2015). Od posebnog značaja su istraživanja mehanizma ćelijske deobe, zbog njegove važnosti u terapiji različitih karcinoma i gljivičnih infekcija (Kurtz et al., 2005).

Jednoćelijska građa, genetička manipulativnost, kao i sposobnost diploidnih jedinki *S. cerevisiae* da formiraju spore iz kojih nastaju četiri haploidna gameta značajno olakšavaju molekularno biološka istraživanja. Nakon što je genom kvasca kompletno išćitan, za potrebe različitih istraživanja, konstruisane su različite kolekcije sojeva kvasca. Na primer, spajanjem gena kvasca sa genom koji kodira fluorescentni zeleni protein nastaje fuzioni protein čime je moguće odrediti položaj proteina u ćeliji (Huh et al., 2003). Pored toga,

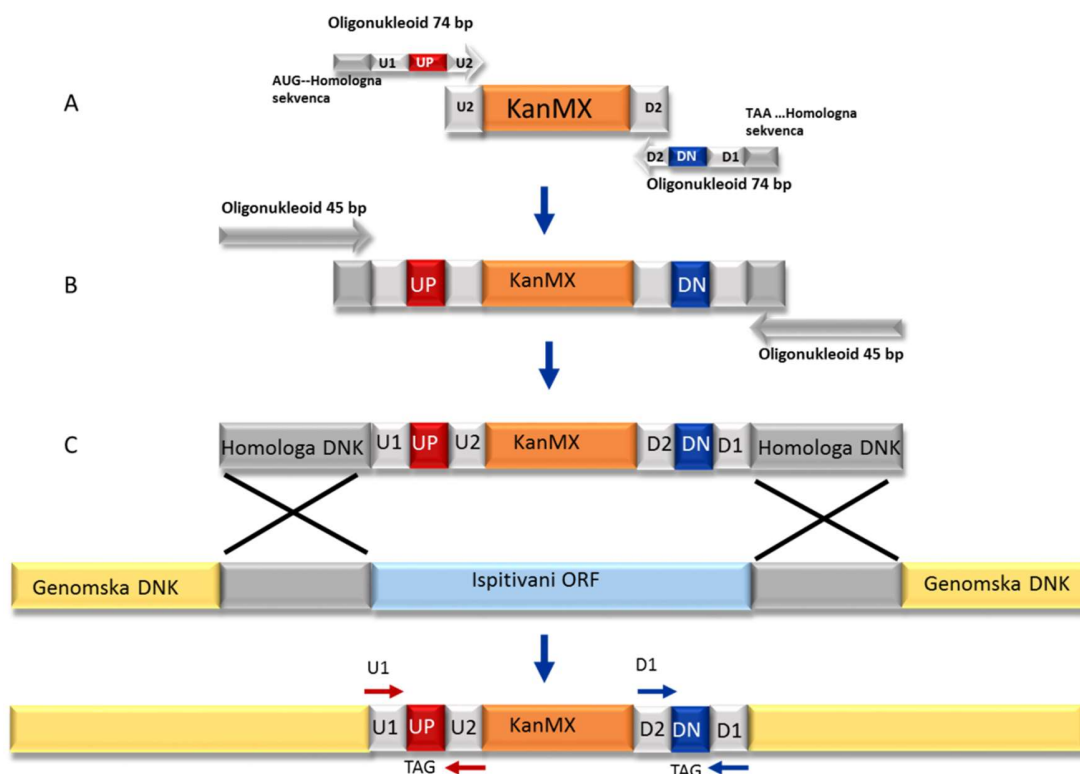
konstruisani su sojevi kojim je jedna kopija gena zamenjena genom za rezistenciju i obeležena jedinstvenom sekvencom. Na taj način se zadržava samo jedna kopija gena (haplodeficijentni sojevi) što posledično dovodi do smanjene prisutnosti proteina koji taj gen kodira. Gajenjem ovih sojeva, u različitim uslovima sredine je pokazano da 97% otvorenih okvira čitanja ima specifične fenotipske karakteristike što je doprinelo boljem razumevanju biološke uloge mnogih (ne)poznatih gena (Winzeler, 1999). Pored toga, ova istraživanja su otvorila put razumevanju načina na koji biološki aktivne substance deluju na važne signalne puteve u ćeliji i dizajniranju naredne, efikasnije, generacije klinički značajnih jedinjenja (H Sadlish et al., 2013; Hoepfner et al., 2014; Helliwell et al., 2015).

1.5. Metoda haplodeficijentnog profilisanja

Metoda haplodeficijentnog profilisanja, HIP (Haplo Insufficiency Profiling) se uspešno koristi u istraživanju bioaktivnih jedinjenja i njihovog mehanizma delovanja. Zasniva se na korišćenju kolekcije heterozigotnih sojeva kvasca kojima nedostaje jedna kopija istog gena. Samim tim heterozigotni sojevi imaju smanjenu (haplodeficijentnu) količinu datog proteina u odnosu na divlji tip.

U haplodeficijentnim sojevima jedna kopija gena zamenjena je KanMX4 “kasetom”. Lančanom reakcijom polimeraze, a korišćenjem prajmera dužine 74 bp KanMX4 gen je produžen sa obe strane za 54 odnosno 55 bp (Slika 5, A). Na taj način kasetna je oivičena dodatnim parom prajmera dužine 18 bp homologim sa svim haplodeficijentnim sojevima, dve jedinstvene (uzvodne i nizvodne) sekvence “barkoda” dužine 20 bp, kao i sa 18 tj. 17 bp genomske sekvence uzvodno i nizvodno od gena koji se uklanja. Barkodovi su dizajnirani da budu jedinstveni, tj. da se njihove sekvence ne podudaraju ni sa jednim delom genoma kvasca. Dodatnom lančanom reakcijom polimeraze prethodno dobijen PCR produkt je produžen do 45 bp koji su homologni sa DNK sekvencom ispred i iza gena koji će biti zamenjen (Slika 5, B i C) čime se povećava specifičnost i olakšava proces homologe rekombinacije (Eason et al., 2004). Na ovaj način je konstruisano 5.910 različitih sojeva kvasca koji nose jednu kopiju određenog gena (haplodeficijentni heterozigot) kao i KanMX gen, obeležen jedinstvenim uzvodnim i nizvodnim barkodovima, koji omogućava ovim sojevima da rastu na hranljivoj podlozi koja sadrži antibiotik geneticin

Barkodovi su oivičeni univerzalnim oligonukleotidnim sekvencama koje služe za njihovo umnožavanje lančanom reakcijom polimeraze – PCR (Slika 5).



Slika 5. Konstrukcija KanMX kasete (A i B) i haplodeficijentnog heterozigota homologom rekombinacijom (C). Uzvodni barkod je obeležen crvenom, a nizvodni plavom bojom. Barkodovi su oivičeni univerzalnim oligonukleotidnim sekvencama za njihovo umnožavanje lančanom reakcijom polimeraze (preuzeto iz rada Pierce et al., 2007).

Metoda haplodeficijentnog profilisanja se izvodi u nekoliko etapa koje su predstavljene na Slici 6.

1. Priprema početnog stoka kvasca

Početni stok kvasca se priprema prikupljanjem svežih kolonija svih haplodeficijentnih sojeva gajenih na bogatoj podlozi u prisustvu genicidina. U početnom stoku kvasca je neophodno da su svi sojevi podjednako zastupljeni.

2. Kompetitivno gajenje kulture svih sojeva kvasca

Kultura kvasca iz početnog stoka se gaji i bogatom medijumu u prisustvu ispitivanog jedinjenja, najčešće u vremenskom periodu koji odgovara 20 vremena generacije. Ukoliko jedinjenje deluje na produkt jednog ili više gena (od ukupno 5910 gena), soj kvasca koji je nosilac tog gena će imati smanjen rast tj. smanjeno prisustvo u ukupnoj kulturi ćelija.

3. Izolovanje genomske DNK

Ukupna genomska DNK se izoluje nakon kompetitivnog gajenja, tj. u prisustvu ispitivanog jedinjenja.

4. Umnožavanje jedinstvenih barkodova

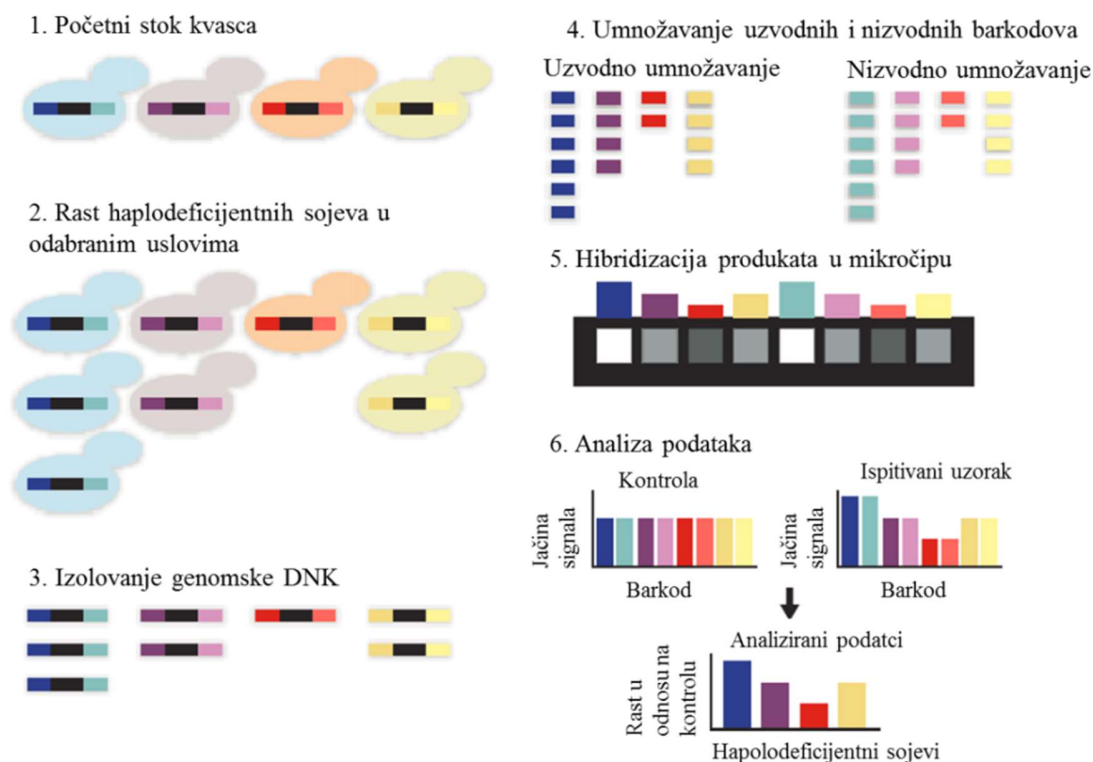
Jedinstveni nizvodni i uzvodni barkodovi se umnožavaju PCR reakcijom koristeći dva para univerzalnih prajmera čije se komplementarne sekvence nalaze u svim haplodeficijentnim sojevima (G148) tih sojeva. U svakom paru, jedan prajmer je obeležen biotinom čime se dobijaju obeleženi PCR produkti.

5. Hibridizacija produkata u mikročipu

Obeleženi PCR produkti hibridizuju se sa probama na mikročipu (po pet proba za svaki barkod), a merenjem intenziteta signala na mikročipu se posredno određuje učestalost određenog haplodeficijentnog soja u ukupnoj kulturi kvasca.

6. Analiza dobijenih rezultata

Učestalost svih sojeva kvasca, gajenih u prisustvu ispitivanog jedinjenja se određuje poređenjem sa učestalošću svih sojeva kvasca u kontrolnom uzorku (gajenom samo u bogatom medijumu).



Slika 6. Šematski prikaz metode haplodeficijentnog profilisanja (preuzeto iz rada Pierce i sar. 2007).

Prednost ove metodologije je da bez prethodnog znanja može da ukaže na mogući način delovanja bioaktivnih molekula na rast i preživljavanje ćelije. Time se dobija genetički profil što je važno u daljem ispitivanju antiproliferativnih meta koje mogu imati potencijal u oblasti medicinske mikrobiologije i onkologije. Izvodljivost i upotrebljivost ove metode je prikazana kroz profilisanje načina delovanja poznatih, kao i novih bioaktivnih jedinjenja (Giaever, 2002; Giaever et al., 2004, 1999; Hillenmeyer et al., 2008; Smith et al., 2010)

1.6. *Antifungalni lekovi*

Gljivične infekcije se mogu podeliti u dve glavne grupe: superficijalne (mikoze površinskih slojeva kože i mukoze) i sistemske ili invazivne infekcije (sterilni delovi tela, krvotok, centralni nervni sistem, pluća, jetra ili bubrezi).

Trenutna terapija sistemskih gljivičnih infekcija je limitirana i uključuje samo tri strukturne klase lekova:

- Polieni – Najstarija klasa antifungalnih lekova od kojih se praktično, koristi samo amfotericin B. Amfotericin B (AmB) je mali molekul, prirodni produkt koji se vezuje za ergosterol, lipidnu komponentu ćelijske membrane gljiva. Svoje antifungalno svojstvo AmB ostvaruje formiranjem kanala i permeabilizacijom ćelijske membrane (Gray et al., 2012). AmB trenutno ima najširi spektar antifungalnog delovanja.
- Azoli – najšire upotrebljavana klasa antifungalnih lekova sa velikim brojem predstavnika od kojih su najpoznatiji flukonazol, vorikonazol i posakonazol. Azoli inhibiraju sintezu ergosterola i generalno deluju fungistatski.
- Ehinokandini – predstavljaju najnoviju klasu antifungalnih lekova iako su otkriveni još sedamdesetih godina prošlog veka. Ehinokandini inhibiraju sintezu 1,3- β -glukana, gradivne komponente ćelijskog zida gljiva.

Mali broj dostupnih antifungalnih lekova, njihov ograničeni uspeh u suzbijanju invazivnih gljivičnih infekcija, kao i rastuća rezistencija na postojeće lekove ukazuju na potrebu za novim klasama antifungalnih lekova.

1.7. *Citostatici*

Citostatici predstavljaju grupu lekova koji zaustavljaju rast i nekontrolisanu deobu, uglavnom tumorskih ćelija, i na taj način dovode do njihove smrti, a mogu biti:

- Alkilirajući agensi – njihovo citostatsko delovanje se najčešće ostvaruje kroz trajno vezivanje za DNK, što sprečava replikaciju i dovodi do ćelijske smrti apoptozom (Reed, 2000). Inhibitori sa dve alkil grupe (ciklofosfamid i hlorambucil) se

kovalentno vezuju, preko atoma azota, za dve purinske baze (guanin) na jednom ili između dva lanca DNK dovodeći do njegove nestabilnosti (Siddik, 2002). Time se sprečava njegovo odvijanje, zaustavlja proces replikacije, a posledično sinteza RNK i proteina (Antonio et al., 2014). Mehanizam delovanja cisplatina je nešto drugačiji, iako spada u alkilirajuće agense, inhibiciju DNK replikacije ostvaruje kovalentnim vezivanjem za purinske baze (adenin u guanin) preko atoma platine (Dasari and Tchounwou, 2014)

- Antimetaboliti – sintetički lekovi koji po svojoj strukturi predstavljaju analoge purinskih ili pirimidinskih baza. Zbog svoje hemijske sličnosti sa gradivnim komponentama DNK koriste se za izgradnju nukleotida i posledično sprečavaju sintezu DNK, a samim tim i rast tumorskih ćelija. Najšire korišćeni predstavnici ove grupe lekova su analozi folne kiseline (metotreksat) i analog pirimidina (5-fluorouracil, gemcitabin).
- Mitotički inhibitori – deluju na proces ćelijske deobe, a svoje inhibitorno delovanje ostvaruju kroz vezivanje za mikrotubularne proteine sprečavajući njihovu polimerizaciju i depolimerizaciju čime se zaustavlja deoba jedra. Pored toga, oni deluju i na ostale ćelijske funkcije vezane za aktivnost mikrotubula, kao što je fagocitoza leukocita, hemotaksija i sprovođenje nervnih impulsa. Najvažniji predstavnici ovih lekova su vinka alkaloidi (vinorelbin i vinkristin) i taksani (paklitaksel, docetaksel).
- Inhibitori DNK topoizomeraza – inhibitorno delovanje ostvaruju na dva načina:
 - Topoizomeraza I (TopI) inhibitori – Vezuju se za molekul TopI, dovodeći do stvaranja kompleksa TopI:DNK, sprečavajući time njenu aktivnost u povezivanju DNK i ostavljajući jednolančane prekide u DNK molekulu. Tipični predstavnici ove klase lekova su topotekan, irinotekan (Ewesuedo and Ratain, 1997; Kwak et al., 2010).
 - Topoizomeraza II (TopII) inhibitori - deluju na protein na dva načina: vezujući se za enzim i sprečavajući njegovo vezivanje i stvaranje prekida u DNK, ili formiranjem TopII:DNK kompleksa, sprečavajući povezivanje i

ostavljajući dvolančane prekide u DNK molekulu. Najšire korišćeni inhibitori TopII enzima su etoposid i doksorubicin (Nitiss, 2009).

- Antihormonalni lekovi – delovanje ostvaruju na dva načina:
 - snižavaju nivoa hormona odgovornih za nastanak određenih tipova tumora delujući na njihovu sintezu – goserelin, anastrozol, egzamesten i letrozol (Lombardi, 2002; Fabian, 2007) ili goserelin
 - sprečavajući vezivanje hormona kroz blokadu receptora specifičnih za dati hormon – hormonalni antagonisti: tamoksifen (Goodsell, 2002) i fulvestrant (Osborne et al., 2004)
- Biološki lekovi – deluju na specifične proteine koji kontrolišu aktivnost ili su komponente signalnih puteva uključenih u regulaciju ćelijske deobe i / ili smrti.

Klinička praksa jasno ukazuje na nedostatak dovoljno efikasnih pristupa u terapiji invazivnih maligniteta. U cilju povećanja efikasnosti, smanjenja toksičnosti, ali i eliminacije fenomena rezistencije na citostatike, neophodna su dalja istraživanja. Perspektivu, u tom smislu, imaju pre svega terapeutski pristupi zasnovani na finoj modulaciji unutarćelijskih signala, čime bi se terapeutik učinio maksimalno selektivnim prema transformisanom fenotipu.

Kako bi se postigla efikasnost u pretrazi i selekciji prirodnih i sintetskih molekula sa željenim osobinama, razvoj visoko automatizovanih testova koji omogućavaju procenu velikog broja kombinacija u testiranju, kako sa aspekta vremena i prostora, tako i ekonomski od izuzetnog je značaja.

1.8. Upotreba kvasca u visoko automatizovanim uslovima

Zahvaljujući jednostavnim uslovima gajenja i veoma velikoj genetičkoj manipulativnosti, *S. cerevisiae* je jedan od najšire korišćenih jednoćelijskih eukariotskih model organizama.

Dobro poznata genetika i visok stepen konzerviranosti osnovnih ćelijskih procesa sa humanim ćelijama su doprinele da se *S. cerevisiae* uspešno koristi u istraživanju ćelijskih fizioloških puteva sa evolutivno konzerviranim proteinskim interakcijama (Goffeau et al., 1996; Mushegian et al., 1997). Osim toga, visoka tolerancija na mehanički stres prisutan u procesu disperzije tečnosti čine kvasac veoma zahvalnim modelom za istraživanje novih lekova u automatizovanim uslovima (Barberis et al., 2005; Liu et al., 2007).

Da bi se postigla veća propustljivost ćelijske membrane za ispitivana jedinjenja, a samim tim i postigla veća osetljivost eseja, pored wt sojeva kvasca, koriste se i diploidni sojevi kojima su uklonjene obe kopije jednog (*pdr5*) ili dva (*pdr5 snq2*) gena koji kodiraju ABC (eng. *ATP binding cassette*) transportne proteine locirane u ćelijskoj membrani (Balzi et al., 1994; Cui et al., 1999; Jungwirth and Kuchler, 2006). ABC proteini učestvuju u transportu jona, malih molekula, kao i makromolekula, kod prokariota i eukariota. Genom *S. cerevisiae* sadrži 16 gena koji kodiraju ABC transportere, a aktivnost nekih od njih Pdr5p, Snq2p, Yor1p može dovesti do rezistencije na većinu trenutno dostupnih klinički važnih antifungalnih lekova (npr. polieni) (Jungwirth and Kuchler, 2006). Aktivnim izbacivanjem lekova i drugih biološki aktivnih supstanci, posredstvom proteina koji pripadaju ABC transportnim proteinima se može ograničiti njihova koncentracija u ćeliji. Kolaczkovski i saradnici su pokazali da se uklanjanjem jedne ili dve pumpe za aktivno izbacivanje lekova iz ćelije može povećati njihova koncentracija u samoj ćeliji, pa samim tim i efekti. Korišćenjem ovakvih mutanata, omogućena je identifikacija većeg broja jedinjenja sa inhibitornim efektom u početnim fazama ispitivanja lekova (Kolaczkowski et al. 1998).

Već opisane osobenosti kvasca kao model sistema u testiranju potencijalnih terapeutika, čine ga idealnim za istraživanje novih antifungalnih lekova. Zbog visokog stepena homologije sa proteinima učesnicima u osnovnim signalnim putevima u sisarskoj ćeliji, posebno je podoban za testiranje potencijalnih hemoterapeutika čiji je nivo delovanja modulacija signalnih puteva.

CILJ RADA

2. CILJ RADA

Cilj ovog rada je ispitivanje mogućnosti korišćenja ćelija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* kao odgovarajućeg sistema biološkog eseja praćenja ćelijske vijabilnosti i proliferacije u visoko i ultra visoko automatizovanim uslovima. U okviru rada ispitano je delovanje malih molekula na ćelijski rast i razmnožavanje *S. cerevisiae* malih molekula Novartisovih kolekcija, kao i izdvajanje onih koji će se dalje koristiti za ispitivanje njihovog delovanja na signalne puteve u eukariotskim ćelijama humanog ili fungalnog porekla. Radi sagledavanja različitih fizičkih aspekata koji mogu uticati na osetljivost i reproducibilnost metoda za praćenje ćelijskog rasta u mikrovolumenu kulture kvasca definisani su sledeći zadaci:

1. Ispitivanje efekta različitih parametara na rast kulture kvasca u mikrotitarskim pločama sa 384 i 1536 bunarčića i na kvalitet alamarBlue® eseja kao i osetljivost ovog eseja da detektuje inhibitorni potencijal malih molekula u ultra visoko automatizovanim uslovima.
2. Ispitivanje uticaja različitih parametara na rast kulture u mikrotitarskim pločama sa 96, 384 i 1536 bunarčića i na kvalitet testa zasnovanog na merenjem optičke gustine suspenzije kvasca.
3. Komparacija osetljivosti razvijenih testova na osnovu inhibitorne koncentracije 50% (IC₅₀) dobijene u navedenim testovima.
4. Ispitivanje raznolikosti delovanja jedinjenja dobijenih primarnim testiranjem korišćenjem haplodeficijentnih sojeva kvasca.
5. Ispitivanje načina delovanja aktivnih jedinjenja sa citostatskim i antifungalnim dejstvom korišćenjem haplodeficijentnih sojeva kvasca.

MATERIJAL I METODE

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

3.1.1. Sojevi kvasca

Za razvoj eseja korišćeni su sledeći diploidni sojevi kvasca konstruisani jednostavnom metodom ukrštanja dva haploidna soja (Guthrie and Fink, 1991). Sojevi korišćeni u ovom radu su auktotrofi za sledeće faktore rasta: leucin, histidin i uracil

Divlji soj (wt) za *PDR5/PDR5* i *SNQ2/SNQ2* gene

Markeri: *MATa/α ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 met15/MET15 lys2/LYS2* (4741/4742)

Nastao ukrštanjem haploidnih sojeva (Invitrogen):

BY4741 *MATa his3 leu2 met 15*

BY4742 *MATa his3 leu2 ura3*

pdr5 (pdr5/pdr5) mutant

Markeri: *a/alpha ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 met15/MET15 lys2/LYS2 pdr5::kanMX/ pdr5::kanMX*

Nastao ukrštanjem haploidnih sojeva (Invitrogen):

BY4741 *pdr5::kanMX*

BY4742 *pdr5::kanMX*

pdr5snq2 (pdr5snq2/ pdr5snq2) mutant

Markeri: *a/alpha ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 met15/MET15 lys2/LYS2 pdr5::kanMX/ pdr5::kanMX snq2::natMX/ snq2::natMX*

Nastao ukrštanjem haploidnih sojeva (Invitrogen):

BY4741 *MATa his3 leu2 met15 pdr5::kanMX snq2::natMX*

BY4742 *MATa his3 leu2 ura3 pdr5::kanMX snq2::natMX*

Za haplodeficijentnu metodu je korišćena komercijalno dostupna diploidna kolekcija sojeva kojima nedostaje jedna kopija istog gena (OpenBiosystems, Kat. Broj: YSC1055)

3.1.2. Hranljive podloge i rastvori

Bogati medijum (YPD)

Ekstrakt kvasca	(Difco)	10 g/L
Pepton	(Difco)	20 g/L
Bacto Agar	15 g/L (za ploče)	
H ₂ O		900 mL

Autoklavirati 20 min na 121°C, ohladiti ispod 70°C i dodati

20% glukoze	100 mL
-------------	--------

U bogatu podlogu za pripremanje kolekcije haplodeficijentnih sojeva kvasca je dodato 1 mL 200 mg/mL G148 stok rastvora.

Minimalni medijum (SD) + faktori rasta (Uracil, Leucin, Histidin)

Azotna baza za kvasce bez aminokiselina	(Difco, Kat. Broj: 291940)	6,7 g/L
H ₂ O		600 mL

Autoklavirati 20 min at 121°C, ohladiti ispod 70°C i dodati

20% glukoze	100 mL
-------------	--------

Uracil (100 x stok)

Uracil	(Sigma, Kat. Broj: U-1128)	200 mg
Destilovana H ₂ O		100 mL

*Rastvor sterilisan filtracijom (0,2 µm filter, Milipor)

Za potrebe eksperimenta rastvor je razblažen 100 x u medijumu (10 mL = 20 mg/L).

Histidin (100 x stok)

Histidin (Sigma, Kat. Broj: H-9511)	200 mg
Destilovana H ₂ O	100 mL

*Rastvor sterilisan filtracijom (0,2 µm filter, Milipor)

Za potrebe eksperimenta rastvor je razblažen 100 x u medijumu (10 mL = 20 mg/L).

Leucin (100 x stok)

Leucin (Bio101, Kat. Broj: 4060-522)	1000 mg
Destilovana H ₂ O	100 mL

*Rastvor sterilisan filtracijom (0,2 µm filter, Milipor)

Za potrebe eksperimenta rastvor je razblažen 100 x u medijumu (10 mL = 100 mg/L).

20% glukoza (10 x stok)

Glukoza (Difco, Kat. Broj:215520)	200 g
Destilovana voda	do 1000 mL

* Rastvor sterilisan filtracijom (0,2 µm filter, Milipor)

Fosfatni pufer za alamarBlue® rastvor

Fosfatni pufer se sastoji od kalijum di-hidrogen fosfata (KH₂PO₄ - Sigma, Kat. Broj: P-8709) i kalijum mono-hidrogen fosfata (K₂HPO₄ - Sigma Kat. Broj: P-8584). Variranjem količine komponenti rastvora (fosfatnih soli) puferi se mogu pripremiti u opsegu od pH 5,8 do pH 8,0.

1 M K₂HPO₄

K ₂ HPO ₄ (Mol. Masa 174,18)	174 g
Destilovana voda	do 1.000 mL

1 M KH₂PO₄

KH ₂ PO ₄ (Mol. Masa 136,09)	136 g
Destilovana voda	do 1.000 mL

20 mM Rapamicin

Rapamicin (Mol. Masa 914,17)	182 mg
Destilovana voda	do 10 mL

20 mM Cikloheksamid

Cikloheksamid (Mol. Masa 281,35)	56 mg
Destilovana voda	do 10 mL

200 mg/mL Geneticin (G148) stok (1000 x stok)

Geneticin (G148)	5 g
Destilovana voda	do 25 mL

Sterilisati filtriranjem (filter promera 0,2 μm , Milipor), zaštititi od svetla aluminijumskom folijom u čuvati na +4°C.

AlamarBlue® rastvor

AlamarBlue® 100% rastvor (AlamarBlue®, Biosource Europe SA).

3.1.3. Rastvori za izvođenje lančane reakcije polimeraze i hibridizacije**Uzvodni barkod oligonukleotidi – mix**

Uzvodni (Uptag) i Buptagkanmx4 oligonukleotidi (prajmeri) su rastvoreni u destilovanoj vodi u koncentraciji 100 pmol/ μL i pomešani u odnosu 1:1. Obzirom na to da se gornji prajmeri takođe koriste u procesu hibridizacije, pripremljena je količina dovoljna za oba postupka i čuvana na -20°C.

Nizvodni barkod oligonukleotidi - mix

Nizvodni (Dntag) i Bdntagkanmx4 oligonukleotidi (prajmeri) su rastvoreni u destilovanoj vodi u koncentraciji 100pmol/ μL i pomešani u odnosu 1:1. Obzirom na to da se donji prajmeri takođe koriste u procesu hibridizacije, pripremljena je količina dovoljna za oba postupka i čuvana na -20°C.

B213 oligonukleotidi

B213 oligonukleotidi su rastvoreni u destilovanoj vodi u koncentraciji 100 pmol/ μ L. Rastvor je čuvan -20°C i korišćen za pripremu 1 fmol/ μ L finalnog rastvora.

Mešavina oligonukleotida

Rastvoren je svaki od 8 oligonukleotida u destilovanoj vodi u koncentraciji 100 pmol/ μ L za svaki oligonukleotid: Uptag, Dntag, Zptagkanmx, Dntagkanmx, Uptagcomp, Dntagcomp, Upkncomp, Dntagcomp. Oligonukleotidi su pomešani da budu u finalnoj koncentraciji od 12,5 μ M/ μ L i čuvani na -20°C.

Oligonukleotidi (Integrated DNA Technologies)

Ime	Sekvenca	količina*
1. B213 kontrola	5' biotin-CTG AAC GGT AGC ATC TTG AC-3'	0,3 fmol
2. Bupkanmx4	5' biotin-GTC GAC CTG CAG CGT ACG-3'	60 pmol
3. Bdnkanmx4	5' biotin-GAA AAC GAG CTC GAA TTC ATC G-3'	60 pmol
4. Uptag	5'-GAT GTC CAC GAG GTC TCT-3'	150 pmol
5. Dntag	5'-CGG TGT CGG TCT CGT AG-3'	150 pmol
6. Uptagkanmx	5'-GTC GAC CTG CAG CGT ACG-3'	90 pmol
7. Dntagkanmx	5'-GAA AAC GAG CTC GAA TTC ATC G-3'	90 pmol
8. Uptagcomp	5'-CTA CAG GTG CTC CAG AGA-3'	90 pmol
9. Dntagcomp	5'-GCC ACA GCC AGA GCA TC-3'	90 pmol
10. Upkancomp	5'-CAG CTG GAC GTC GCA TGC-3'	90 pmol
11. Dnkancomp	5'-CTT TTG CTC GAG CTT AAG TAG C-3'	90 pmol

* Finalna koncentracija u eksperimentu

Napomena: Oligonukleotidi korišćeni za hibridizaciju (od broja 6-11) nisu komplementarni ni jednoj probi u mikročipu ali su dodati da spreče povezivanje uzvodnih i nizvodnih TAG produkata nakon njihovog topljenja. Bez prisustva gore pomenutih oligonukleotida nekomplementarne TAG se mogu hibridizovati preko zajedničkih sekvenci u njihovim oligonukleotidnim sekvencama (prajmerima), korišćenim za lančanu reakciju

polimeraze, formirajući delimično jednolančane produkte. Oligonukleotidi komplementarni standardnim prajmerima (od broja 2-5) su takođe dodati da bi se sprečilo formiranje ovakvih produkata, a sa ciljem da se TAG sekvence bolje izlože hibridizaciji.

Uloga B213 kontrolne oligonukleotidne sekvence je vezivanje za ivične probe u mikroereju, a koristi je Afimetriks softver za automatsko izračunavanje granice proba.

5 M NaCl

NaCl (Mol. Masa 58,44)	58,4 g
Destilovana voda	do 200 mL

Rastvor je čuvan na sobnoj temperaturi (18 – 25°C).

0,5 M EDTA

EDTA	7,3 g
Destilovana voda	do 50 mL

Rastvor je čuvan na sobnoj temperaturi (18 – 25°C).

10% (vol/vol) Tween Mix

Tween 20	2 mL
Destilovana voda	18 mL

Čuvati na 4°C

1% (vol/vol) Tween Mix

Tween 20	10 mL
Destilovana voda	990 mL

Čuvati na 4°C

12 x MES stok

MES (Sigma, Kat. Broj: M5287)	0,70 g
MES natrijumova so (Sigma, Kat. Broj: M5057)	1,9 g
Destilovana voda	do 10 mL

pH vrednost je podešena na 6,5 i 6,7 sa pH metrom

Rastvor je zaštićen od svetla aluminijumskom folijom i čuvan na +4°C, a korišćen dok ne poprimi žutu boju ili maksimalno mesec dana.

2 x Hibridizacioni pufer

12 x MES rastvor	8,3 mL
5 M NaCl (Sigma, Kat. Broj: S9888)	17,7 mL
0,5 M EDTA (Bio-Rad, Kat. Broj: 161-0729)	4,0 mL
10% Tween 20 (vol/vol)	0,1 mL
Sterilna destilovana voda	9,9 mL

Rastvor je sterilisan filtracijom (0,2 µm filter, Milipor) da bi se uklonile čestice prašine koje mogu uticati na proces skeniranja. Nakon pripreme rastvor je zaštićen od svetla aluminijumskom folijom i čuvan na +4°C, a korišćen dok ne poprimi žutu boju ili maksimalno mesec dana (vidi MES rastvor).

Rastvor za ispiranje A

20 x SSPE (saline-sodium phosphate-EDTA), (Sigma, cat. no. S2015)	300 mL
10% Tween (vol/vol) (Sigma, cat. no. T2700)	1 mL
Sterilna destilovana voda	699 mL

Rastvor je sterilisan filtracijom (0,2 µm filter, Milipor) da bi se uklonile čestice prašine koje mogu uticati na proces skeniranja.

Rastvor za ispiranje B

20 x SSPE (saline-sodium phosphate-EDTA), (Sigma, cat. no. S2015)	150 mL
10% Tween (vol/vol)	1 mL
Sterilna destilovana voda	849 mL

Rastvor je sterilisan filtracijom (0,2 µm filter, Milipor) da bi se uklonile čestice prašine koje mogu uticati na proces skeniranja.

Denhardt-ov rastvor (50 x koncentrovani) - Sigma, Kat. Broj: D-2532

3.1.4. Mikrotitarske ploče

Ploče sa 96 bunarčića

96 polistirenske ploče sa ravnim dnom, crnih zidova, sa poklopcem, kapaciteta 300 μ L, Matrix, Kat. Broj: 4927

Ploče sa 384 bunarčića

Za merenje optičke gustine su korišćene polistirenske ploče sa ravnim dnom, crnih zidova sa poklopcem, kapaciteta 120 μ L, NUNC, Kat. Broj: 142761.

Za alamarBlue® esej su korišćene polistirenske ploče sa ravnim crnim dnom Greiner, Kat. Broj: M3686-40EA.

Ploče sa 1536 bunarčića

Za alamarBlue® esej su korišćene Polistirenske GNF ploče sa 1536 bunarčića (Greiner, Kat. Broj: 792176). Za merenje optičke gustine korišćene su polistirenske GNF -FLIPR ploče sa providnim dnom, (Greiner, Kat. Broj: 789092).

Ploče sa 24 bunarčića

Za HIP esej su korišćene ploče sa 24 bunarčića (Greiner, Kat. Broj: 662102)

Duboke ploče sa 96 bunarčića:

Za izolaciju genomske DNK korišćene su duboke ploče sa 96 bunarčića zapremine 2,2 mL (Abgene, Kat. Broj: AB-0932)

Ploče za gajenje kolekcije heterozigotnih sojeva kvasca

Nunc Omni ploče (Nunc, Kat. Broj 62409-600) za pripremanje YPD agaroznog medijuma
Lepljiva folija (ABgene, Kat. Broj: AB-0580) za zaštitu glicerolnih stokova kvasca u mikrotitarskim pločama sa 96 bunarčića.

3.1.5. Instrumenti

CyBi well automatski pipetor

Za prenošenje kolekcije jedinjenja iz ploča sa 384 bunarčića na ploču sa 1536 bunarčića korišćen je CyBi well automatski pipetor (Slika 7).

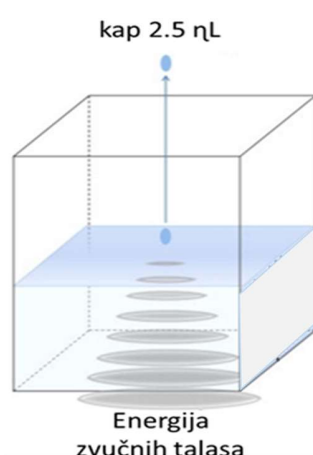
Prednost korišćenja CyBi pipetora je da može da:



- umnožava uzorke u pločama istog formata (96→96; 384→384 ili 1536→1536 bunarčića).
- prebacuje uzorke iz manjeg formata u ploče višeg formata (4 ploče 96 bunarčića u 1 ploču od 384 bunarčića ili 4 ploče od 384 bunarčića u 1 ploču od 1536 bunarčića).

Slika 7. CyBi well automatski pipetor (CyBio)

Echo akustični dispensor:



Za nanošenje jedinjenja na ploču za testiranje korišćen je Echo 550 (Labcyte,) akustični dispensor. Izvorna ploča sa jedinjenjima je postavljena naspram ciljne ploče za izvođenje eseja, a jedinjenja su prebacivana pod dejstvom zvučnih talasa. Intenzitet zvučnog talasa odgovara količini tečnosti izbačenoj ka bunarčiću ciljne ploče (Slika 8).

Slika 8. Princip rada Echo 550 akustičnog dispensora (preuzeto iz Templitsky i sar. 2015)

Multidrop automatski pipetor

Koristio se za pipetiranje početne kulture kvasca u ploče sa 96 ili 384 bunarčića (Slika 9)



Slika 9. Multidrop pipetor Thermo Scientific, Type: 836 (levo) i Genetix Aliquot (desno)

Genetix Aliquot dispenser

Koristio se za nanošenje početne kulture kvasca u ploče sa 1536 bunarčića (slika 9, levo).

Inkubatori

Ploče sa kolekcijom jedinjenja (2 mM razblaženje u 90% DMSO), dobijene iz Novartisove arhive, su čuvane u Liconic StoreX1000 inkubatoru u uslovima smanjene vlažnosti (~ 10% relativna vlažnost) na 10°C.

Ploče za izvođenje eseja, sa alikvotiranim hemijskim jedinjenjima, su čuvane u između 4-20 sati ili u vlažnoj kutiji (Sanko Plastic) ili u Liconic StoreX500 inkubatoru u uslovima visoke vlažnosti (~ 95% relativna vlažnost) na 4°C.

Ćelije zasejane u pločama sa 96 i 384 bunarčića su gajene u inkubatoru na 30°C uz konstantnu aeraciju. Ćelije u pločama sa 1536 bunarčića su gajene u Liconic Store X500 inkubatoru za ćelijsku kulturu u uslovima visoke vlažnosti (~ 95% relativna vlažnost) na 30°C, bez prisustva CO₂ uz povremenu aeraciju.

Viewlux 1430 multičitač (PerkinElmer)

Fluorescentni signal redukovanog alamarBlue® (resazurina) se merio Viewlux 1430 multičitačem (PerkinElmer) koristeći ekscitaciju na 525 nm i emisiju na 598 nm.

Za merenje optičke gustine u pločama sa 96, 384 i 1536 bunarčića se koristio Envision multičitač (PerkinElmer) sa filterom of 665 nm ili 850 nm. Gustine kultura su merene na 600 nm u Eppendorf biofotometru.

3.2. Metode

3.2.1. Priprema jedinjenja za testiranje

Jedinjenja iz Novartisove kolekcije, stok koncentracija 2 mM u 90% DMSO su čuvana u kontrolisanim uslovima na 10°C, u 10% relativne vlažnosti, da bi se sadržaj vode održao u istoj proporciji i sprečila precipitacija tokom dugotrajnog čuvanja (Engeloch et al., 2008). U primarnom testiranju jedinjenja su testirana samo jednom u koncentraciji od 20 µM (razblaženje 1:100 od 2 mM originalne koncentracije).

Za validacioni eksperiment i određivanje inhibitorne koncentracije 50% (IC₅₀), jedinjenja su testirana u triplikatu. Da bi se preciznije odredila IC₅₀ jedinjenja su razblažena kao što je prikazano na Tabeli 1.

Tabela 1. Početne i finalne koncentracije jedinjenja u validacionom testu Početno razblaženje	Finalno razblaženje (u eseju)
2.000 µM	20 µM
633 µM	6,33 µM
200 µM	2 µM
63 µM	0,633 µM
20 µM	0,2 µM
6,3 µM	0,063 µM
2 µM	0,020 µM
0,63 µM	0,0063 µM

3.2.2. Gajenje diploidnih wt i mutantnih sojeva *S. cerevisiae*

Iz glicerinskog stoka sa -80°C je uzeto na vrh sterilne eze uzorak kvasca, i zasejan na bogatu čvrstu hranjivu podlogu ili u bogati medijum (stok kultura) i inkubirano preko noći (u medijumu) ili do pojave kolonija (na čvrstoj hranjivoj podlozi). Čelije iz sveže kolonije (stare 3-7 dana) ili 2 μL stok kulture su prebačene, u zavisnosti od tipa eksperimenta, u bogati ili minimalni medijum i gajene preko noći na 30°C uz konstantnu aeraciju na 150 rpm. Za aeraciju kultura u (ultra) visoko automatizovanim uslovima se koristio V prepTM, (Agilent Velocity 11, Santa Clara CA, USA) ili Variomag šejker visoke brzine (Thermo Scientific Corp., Waltham MA, USA).

Brzina rasta kulture kvasca zavisi od tipa medijuma, temperature, soja, aeracije. Da bi se pratio rast kulture koristila se metoda merenja optičke gustine na 600 nm (OD_{600}).

3.2.3. Određivanje absorpcionog i transmisionog spektra hranljivih medijuma

Merenje optičke gustine je podložno uticaju obojenih komponenti prisutnih u hranljivom medijumu. U cilju određivanja optimalne talasne dužine, praćen je apsorpcioni i transmisioni spektar bogatog i minimalnog medijuma koji se koriste za gajenje ćelijskih kultura kvasca. Apsorpcioni i transmisioni spektar je meren spektrofotometrom Cary 50 (Varian INC. PaloAlto, USA), verzija 3.00, u opsegu talasnih dužina od 190 do 1.100 nm.

3.2.4. Merenje optičke gustine suspenzije kvasca

Tokom pripreme ćelija za eksperiment, optička gustina kulture kvasca je merena na 600 nm na Eppendorf biofotometru koristeći plastične kivete za jednokratnu upotrebu. Pre svakog merenja uređaj se kalibrisan blank kontrolom, 1 mL sterilnog medijuma koji se koristio za rast kulture kvasca. Zatim je 1 mL suspenzije kvasca uzet iz kulture i stavljen u kivetu, a optička gustina merena na talasnoj dužini od 600 nm. Da bi se minimizovao uticaj aparata na vrednosti optičkih gustina, za potrebe primarnog i validacionog testa se koristio isti uređaj.

3.2.5. Standardizacija alamarBlue® eseja u pločama sa 384 bunarčića

Za izvođenje eksperimenata u (ultra) visoko automatizovanim korišćene su sledeće kulture kvasca:

Stok kultura: Čelije kvasca uzete iz sveže kolonije gajene na bogatoj čvrstoj podlozi su zasejane u bogati ili minimalni medijum i inkubirane preko noći na 30°C uz aeraciju.

Kultura kvasca u log fazi: Uzorak stok kulture (1 mL) je prebačen u zavisnosti od eksperimenta) u 100 mL svežeg bogatog ili minimalnog medijuma (da bi se dobila gustina OD₆₀₀ 0,1) i gajene 30°C uz aeraciju na 150 rpm do dostizanja log faze, OD₆₀₀ 0,5-1,0.

Početna kultura kvasca: Iz kulture u log fazi su, u zavisnosti od eksperimenta, čelije su prebačene u svež minimalni ili bogati medijum i korišćene u eksperimentima za optimizaciju eseja.

Prekonoćna kultura kvasca: Početna kultura kvasca gajena na 30°C minimalno 16 sati.

3.2.5.1. Uticaj pH vrednosti i dužine inkubacije alamarBlue® na jačinu fluorescentnog signala

U cilju određivanja optimalne pH vrednosti za razvoj fluorescentnog signala početna kultura wt soja kvasca gustine OD₆₀₀ 0,01 u minimalnom medijumu je nanošena Multi drop dispensorom po 12 µL/bunarčiću. Kvasac je gajen 16 sati na 30°C u uslovima visoke vlažnosti nakon čega je dodato 6 µL 2,8% alamarBlue® u 150 mM fosfatnom puferu sa različitim pH vrednostima pH 5,9, pH 6,4, pH 6,9 i pH 7,4. Čelije su inkubirane 4 sata na 30°C, a fluorescentni signal je meren na svakih sat vremena.

3.2.5.2. Testiranje „samoredukujućeg efekta“ alamarBlue®

Eksperiment je izveden u prisustvu i odsustvu fosfatnog pufera na pH 5,9. Minimalni i bogati medijum su pomešani ili sa fosfatnim puferom pH 5,9 ili sa vodom u odnosu 3:1 u finalnom volumenu od 14 µL/bunarčiću. Različite koncentracije alamarBlue® (vidi Tabelu 3) su pipetirane automatskim Matrix pipetorom, a fluorescentni signal odmah meren Viewlux 1430 multičitačem.

3.2.5.3. *Određivanje optimalne gustine početne kulture*

Početna kultura wt soja kvasca gustine OD₆₀₀ 0,00004, 0,0001, 0,0002, 0,0003, 0,001, 0,0015, 0,004, 0,01, 0,015, 0,04, 0,1 u minimalnom medijumu je nanošena MultiDrop dispensorom po 12 µL/bunarčiću. Kultura je inkubirana 16 sati na 30°C u uslovima visoke vlažnosti. Nakon inkubacije u bunarčice je dodato 8 µL alamarBlue® u koncentracijama od 0,7% do 3% (Tabela 3) koristeći automatski Matrix pipetor (Kat. No: 2021, Thermo Scientific), a fluorescentni signal meren nakon 3 sata inkubacije

Tabela 3. Početna i finalna razblaženja alamarBlue® u 150mM fosfatnom puferu

Početno razblaženje alamarBlue® (%)	Finalno razblaženje alamarBlue® (%)
9	3
4,2	1,4
1,8	0,6
0,9	0,3
0,42	0,14
0,21	0,07

3.2.5.4. *Uticao pufera na razvoj fluorescentnog signala*

Početna kultura wt soja kvasca gustine OD₆₀₀ 0,01 u minimalnom medijumu je nanošena Multi drop dispensorom po 12 µL/ bunarčiću u ploču sa 384 bunarčića. Čelije kvasca su gajene 16 sati na 30°C uz aeraciju na 150 rpm, nakon čega je dodat almarBlue® u različitim koncentracijama (Tabela 2) pripremljenim u vodi ili 150 mM fosfatnom puferu pH 5,9. Florescentni signal je meren nakon 3 sata inkubacije.

Tabela 2. Početna i finalna razblaženja alamarBlue® u 150 mM fosfatnom puferu ili vodi

Početno razblaženje alamarBlue® (%)	Finalno razblaženje alamarBlue® (%)
33	11
21	7
6	2
4,5	1,5
2,1	0,7
0,6	0,2
0,45	0,15
0,18	0,06

3.2.6. Optimizacija alamarBlue® eseja u mikrotitarskim pločama sa 1536 bunarčića

3.2.6.1. Uticaj koncentracije alamarBlue® i pH vrednosti na jačinu fluorescentnog signala

Početna kultura wt soja kvasca optičke gustine OD₆₀₀ 0,01 je nanošena Genetix Aliquot dispensorom u volumenu od 6 µL/bunarčiću i gajena 16 sati preko noći na 30°C u uslovima visoke vlažnosti. Nakon inkubacije, u bunarčice je dodato po 2 µL alamarBlue® sledećih koncentracija: 24%, 12%, 6% i 3% u 200 mM fosfatnom puferu pH 5,9 i 6,4, a kultura inkubirana dodatnih 4 sata na 30°C, a fluorescentni signal je meren na svakih sat vremena.

3.2.6.2. Uticaj gustine početne kulture na razvoj fluorescentnog signala

U ploče sa 1536 bunarčića je najpre nanošeno 3 µL/bunarčiću medijuma. Zatim je dodato 3 µL/bunarčiću početne kulture wt soja kvasca optičkih gustina OD₆₀₀ 0,006, 0,012, 0,028, 0,056 OD₆₀₀ 0,02. Kvasac je gajen 16 sati na 30°C, nakon čega je dodato 2 µL/bunarčiću pufera sa različitim koncentracijama alamarBlue® (finalne koncentracija 0,75%, 1,5% i 3%). Fluorescentni signal je meren posle 3 sata inkubacije na istoj temperaturi.

Za procenu kvaliteta eseja se računala Z' vrednost koristeći formulu opisanu u poglavlju 3.2.5.2. (materijal i metode).

3.2.6.3. Uticaj DMSO na rast wt i mutantnih sojeva kvasca

U ploče sa 1536 bunarčića je najpre nanošeno 3 μ L/bunarčiću medijuma sa koncentracijama DMSO 1%, 2%, 3% i 4% (finalna koncentracija 0,5%, 1%, 1,5%, 2%). Zatim je dodato 3 μ L/bunarčiću početne kulture wt, *pdr5*, *pdr5snq2* sojeva kvasca optičke gustine OD₆₀₀ 0,02 (finalna koncentracija OD₆₀₀ 0,01). Kvasac je gajen 16 sati na 30°C, nakon čega je dodato 2 μ L/bunarčiću 6% alamarBlue® (finalna koncentracija 1,5%). Fluorescentni signal je meren posle 3 sata inkubacije na istoj temperaturi.

Kvalitet eseja je procenjen na osnovu računanja Z' vrednosti koristeći formulu opisanu u poglavlju 3.2.5.2. (materijal i metode).

3.2.6.4. Uticaj volumena ćelijske kulture i koncentracije DMSO na kvalitet eseja

Da bi ispitali uticaj količine hranljivog medijuma na kvalitet eseja, početne kultura *pdr5* soja kvasca gustine OD₆₀₀ 0,01 je gajena u smanjenom volumenu, umesto u 6 μ L, u 4 μ L/bunarčiću. U ploče sa 1536 bunarčića je najpre nanošeno 2 μ L/bunarčiću medijuma sa koncentracijama DMSO 1%, 2%, 3% i 4% (finalna koncentracija 0,5%, 1%, 1,5%, 2%). Zatim je dodato 2 μ L/bunarčiću početne kulture optičke gustine OD₆₀₀ 0,02 (finalna koncentracija OD₆₀₀ 0,01). Nakon 16 sati inkubacije dodato je 2 μ L/bunarčiću alamarBlue® u koncentracijama 1,5%, 3%, 6% i 12% u puferu pri pH 6,4, a fluorescentni signal meren nakon 3 sata inkubacije na 30°C.

3.2.6.5. Uticaj koncentracije DMSO na osetljivost na cikloheksamid

U ploče sa 1536 bunarčića je najpre nanošeno 40 nL cikloheksamida u 20 različitih koncentracija (dilucioni faktor 2:1) sa maksimalnom koncentracijom 10 μ M. Na ploče je nanoseno 2 μ L/bunarčiću minimalnog medijuma sa koncentracijama DMSO 1%, 2%, 3% i 4% (finalna koncentracija 0,5%, 1%, 1,5%, 2%). Zatim je dodato 2 μ L/bunarčiću početne kulture *pdr5* soja kvasca optičke gustine OD₆₀₀ 0,02 (finalna koncentracija OD₆₀₀ 0,01). Nakon 16 sati inkubacije dodato je 2 μ L/bunarčiću alamarBlue® (finalna koncentracija 1,5%), a fluorescentni signal meren nakon 3 sata inkubacije na 30°C.

3.2.6.6. Protokol za izvođenje alamarBlue® eseja u (ultra) visoko automatizovanim uslovima ploča sa 1536 bunarčića

Dan 1

Popodne: Čelije kvasca uzete iz glicerinskog stoka na -80°C su zasejane u 2 mL bogatog medijuma i gajene preko noći na 30°C uz aeraciju na 200 rpm.

U ploče za izvođenje eseja, u kolone od 1 do 45, je nanoseno 40 nL jedinjenja (jedno jedinjenje/bunarčiću) upotrebom Echo akustičnog dispenzora. Ploče su čuvane u StoreX500 hladnoj sobi na 4°C sa 99,5% relativne vlažnosti, do dodatka suspenzije kvasca (do 24 sata).

Dan 2

Prepodne: 250 µL prekonoćne kulture kvasca je prebačeno u 100 mL minimalnog medijuma i inkubirano na 30°C pri aeraciji od 150 rpm 4-6 sati (do dostizanja log faze OD₆₀₀ ~1,0).

Popodne: Optička gustina kulture je izmerena Eppendorf biofotometrom na talasnoj dužini 600 nm i razblažena do OD₆₀₀ 0,01. Pripremljene su tri početne kulture kvasca:

Kultura 1 (ukupno 1.000 mL) – Da bi se omogućilo ravnomerno nanošenje ćelija kultura kvasca je mešana na magnetnoj mešalici. U bunarčiće kolona 1 do 45 je nanoseno 4 µL/bunarčiću suspenzije kvasca korišćenjem Genetix Aliquot dispenzera sa glavom od 32 kanalića.

Kultura 2 – (500 mL kulture kvasca sa 1% DMSO) - U kolonu 46 je nanoseno 4 µL/bunarčiću suspenzije kvasca korišćenjem Genetix Aliquot dispenzera sa glavom od 32 kanalića (maksimalan rast kvasca).

Kultura 3 (500 mL kulture kvasca sa 100 µM cikloheksamida) – U kolone 47 i 48 je nanoseno 4 µL/bunarčiću korišćenjem Genetix Aliquot dispenzera sa glavom od 32 kanalića (maksimalna inhibicija).

Dan 3

Prepodne: nakon 16 sati gajenja ćelija kvasca na 30°C u uslovima visoke vlažnosti dodato je 2 µL/bunarčiću 4,5% alamarBlue® rastvorenog u 150 mM fosfatnom puferu pH 6,4 (finalno 50 mM fosfatni pufer, 1,5% alamarBlue®). Florescentni signal je meren nakon 3 sata inkubacije na 30°C koristeći Viewlux 1430 multičitač (Perkin Elmer) pri ekscitaciji na 525 nm i emisiji 598 nm.

3.2.7. Merenje ćelijskog rasta u kulturi

3.2.7.1. Određivanje osetljivosti EnVision 2100 multičitača u visoko automatizovanim uslovima

U cilju određivanja donje granice osetljivosti EnVision 2100 (Perkin Elmer) multičitača, merene su serije razblaženja suspenzije kvasca u minimalnom i bogatom medijumu.

U pločama sa 384 bunarčića: Početna kultura kvasca u opsegu gustina od OD₆₀₀ 0,4 do 0,0004 u bogatom odnosno OD₆₀₀ 1 do 0,001 u minimalnom medijumu je nanosena na mikrotitarske ploče sa 384 bunarčića u volumenu od 15, 20, 30 i 40 µL/bunarčiću.

U pločama sa 1536 bunarčića: Početna kultura kvasca optičke gustine OD₆₀₀ 0,012, 0,016, 0,045, 0,01, 0,18, 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2,2, 2,8 je nanosena na ploče sa 1536 bunarčića u volumenu od 2 µL, 4 µL, 6 µL i 8 µL/bunarčiću, a optička gustina je merena na 665 nm.

3.2.7.2. Efekat volumena i gustine početne kulture kvasca na njegov rast u pločama sa 96 i 384 bunarčića

Početna kultura *pdr5* soja kvasca gustine OD₆₀₀ 0,05, 0,1 i 0,2 je nanosena na ploče sa 96 bunarčića i gajena u volumenu od 100 i 150 µL/bunarčiću. Na isti način početna kultura kvasca je nanosena na ploče sa 384 bunarčića u volumenu od 30, 40 i 50 µL/bunarčiću. Kulture su inkubirane 12-13 sati na 30°C sa aeracijom. Da bi ćelijske kulture zaštili od potencijalne kontaminacije i evaporacije, ploče su zatvorene lepljivim propustljivim materijalom. Optička gustina je merena na svakih sat vremena EnVision multičitačem na talasnoj dužini od 665 nm.

3.2.8. Optimizacija eseja u pločama sa 1536 bunarčića

3.2.8.1. Efekat volumena kulture na kvalitet eseja

Prekonoćna kultura kvasca u minimalnom medijumu, a optičke gustine OD₆₆₅ ~2 je nanosena u mikrotitarsku ploču sa 1536 bunarčića u različitim zapreminama 2, 4, 6, 8 µL/bunarčiću. Za minimalni signal (B) korišćen je minimalni medijum bez prisustva ćelija.

Optička gustina merena PerkinElmer 2100 multičitačem. Dinamički odnos kao i Z' vrednost se izračunavao kao što je opisano u poglavlju 3.2.5. (materijal i metode).

3.2.8.2. *Merenje homogenosti maksimalnih i minimalnih vrednosti*

U nastavku eksperimenta, početna kultura *pdr5* soja kvasca gustine OD₆₀₀ 0,2 je gajena u 8 μ L/bunarčiću preko noći na 30°C bez prisustva vlažnosti u minimalnom medijumu. Kao maksimalna kontrola (S) koristila se optička gustina kulture gajene u prisustvu 1% DMSO, a kao minimalna kontrola (B) optička gustina kulture gajene u prisustvu 1% DMSO + 100 μ M cikloheksamida. Optička gustina je merena sledećeg dana na talasnoj dužini 665 nm.

3.2.8.3. *Merenje uticaja fizičkih faktora na rast kulture kvasca*

Za praćenje rasta *pdr5* soja kvasca u pločama sa 1536 bunarčića, korišćene su početne kulture gustine OD₆₀₀ 0,1 i 0,2. Kulture su gajene u 8 μ L/bunarčiću bogatog odnosno minimalnog medijuma u različitim uslovima:

- na 30°C pri konstantnoj aeraciji bez prisustva vlažnosti
- na 30°C sa aeracijom (svakih 2 sata po 5 sekundi), bez prisustva vlažnosti
- na 37°C, sa aeracijom na svakih dva sata po 5 sekundi i vlažnosti od 99,97%.
- na sobnoj temperaturi, sa aeracijom, bez prisustva vlažnosti

U dodatnom eksperimentu, početne kulture različitih gustina OD₆₀₀ 0,006 0,0125 0,021 0,05 i 0,1 u bogatom medijumu odnosno OD₆₀₀ 0,2, 0,1, 0,05, 0,025 u minimalnom medijumu su zasejane u volumenu od 8 μ L/bunarčiću i gajene na 30°C, u prisustvu vlažnosti, a optička gustina je merena svakih sat vremena na 665 nm u periodu od 18 sati. Prvih deset sati ćelije su gajene bez aeracije, a nakon toga kulture su aerisane po 5 sekundi svakih 2 sata upotrebom V prepTM, (Agilent Velocity 11, Santa Clara CA, USA), Variomag šejkera visoke brzine.

3.2.8.4. *Izračunavanje inhibitornog efekta 50% (IC₅₀) cikloheksamida i rapamicina*

Rapamicin i cikloheksamid su pripremljeni u seriji razblaženja u minimalnom i bogatom medijumu i naneseni 4 μ L/bunarčiću:

Rapamicin (stok rastvor): 10.000, 3.200, 1.000, 320, 100, 32, 5 nM

Cikloheksamid (stok rastvor): 20.000, 6.000, 2.000, 600, 200, 60, 20 nM

Početna kultura kvasca gustine OD_{600} 0,2 i 0,1 u bogatom medijumu, odnosno 0,4 i 0,2 u minimalnom medijumu je dodata u volumena 4 μ L/bunarčiću i inkubirana tokom 18 sati na 30°C u uslovima visoke vlažnosti na 99,7% uz aeraciju svakih dva sata na maksimalnoj frekvenciji po pet sekundi sa propustljivom adhezivnom trakom. Optička gustina je merena na 665 nm.

3.2.8.5. *Uticao DMSO na rast kvasca*

DMSO koncentracije 0,25%, 0,5%, 1%, 2%, 4%, 8%, 16% je pomešan sa minimalnim medijumom i nanesen 4 μ L/bunarčiću (finalnih koncentracija 0,125%, 0,25%, 0,5%, 1%, 2%, 4%, 8%). Zatim je dodata početna kulture kvasca gustine OD_{600} 0,02 (finalno OD_{600} 0,01) u volumenu 4 μ L/bunarčiću i gajena tokom noći 19 sati na 30°C u uslovima visoke vlažnosti (na 99,7%). Optička gustina je merena sledećeg dana na 665 nm.

U nastavku eksperimenta je praćen rast kulture kvasca pri različitim početnim razblaženjima u prisustvu i odsustvu 1% DMSO. U mikrotitarsku ploču je naneseo 4 μ L/bunarčiću minimalnog medijuma. Potom je dodato 4 μ L/bunarčiću početne kulture kvasca koje su zatim gajene u 8 μ L/bunarčiću sa početnim gustinama OD_{600} 0,32, 0,1, 0,032, 0,01, 0,0032, 0,001, 0,00032, 0,0001. Kulture su gajene tokom 19 sati na 30°C u uslovima visoke vlažnosti (na 99,7%), a optička gustina je merena sledećeg dana na 665 nm.

3.2.8.6. *Protokol za merenje inhibitorne koncentracije IC50 u ultra visoko automatizovanim uslovima*

Eksperiment je izveden u triplikatu, a odabrana jedinjenja su testirana u seriji od 8 razblaženja u opsegu od 20 μ M to 6,33 nM (materijal i metode, poglavlje 3.2.1.).

Dan 1

Prepodne: Oko 1mL suspenzije kvasca gajene preko noći (materijal i metode, poglavlje 3.2.2.) je prebačeno u 500 mL minimalnog medijuma i inkubirano uz aeraciju (150 rpm) na 30°C do dostizanja log faze (OD_{600} ~0,5).

Popodne: U mikrotitarske ploče su dodata razblaženja jedinjenja (80 nL) i čuvana do dalje upotrebe na 4°C u relativnoj vlažnosti 80%.

U ploče sa 1536 bunarčića sa providnim dnom, u kolonama 1 do 45, naneseo je 4 μL /bunarčiću minimalnog medijuma upotrebom Genetix Aliquot dispenzora. U bunarčiće u koloni 46 je dodato 4 μL /bunarčiću minimalnog medijuma sa 2% DMSO (za maksimalni rast kulture kvasca), a u bunarčiće u kolonama 47 i 48 medijum sa 200 μM cikloheksamidom (za maksimalnu inhibiciju rasta).

Zatim je pripremljena početna kultura gustine OD_{600} 0,2 i zasejana u volumena od 4 μL /bunarčiću (finalna gustina OD_{600} 0,1) upotrebom Genetix Aliquot. Optička gustina je merena EnVision multičitačem (Perkin Elmer) na 850 nm ($t_0 = 0\text{h}$).

Kultura kvasca je gajna na 30°C u uslovima visoke vlažnosti uz aeraciju (Variomag, Thermo Scientific Corp., Waltham MA, USA), 5 sekundi na maksimalnoj frekvenciji, na svaka dva sata.

Dan 2

Prepodne: Nakon 16 sati inkubacije optička gustina kulture kvasca je merena na talasnoj dužini od 850 nm ($t_{\text{finalno}} = 16\text{h}$).

3.2.9. Statističko određivanje kvaliteta eseja

Za standardizaciju eseja u visoko automatizovanim uslovima je neophodno odrediti odnos vrednosti signala koji je dovoljno širok da omogući pouzdanu detekciju aktivnog jedinjenja.

3.2.9.1. Određivanje odnosa između maksimalnog i minimalnog signala

Da bi se dobila jedinjenja sa jasnom biološkom aktivnošću neophodno je dizajnirati esej kojim se može jasno uočiti njihov efekat u odnosu na neaktivna jedinjenja. Što je između maksimalnog (eng. *signal* - S) i minimalnog (eng. *basal* – B) signala veći dobijeni rezultati su precizniji. Odnos između maksimalnog i minimalnog signala se izračunava na sledeći način:

$$S/B = \frac{\text{srednja vrednost (S)}}{\text{srednja vredost (B)}}$$

Za S vrednost se koristi prekonocna kultura kvasca u hranjivom medijumu u prisustvu 1% DMSO, a za B prekonocna kultura kvasca u prisustvu 100 μ M Cikloheksamida ili hranjivi medijum bez prisustva celija.

3.2.9.2. Izracunavanje Z' vrednosti

Za što preciznije odredivanje kvaliteta eseja u (ultra) visoko automatizovanim uslovima uzima se u obzir dinamički odnos (razlika između S i B) kao i prisutna varijabilnost u maksimalnom i minimalnom signalu. Razlika između S i B takođe pruža informaciju o reproducibilnosti eseja.

Standardni parametar za odredivanje kvaliteta eseja je Z' vrednost (Zhang et al., 1999) koji se kreće u opsegu od 0 do 1, a računa se na sledeći način:

$$Z' = 1 - \frac{3 \times \text{StDEV} (S) + 3 \times \text{StDEV} (B)}{\text{Srednja vrednost} (S) - \text{Srednja vrednost} (B)}$$

Za odredivanje Z' vrednosti, kao i za odredivanje dinamičkog odnosa S/B, koristila se:

- **Pozitivna kontrola** (Max. signal - S) - vrednosti maksimalnog rasta celija u prisustvu 1% DMSO.
- **Negativna kontrola** (Min. signal - B) - maksimalna inhibicija celijskog rasta u prisustvu 100 μ M cikloheksamida.
- **Standardna devijacija** (StDEV) - stepen varijabilnosti rezultata u pozitivnoj, odnosno minimalnoj kontroli.

Kvalitet eseja na osnovu računanja Z' vrednost se tumači na sledeći način:

$Z' = 1$	predstavlja idealan esej
$Z' \geq 0,5$	veoma dobar esej (jasna razlika između S i B signala)
$0,5 > Z' > 0$	osrednji esej (mali dinamički odnos između S i B)
$Z' = 0$	Ne postoji razlika između S i B (varijabilnost S i B vrednosti se dodiruju)
$Z' < 0$	Ne postoji razlika između S i B (varijabilnost S i B vrednosti se preklapaju)

Z' vrednosti u ultra visoko automatizovanim uslovima (sa više od 100 ploča po danu), zbog mogućih variranja uslova pod kojim se esej izvodi, izračunavane su za svaku ploču pojedinačno.

3.2.10. Obrada podataka

Rezultati dobijeni primarnim i validacionim testiranjem su pohranjeni u Novartisovu bazu podataka i analizirani interno razvijenim softverskim „Helios“ programom.

3.2.10.1. Normalizacija rezultata u primarnom i validacionom testu

Za potrebe obrade podataka dobijenih primarnim ili validacionim testiranjem potrebno je bilo normalizovati rezultate (jačine fluorescentnog signala ili intenziteta propuštene svetlosti) testiranih jedinjenja. Zbog toga je inhibitorski efekat jedinjenja predstavljen u odnosu na maksimalne (S) i minimalne (B) kontrole na nivou same ploče, a procenat kontrole (PK) računao se pomoću sledeće formule:

$$PK [\%] = 100 * \frac{\text{Uzorak} - S}{S - B}$$

PK vrednost se kreće od 0 do -100%.

-100% - Maksimalni inhibitorski efekat (najniži procenat kontrole)

0 % - Minimalni inhibitorski efekat (najviši procenat kontrole).

PK vrednosti iznad 0 mogu biti posledica stimulatornog efekta jedinjenja na rast kvasca, ali i rezultat fizičkih karakteristika samog jedinjenja (npr. fluorescencije ili obojenosti).

3.2.10.2. Kriterijum za određivanje aktivnih jedinjenja u primarnom testu

Za određivanje aktivnih jedinjenja u primarnom testu bilo je potrebno koristiti pristup koji omogućava njihovo jasno razdvajanje od neaktivnih jedinjenja. U tu svrhu se računala granična vrednost (GV) za svaku ploču.

$$GV = \mu_s - 3 \times \text{StDEV}$$

Granična vrednost je parametar koji se dobija izračunavanjem srednje vrednosti ukupnog broja ispitivanih jedinjenja (μ_s) po ploči umanjene za njene tri standardne devijacije ($3 \times \text{StDEV}$).

Ispod tih vrednosti, verovatnoća dobijanja lažno pozitivnih rezultata, pod uticajem varijabilnosti samog testa je veoma mala (Pommereau, 2004; Sui Y. and Wu Z., 2007).

Pored granične vrednosti koristio se i dodatni kriterijum – inhibicija rasta kulture kvasca ispod -50%. Ukoliko je inhibitorna aktivnost bila ispod granične vrednosti ili ispod -50% jedinjenje se smatralo “pravim” inhibitorom.

3.2.11. *Analiza rezultata u validacionom eksperimentu*

U validacionom eksperimentu se određivala inhibitorna koncentracija 50% (IC_{50}) kroz merenje fluorescentnog signala i optičke gustine. Na osnovu jačine inhibicije rezultati su svrstani u tri kategorije:

- Kategorija I, $IC_{50} < 10 \mu\text{M}$ u oba eseja (jaki inhibitori).
- Kategorija II, $IC_{50} < 20 \mu\text{M}$ u oba eseja (slabiji inhibitori ali sa jasnim signalom).
- Kategorija III, $IC_{50} < 20 \mu\text{M}$ u jednom od eseja (slabi inhibitori, moguće lažno pozitívni signal u jednom od eseja).

Krive inhibitornih koncentracija su obrađene softverskim Helios programom koji je interno razvijen na Novartisovom institutu za biomedicinska istraživanja. Ovaj program se koristi za analizu i obradu rezultata dobijenih ispitivanjem aktivnosti jedinjenja u automatizovanim uslovima, a sa ciljem istraživanja novih lekova.

Za svako jedinjenje je određena IC_{50} vrednost sa donjim i gornjim nivoom koeficijenta poverljivosti 95% LCL95 i UCL95. Efekat jedinjenja je predstavljen u odnosu na vrednosti internih kontrola (S i B) u svakoj ploči kao sto je opisano u poglavlju 3.2.10.1. Maksimalni i minimalni inhibitorni efekat predstavlja najjaču i najmanju inhibiciju u opsegu testiranih razblaženja (od 6,3 nM do 20 μM).

Kvalitet softverski određene krive, koja prati efekat različitih koncentracija hemijskog jedinjenja sa ciljem određivanja IC_{50} , je praćen kroz SQRT (CHISQ/DF)

vrednosti koje odgovaraju standardnoj devijaciji, veće $\text{SQRT}(\text{CHISQ}/\text{DF})$ ukazuju na prisustvo vrednosti izvan očekivanog opsega (eng. *outlayers*)

Pored vrednosti dobijenih analizom u Helios programu, rezultati (krive inhibicije) su pregledani i vizuelno, nakon čega su se jedinjenja odabirala za dalja istraživanja.

3.2.12. **Esej haplodeficijentnog profilisanja**

Metoda haplodeficijentnog profilisanja – HIP (eng. Haplo Insufficiency Profiling) se koristila za karakterizaciju ćelijskog odgovora kao i njegovih komponenti kroz specifično delovanje bioaktivnih molekula.

3.2.12.1. **Priprema početnog stoka kvasca za haplodeficijentno profilisanje**

Početni stok svih heterozigotno deletiranih sojeva *Saccharomyces cerevisiae* (YSC1055, Open Biosystems) je pripremljen po metodi Pierce i sar. (2007).

Ploče sa 96 bunarčića sa originalnim glicerolnim stokovima pojedinačnih sojeva su otopljeni na sobnoj temperaturi, a uzorci ćelija uzimani pomoću nosača sa 96 sterilnih metalnih nastavaka i nanošeni na Nunc Omni Tray ploče sa 50 mL agar sa bogatim medijumom + 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418. Nosači su ostavljani na agaru 5-10 sekundi da bi se ćelije kvasca što bolje upile u agar. Sterilizacija metalnih nastavaka je bila neophodna pre svakog nanošenja, metalni nastavci su potapani u 70% etanol, a zatim sterilisani plamenom, postupak je ponavljan dva puta da bi se eliminisala mogućnost kontaminacije. Ploče sa kvascima su inkubirane 2-3 dana u termostatu na 30°C. Kada su kolonije dostigle svoj maksimalni rast ploče su stavljene na +4°C i pregledane da bi se utvrdio intenzitet rasta svih sojeva. U slučaju izostanka rasta ili sporog rasta određenog soja, ponovo je uziman uzorak ćelija iz glicerolnog stoka, zasejan na ploču sa bogatom i gajen kao što je prethodno opisano.

Ukupna količina ćelija sa svih ploča je prikupljena u plastične tube kapaciteta 50 mL sa sterilnim bogatim medijumom + G148. Čvrsta hranljiva podloga sa bogatim medijumom i preostalim ćelijama je pažljivo isprana sa 12 mL bogatog medijuma, medijum resuspendovan pipetiranjem, a zatim prebačen u plastičnu tubu. U slučaju spororastućih sojeva dodato je više ćelijskog materijala da bi se postigla slična zastupljenost u odnosu na ostale sojeve kvasca. Ćelije svih sojeva su spojene zajedno, suspenzija centrifugirana na

500g 2 minuta, a ćelije zatim resuspendovane na sobnoj temperaturi do finalne gustine 5 OD₆₀₀/mL.

Pre izvodjenja haplodeficijentnog profilisanja bilo je neophodno utvrditi učestalost prisutnosti svakog pojedinačnog soja. Sa tim ciljem uzorak ćelija iz početnog stoka je uzgajan u bogatom medijumu kao što je opisano u poglavlju 3.3.7.1. (materijal i metode). Nakon 20 vremena generacije ćelije su prikupljene, a njihova DNK izolovana kao što je opisano u poglavlju 3.3.7.2. DNK je umnožena kao što je opisano u poglavlju 3.3.7.3. a zatim hibridizovana kao što je opisano u poglavlju 3.3.7.4. Mikroerej analizama je pokazano da je u početnom stoku moguće detektovati 5796 od ukupno 5910 sojeva (98%). Alikvoti početnog stoka su korišćeni za dalja istraživanja kao što je opisano u narednim poglavljima.

3.2.12.2. *Kompetitivno uzgajanje kulture kvasca*

HIP metoda se izvodila u titracionoj ploči sa 24 bunarčića kapaciteta 1600 µL/ bunarčiću u bogatom hranljivom medijumu. Ispitivana jedinjenja su testirana u duplikatu u okviru iste ploče pri inhibitornoj koncentraciji približno 30% (IC₃₀): skvalestatin (~13,63 µM), nokodazol (~8,5 µM), aureobazidin (~3,2 µM), rapamicin (~0,001 µM), reveromicin (~200 µM), konkanamicin (~0,1 µM), FR171456 (~0,2 µM), rokoglamid (~8 µM), NGx04 (~8 µM) u prisustvu pozitivnih (Benomyl) i negativnih kontrola (samo bogati hranljivi medijum) u visokoautomatizovanim uslovima kao što je već opisano (Hoepfner et al., 2014). U ploče sa 24 bunarčića sa bogatim medijumom sa ili bez prisustva ispitivanog hemijskog jedinjenja je dodato 100 µL prekončne kulture kvasca gustine 1,5 OD₆₀₀/mL (~250 ćelija /soju kvasca). Kulture su inkubirane 16 sati na 30°C uz konstantno trešenje na 550rpm u robotičkom inkubatoru da bi se ćelijska populacija 5 puta udvostručila - generacijsko vreme (generacija 1-5). Približno ~250 ćelija/soju (120 µL kulture optičke gustine 1,2 OD₆₀₀/mL je prebačeno u nove ploče sa već pripremljenim bogatim medijumom u priustvu/odsusvu ispitivanog jedinjenja, a koje su pre upotrebe inkubirane pola sata na 30°C. Prvi set ploča je prebačen na +4°C unutar robotičkog sistema. Nove ploče sa zasejanom kulturom ćelija su inkubirane 16 sati na 30°C uz tresenje na 550rpm do postizanja 5 vremena generacije (generacija 6-10), a zatim prebačene na 4°C. Ista procedura je ponavljanja narednih 2 puta da bi se dobilo 20 generacija.

Tokom eksperimenta optička gustina OD₆₀₀ je konstantno merena, a krive rasta analizirane. Ukoliko je kriva inhibicije rasta veća od ~30% uzorci su isključivani iz dalje analize.

3.2.12.3. *Ekstrakcija genomske DNK*

Alikvoti ćelija gustine 5 OD₆₀₀ jedinica po bunarčiću iz HIP eksperimenta su raspoređeni u ploče sa 96 dubokih bunarčića, centrifugirani, a supernatant uklonjen. Genomska DNK je ekstrahovana upotrebom ChargeSwitch kit (Invitrogen, Kat. Broj: 1800) u polu automatizovanim uslovima. U svaki bunarčić je dodato 150 µL zimolaznog pufera (2U zimolaze, 50 ng RNAze A u 20 mM DTT i 20 mM Tris pH 7,5), a ćelije zatim inkubirane 45 minuta na 37°C uz konstantno trešenje na 700rpm. Nakon toga je dodato 300 µL/bunarčiću lizirajućeg pufera (L18, Invitrogen), a ploče sa uzorcima dodatno inkubirane 30 minuta na 56°C uz konstantno trešenje na 700rpm. Zatim je dodato 200 µL/bunarčiću hladnog precipitirajućeg pufera (N2, Invitrogen), a talog oboren centrifugiranjem na 4°C. Supernatant je prebačen u novu ploču sa 96 dubokih bunarčića veličine koja odgovara magnetnom nosaču (Invitrogen Magna Rack magnet), a u svaki bunarčić je dodatno 40 µL suspenzije sa ChargeSwitch magnetnih kuglicama. Ploča je inkubirana 5 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim dodatnih 5 minuta na magnetnom nosaču da bi se magnetne kuglice sa vezanom genomskom DNK istaložile na dno bunarčića. Kompletan supernatant je pažljivo uklonjen. Ploča sa istaloženim kuglicama je sklonjena sa magnetnog nosača, a 500 µL ispirajućeg pufera (W12, Invitrogen) je dodato u svaki bunarčić da resuspenduje magnetne kuglice. Postupak je ponovljen tri puta. Genomska DNK je resuspendovana pažljivim pipetiranjem u puferu za ekstrakciju (E6, Invitrogen), a magnetne kuglice istaložene na magnetnom nosaču tokom 5 minuta. Supernatant sa genomskom DNK je prebačen u nove ploče i čuvan na -20°C za dalje umnožavanje barkodova (TAG) lančanom reakcijom polimeraze i mikročip (GenFlex Tag16K v2) hibridizaciju.

3.2.12.4. *Umnožavanje jedinstvenih barkodova (TAG) lančanom reakcijom polimeraze*

Haplodeficientni sojevi koji su korišćeni u eseju poseduju jednu wt kopiju gena, dok je druga kopija zamenjena *KanMX* genom (G418 rezistentni marker). *KanMX4* gen je oivičen dvema jedinstvenim uzvodnim i nizvodnim sekvencama "barkodovima" veličine 20 baznih parova (bp). Barkodovi su oivičeni sa dva seta univerzalnih oligonukleotida koji su

zajednički za sve sojeve i omogućavaju njihovo umnožavanje iz DNK dobijene iz ukupne kulture ćelija tretirane ispitivanim jedinjenjem. Da bi se barkodovi umnožili, izvedena je lančana reakcija polimeraze za svaki barkod u 60 μL ukupne količine uzorka:

6 μL 10 x PCR pufera bez MgCl_2 (Invitrogen, Kat. Broj : 52724)

3 μL 50 mM MgCl_2 (Invitrogen, Kat. Broj: 52723)

1,2 μL 10 mM dNTPs (Invitrogen, Kat. Broj: 10297)

1,2 μL 50 mM donjeg ili gornjeg prajmer miksa

0,6 μL 5 U/mL Taq polimeraze (Invitrogen, Kat. Broj: 10342)

15 μL genomske DNK (količina od 15 μL sadrži približno 0,1 μg genomske DNK)

33 μL destilovane vode

60 μL

Lančana reakcija polimeraze je ponovljena 30 puta u termo-mašini sa poklopcem sa grejačem:

- 30 sekundi na 94°C
- 30 sekundi na 55°C
- 30 sekundi
- 3 minuta završena elongacija na 72°C

Na kraju reakcije temperatura je spuštena na 4°C, a produkt lančane reakcije polimeraze je sačuvan na 20°C.

3.2.12.5. *GeneFlex Tag16K v2 mikročip hibridizacija*

Svaki haplodeficijentni soj u kolekciji *Saccharomyces cerevisiae* je obeležen jedinstvenim barkodom. Merenjem njegove količine u mikročipu se određuje učestalost svakog haplodeficijentnog soja u ukupnoj kulturi ćelija čime se indirektno meri efekat ispitivanog jedinjenja. Za haplodeficijentno profilisanje hemijskih jedinjenja korišćeni su Genflex Tag 16K mikročipovi (Affymetrix, Kat. Broj: 511331).

Mikročip se najpre hidrirao u 90 μL 1 x hibridizacionog pufera, inkubacijom 10 minuta na 42°C sa rotacijom od 20rpm u hibridizacionoj retni (Affymetrix, Kat. Broj:

800138). Neposredno pre upotrebe je pripremano 60 μL /uzorku hibridizacionog rastvora (45 μL 2 x hibridizacionog pufera, 0,3 μL B213 kontrolnog oligonukleotida (1 fmol/ μL), 7,2 μL oligonukleotida (12,5 pmol/ μL), 1,8 μL 50 x Denhardtovog rastvora, 5,7 μL destilovane vode).

Za vreme ekvilibrisanja mikročipa, u plastičnu tubu zapremine 0,5 mL (0,5 ml plastična tuba sa sigurnim zatvaranjem marke Ependorf, Sigma, Kat. Broj: T8911) je dodato 40 μL produkta lančane reakcije polimeraze: 20 μL za uzvodnu i 20 μL nizvodnu barkod sekvencu i dopunjeno sa 60 μL hibridizacionog rastvora (totalna zapremina 100 μL za svaki barkod). Tube su dobro zatvorene sa sigurnonosnom plastikom (da bi se sprečilo izlivanje sadržaja) i inkubirane 2 minuta u kipućoj vodi. Zatim su prebačene na led, hladene dodatnih 2 minuta, a nakon toga kratko centrifugirane da bi se tečnost oborila na dno tube.

Iz predhodno pripremljenog mikročipa je uklonjen hibridizacioni pufer, a zatim dodato 90 μL uzorka. Na poklopac tube je zalepljen tanki plastificirani poklopac (Diversified Biotech, cat. no. TS-TNY) da bi se obeležila tuba i sprečilo isparavanje tečnosti. Hibridizacija je trajala 3-14 sati (u zavisnosti kada je započet eksperiment) na 42°C rotirajući mikročip brzinom od 20rpm. Zbog konsistentnosti rezultata dužina hibridizacije za uzorke iz istog eksperimenta je bila identična,

Ispiranje uzoraka je urađeno u GeneChip fluidnoj stanici 450 (Affymetrix, Kat. Broj: 00-0079). Neposredno pre upotrebe je pripremljeno 600 μL /uzorku biotin-obeležnog rastvora (180 μL 20 x SSPE, 12 μL 50 x Denhardtovog rastvora, 6 μL 1% Tween 20, 1 μL 1 mg/mL streptavidin – R- fikocerin konjugata (streptavidin–R-phycoerythrin conjugate, Invitrogen, Kat. Broj: S-866), 401 μL destilovane vode), a zatim pipetirano u tubu. Iz mikročipa je uklonjen hibridizirajući rastvor, a zatim u isti dodato 90 μL ispirajućeg rastvora A i opran u fluidnoj stanici. Kada je mikročip bio spreman za hibridizaciju provereno je prisustvo vazdušnih mehurića, a mikročip ponovo ispran pre nego što je stavljen na ispirajući nosac. Staklo svakog mikročipa je pažljivo očišćeno sa izopropanolom i obrisano pamučnim tupferom, a zatim na njega stavljen tanki plastificirani poklopac da bi se sprečilo isparavanje. Mikročip je potom stavljen u skener (GeneArray Scanner 3000, Affymetrix, Kat. Broj: 00-0212), a skeniranje je urađeno na talasnoj dužini od 560 nm.

3.2.12.6. *Analiza mikročip (TAG16K v2) rezultata*

Na površini svakog Afimetriks mikročipa se nalazi najmanje 5 identičnih proba (za svaku barkod sekvencu), raspoređenih tako da njihova aktivnost bude što je moguće nezavisnija. Ukoliko je jedan od rezultata izvan opsega, uklanja se pre izračunavanja srednje vrednosti intenziteta signala za specifičan barkod koji će se koristiti za dalju analizu. Paralelno sa tim, za svaku pojedinačnu sekvencu, čiji je intenzitet izvan opsega se takođe posmatrao intenzitet 5 susednih proba (5 x 5). Ukoliko najmanje 13 od 25 (~50%) vrednosti odstupa od srednje vrednosti intenziteta barkod sekvenci kojima pripadaju za više od 10%, ovaj deo mikročipa se smatrao nepodobnim za dalju analizu (Pierce et al., 2007).

Prisutnost pojedinačnih sojeva kvasca u ispitivanim uzorcima istog jedinjenja/koncentracije u odnosu na srednju vrednost svih kontrolnih uzoraka je izračunavana korišćenjem MAD logaritamske (MADL) vrednosti. MADL vrednost predstavlja logaritamski odnos između srednjih vrednosti intenziteta ispitivanih uzoraka naspram srednje vrednosti intenziteta kontrolnih uzoraka (r_L).

$$\text{MADL} = (r_L - \text{med}(r_L)) / \text{MAD}(r_L)$$

Median (r_L) i $\text{MADL}(r_L)$ je izračunavan za sve sojeve jednog uzorka.

Pored računanja intenziteta vrednosti pojedinačnih sojeva u ispitivanim uzorcima u odnosu na kontrolu, da bi se proverio stepen varijabilnosti u okviru istog eksperimenta (intra-eksperimentalna normalizacija) takođe se računala i varijabilnost u uzorcima istog jedinjenja ($n=2$) kao i 4-8 kontrolnih uzoraka ($n=4-8$).

Zbog specifičnosti haplodeficijentne metode, profil ispitivanog jedinjenja je predstavljen na sledeći način: MADL vrednost 0 ($\text{MADL} = 0$) predstavlja relativan rast soja kvasca u uzorku sa ispitivanim jedinjenjem jednak rastu istog soja kvasca u kontrolnom uzorku ($a_{sr} = 0$). Rast ostalih sojeva je predstavljen na isti način, ali je, kao što je gore pomenuto, isto tako bilo potrebno odrediti i vrednost σ kao meru varijabilnosti svakog soja u okviru istog ispitivanog jedinjenja. Da bi se izbegla pristrasnost u izračunavanju standardne devijacije bilo je dozvoljeno korišćenje najviše 5 uzoraka tretiranih istim jedinjenjem.

Pored MADL vrednosti koristio se i z-parameter koji predstavlja statističku meru učestalosti pojedinačnog soja u prisustvu ispitivanog jedinjenja uzimajući u obzir

varijabilnost njegovih vrednosti u svim dosadašnjim eksperimentima (inter-eksperimentalna normalizacija), prihvatajući vrednosti do 15% izvan dobijenog opsega. Da bi se izračunao intenzitet vrednosti svakog soja kvasca (a_i) MADL vrednost je podešena da predstavlja zbir vrednosti (a_1, \dots, a_n) istog soja kvasca podeljenu sa ukupnim brojem (n) eksperimenata. z-parametar za a_i je definisan kao $z_i = (a_i - a_{sr}) / \sigma$, gde a_{sr} predstavlja srednju vrednost svih sojeva, a σ kao standardna devijacija a_i vrednosti. Na taj način učestalost svakog soja je normalizovana kao što je gore opisano, a korišćenjem pozitivnih i negativnih vrednosti z-parametra predstavljen kao dve različite distribucije dajući simetričan profil. U levom donjem uglu su predstavljeni osetljivi sojevi (negativne vrednosti z-parametra), a u desnom gornjem uglu oni koji su otporni na delovanje ispitivanog jedinjenja (pozitivne vrednosti z-parametra). Ukoliko je z-parametar iznad -5 ili ispod 5 soj je nespecifično osetljiv na delovanje datog jedinjenja, tj. njegova učestalost je slična kao i u prisustvu svih prethodno ispitivanih jedinjenja. Pozitivne i negativne vrednosti z-parametra \geq od 5 ili \leq -5 ukazuju da je učestalosti soja kvasca u prisustvu ispitivanog jedinjenja značajno veća ili manja u odnosu na njegovu učestalost u prethodnim eksperimentima.

REZULTATI

4. REZULTATI

U ovom radu je ispitivana mogućnost korišćenja ćelija kvasca *Sacharomyces cerevisiae*, kao odgovarajućeg model sistema za eukariotske organizme, u identifikaciji malih molekula iz Novartisove (Novartis AG, Basel, Switzerland) kolekcije, koji imaju uticaj na ćelijski rast i razmnožavanje. Takva jedinjenja se kasnije ispituju u kulturama kvasca i /ili sisarskim ćelijama, a sa ciljem sagledavanja njihovog antifungalnog i citostatskog dejstva, kao i specifičnog mehanizma delovanja na signalne puteve i njihove medijatore. Obzirom na to da Novartisova kolekcija broji preko milion različitih hemijskih jedinjenja, bilo je neophodno razviti eseje čijom bi se primenom, u relativno kratkom vremenskom periodu, mogao odrediti njihov inhibicioni potencijal u eukariotskim ćelijama. Sa tim ciljem se pristupilo razvoju dva eseja pogodna za testiranje u (ultra) visoko automatizovanim uslovima: jednog zasnovanog na sposobnosti živih ćelija kvasca da redukuju resazurin (AlamarBlue®), tamnu, nefluorescentnu boju u visokofluorescentni rezorufin (Tiballi et al., 1995; O'Brien et al., 2000) i drugog zasnovanog na praćenju rasta kroz merenje optičke gustine kulture. U visoko automatizovanim uslovima moguće testirati maksimalno 10.000 jedinjenja/dan, dok u ultra visoko automatizovanim uslovima taj broj je preko 100.000 jedinjenja/dan.

Da bismo razvili visoko automatizovane eseje, koristili smo diploidni divlji soj kvasca konstruisan ukrštanjem haploidnih sojeva BY4741 i BY4742 kao i diploidne sojeve kojima je uklonjen jedan *pdr5* ili dva gena *pdr5snq2* (materijal i metode, poglavlje 3.1.1.) koji kodiraju transportne proteine locirane u ćelijskoj membrani (Balzi et al., 1994; Cui et al., 1999)

U cilju optimizacije eksperimentalnih uslova u razvoju fluorescentnog AlamarBlue® eseja najpre smo testirali rast ćelijske kulture kvasca u mikrotitarskim pločama formata 384 bunarčića, maksimalnog kapaciteta 120 μ L/bunarčiću, odnosno 1536 bunarčića maksimalnog kapaciteta 12 μ L/bunarčiću. Eksperimenti su osmišljeni da ispituju uticaj početnih gustina kulture na rast u minimalnom medijumu i posledično na jačinu fluorescentnog signala. Testirane su različite koncentracije AlamarBlue® i pH vrednosti. Kvalitet eseja i mogućnost njegove primene u visoko automatizovanim uslovima određivan

je na osnovu dobijenih Z' vrednosti (Zhang et al., 1999). Da bi utvrdili reproducibilnost rezultata u visoko automatizovanim uslovima, testirali smo set od 9.856 (eksperiment A) i 4.224 (eksperiment B) Novartisovih jedinjenja. Standardizovan fluorescentni esej se dalje koristio za primarno testiranje 1.101.408 hemijskih jedinjenja iz Novartisovih kolekcija malih molekula, sa ciljem identifikacije onih koji inhibiraju ćelijski rast ispod granične vrednosti ili -50% (materijal i metode, poglavlje 3.2.9.2.). Takva jedinjenja, su poslata na analizu u hemijsko odeljenje za odabir onih koji će se dalje testirati u sekundarnom eseju.

U sekundarnom eseju se pratio rast i razmnožavanje ćelija kvasca kroz merenje optičke gustine kulture gajene u bogatom i minimalnom medijumu. Tokom razvoja eseja najpre se pratio rast kulture u visoko automatizovanim uslovima u mikrotitarskim pločama sa 96 bunarčića (maksimalnog kapaciteta 200 μ L/bunarčiću) i 384 bunarčića (maksimalnog kapaciteta 120 μ L/bunarčiću). U cilju sagledavanja uticaja fizičkih faktora, kao što su evaporacija, temperatura, aeracija na rast ćelija u mikrovolumenu ćelijske kulture dalji eksperimenti su urađeni u visoko automatizovanim uslovima korišćenjem mikrotitarskih ploča sa 1536 bunarčića (maksimalnog kapaciteta 12 μ L/bunarčiću). Kvalitet eseja je definisan Z' vrednošću (Zhang et al., 1999).

Nakon optimizacije u visoko automatizovanim uslovima, pristupilo se ispitivanju 1930 odabranih jedinjenja u oba eseja kroz merenje inhibicije rasta 50% ćelijske kulture (IC_{50}).

U cilju sagledavanja načina na koji bioaktivni molekuli deluju na procese u ćeliji ispitivali smo raznovrsnost njihovog uticaja na rast haplodeficijentnih sojeva kvasca.

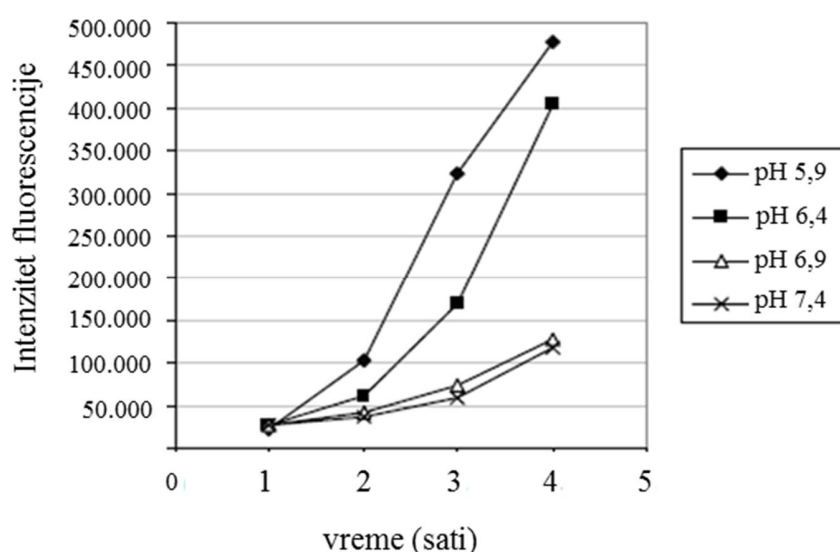
4.1. Razvoj fluorescentnog (AlamarBlue®) eseja

4.1.1. Standardizacija eseja u mikrotitarskim pločama sa 384 bunarčića

U cilju definisanja uslova eseja bilo je potrebno odrediti uticaj različitih pH vrednosti sredine, dužine inkubacije, gustine početne kulture i koncentracije AlamarBlue® boje na razvoj fluorescentnog signala. Da bi sagledali mogući uticaj AlamarBlue® na jačinu fluorescentnog signala pratili smo njegov razvoj u prisustvu i odsustvu ćelija wt soja kvasca.

4.1.1.1. Uticaj pH vrednosti i dužine inkubacije alamarBlue® na jačinu fluorescentnog signala

Da bi optimizovali dužinu inkubacije alamarBlue®, u kulturu wt soja kvasca inkubiranu preko noći, dodato je 2,8% alamarBlue® pripremljenog u puferu različitih pH vrednosti (materijal i metode, poglavlje 3.2.5.1.) vodeći računa da opseg ispitivanih pH vrednosti ne utiče na rast kvasca. Fluorescentni signal je meren na svakih sat vremena u periodu od četiri sata (Slika 10).

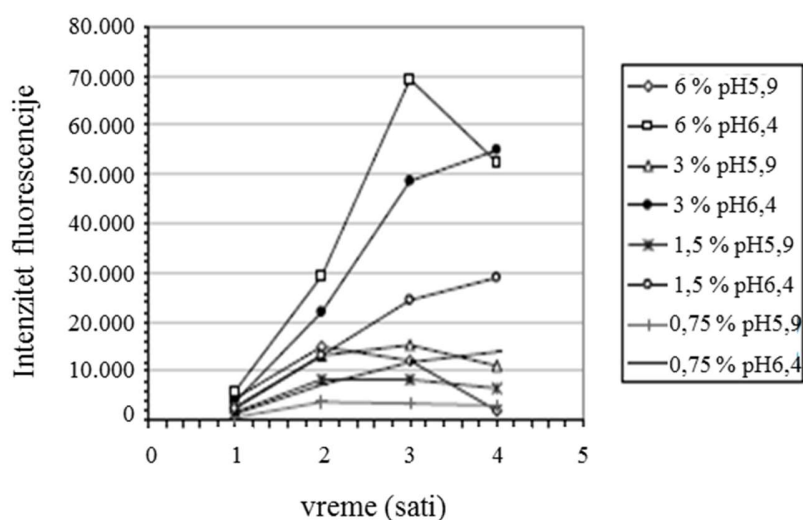


Slika 10. Uticaj dužine inkubacije na jačinu fluorescentnog signala pri različitim pH vrednostima. Početna gustina kulture wt soja kvasca u minimalnom medijumu je bila OD_{600} 0,01 a kultura je inkubirana u trajanju od 16 sati. Vrednosti na slici predstavljaju srednju vrednost izračunatu iz osam uzorka (n=8).

Poređenje jačine signala u funkciji vremena pokazuje da je maksimum fluorescencije dostignut pri dužem vremenu inkubacije bez znaka dalje redukcije alamarBlue® u hidoksirezorufin. Takođe je pokazano da je u puferu pH 5,9 i 6,4 fluorescentni signal bio četiri puta jači u odnosu na pH 6,9 i 7,4. Iako se u prisustvu pufera pH 6,4 signal bio najjači za dalji razvoj eseja je korišćen pufer pH 5,9.

4.1.1.2. Efekat koncentracije alamarBlue® u različitim medijumima

U cilju sagledavanja eventualnog uticaja alamarBlue® na jačinu signala dobijenog sopstvenom redukcijom, fluorescencija je merena u vodi, bogatom i minimalnom medijumu u prisustvu tj. odsustvu pufera i bez prisustva ćelija. Fluorescentni signal je meren odmah nakon dodatka alamarBlue® (materijal i metode, poglavlje 3.2.5.2.).

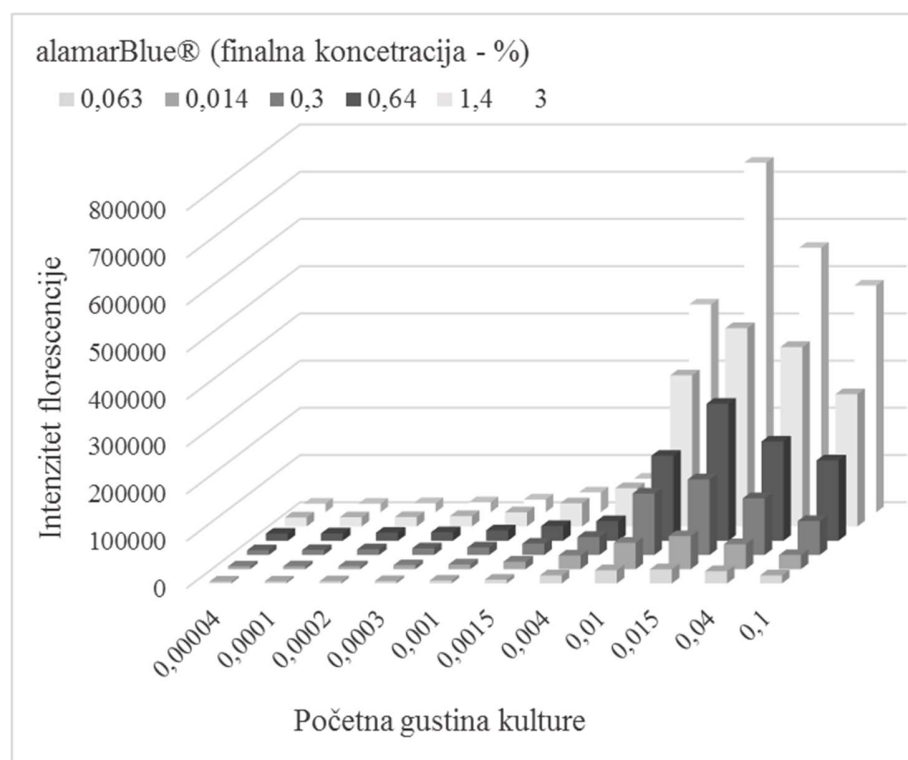


Slika 11. Uticaj alamarBlue® na intenzitet fluorescentnog signala. Vrednosti na slici predstavljaju srednju vrednost izračunatu iz četiri uzorka (n=4).

Na osnovu dobijenih rezultata je potvrđeno da se sa povećanjem koncentracije alamarBlue® jačina fluorescentnog signala razvija nelinearno. Iznad 3% intenzitet signala opada, najverovatnije jer alamarBlue® inhibira razvoj fluorescentnog signala (Slika 11). Dobijeni rezultati su takođe pokazali da je intenzitet bazalne fluorescencije najviši u vodi, a najniži u minimalnom medijumu (SD) bez prisustva pufera. Da bi se smanjio uticaj bazalne fluorescencije u daljim ispitivanjima ćelije su gajene u minimalnom medijumu, a koncentracija Alamar blue® nije prelazila 1,4%.

4.1.1.3. Uticaj gustine početne kulture na jačinu fluorescentnog signala

U cilju određivanja najjačeg fluorescentnog signala, testirali smo različite početne gustine wt kulture kvasca u minimalnom medijumu, kao i različite koncentracije alamarBlue®, u puferu pH 5,9 (materijal i metode, poglavlje 3.2.5.3. i Slika 12).

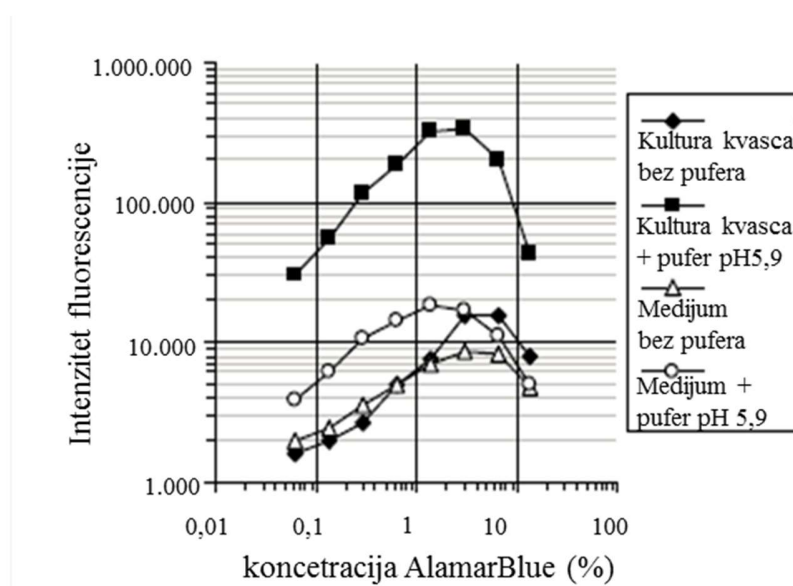


Slika 12. Uticaj početnih razblaženja wt kulture kvasca i koncentracije alamarBlue® boje na intenzitet fluorescentnog signala. Vrednosti na slici predstavljaju srednju vrednost izračunatu iz četiri uzorka (n=4).

Dobijeni rezultati su pokazali da, bez obzira na gustinu početne kulture wt soja kvasca u minimalnom medijumu, sa povećanjem koncentracije alamarBlue® se povećava jačina signala. U isto vreme je pokazano da pri početnim gustinama između OD₆₀₀ 0,01 i 0,015 se dobija najjači fluorescentni signal. Ispod i iznad tih vrednosti fluorescentni signal je bio slabiji.

4.1.1.4. Efekat pufera na razvoj fluorescentnog signala

Na osnovu prethodno dobijenih rezultata, da bi utvrdili uticaj pufera na razvoj fluorescentnog signala, u kulturu wt soja kvasca gajenog u minimalnom medijumu tokom 16 sati na 30°C, su dodate različite koncentracije alamarBlue® boje u prisustvu i odsustvu pufera (materijal i metode, poglavlje 3.2.5.4. i Slika 13).



Slika 13. Razvoj fluorescentnog signala u prisustvu različitih koncentracija alamarBlue® boje sa i bez fosfatnog pufera pH 5,9 (finalna koncentracija 50 mM). Vrednosti na slici predstavljaju srednju vrednost izračunatu iz četiri uzorka (n=4).

Dobijeni rezultati ukazuju da je prisustvo pufera neophodno za razvoj dobrog fluorescentnog signala, kao i da je optimalna koncentracija alamarBlue® boje između 1 i 4%. Upotreba vode dovela je do 10 x manjeg intenziteta signala u odnosu na signal dobijen u puferisanoj sredini.

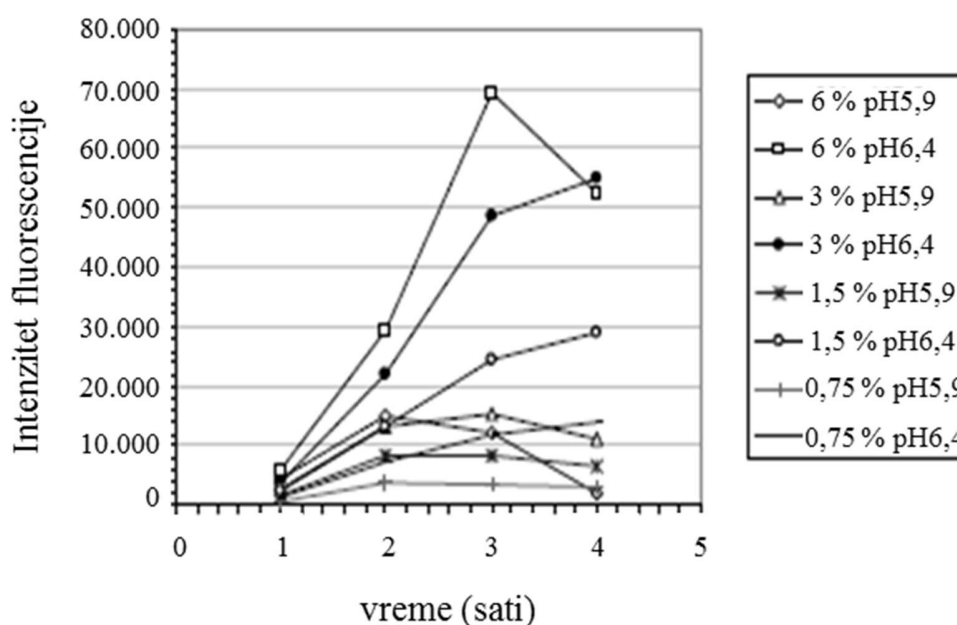
4.1.2. Standardizacija uslova u mikrotitarskim pločama sa 1536 bunarčića

Na osnovu rezultata dobijenih testiranjem različitih parametara u mikrotitarskim pločama sa 384 bunarčića dalja standardizacija eseja je rađena u visoko automatizovanih uslovima. Obzirom na to da su zapremina i površina različite u odnosu na ploče sa 384

bunarčića, testiranje prethodno definisanih parametara je ponovljeno. Pored toga testirana je i osetljivost tri soja kvasca, wt, *pdr5* i *pdr5snq2* na dimetilsulfoksid (DMSO), organski rastvarač u kojem se rastvaraju i čuvaju jedinjenja. Najzad, sa ciljem da se smanji količina jedinjenja potrebna za primarno testiranje kao i ukupni troškovi eseja, testiranje prethodno definisanih parametara je ponovljeno u smanjenom volumenu kulture.

4.1.2.1. Efekat koncentracije alamarBlue® boje i pH vrednosti

U cilju utvrđivanja optimalne koncentracije alamarBlue® i pH vrednosti na jačinu fluorescentnog signala, nakon 16 sati inkubacije, u wt kulturu kvasca, gajenu u minimalnom medijumu, je dodata alamarBlue® u različitim koncentracijama i pH 5,9 i 6,4 (materijal i metode, poglavlje 3.2.6.1.).

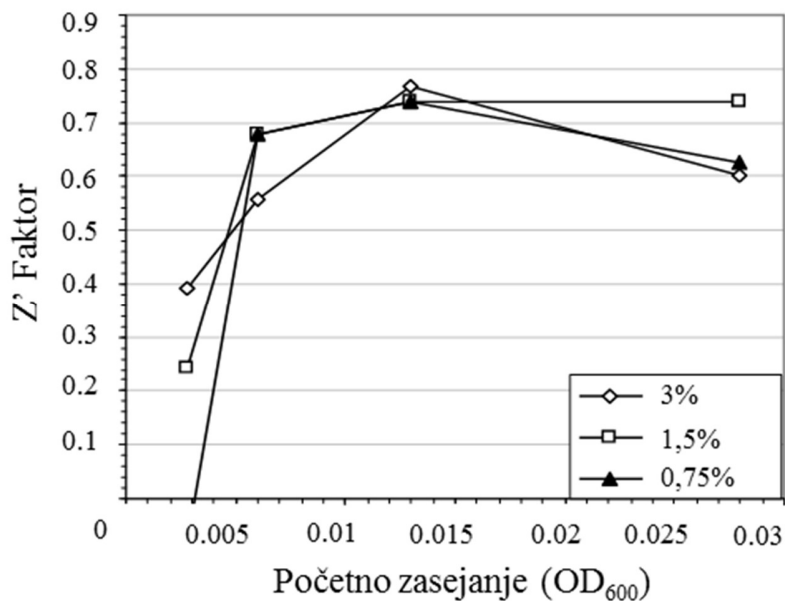


Slika 14. Uticaj alamarBlue® koncentracije i pH vrednosti na razvoj fluorescentnog signala. Vrednosti na slici predstavljaju srednju vrednost izračunatu iz osam uzorka (n=8).

Rezultati predstavljeni na slici 14 su pokazali da je fluorescentni signal daleko jači pri pH 6,4 u odnosu na pH 5,9. Intenzitet alamarBlue® pri koncentracijama 0,75% i 6% dovodi do ne-linearnog razvoja fluorescentnog signala, dok je razvoj fluorescentnog signala pri koncentracijama između 1,5% i 3% u puferu pH 6,4 linearan tokom 4 sata inkubacije.

4.1.2.2. Uticaj početne gustine na kvalitet eseja

Uticaj početne gustine wt kulture kvasca gajene u minimalnom medijumu na kvalitet eseja se procenjivao poređenjem dobijenih Z' vrednosti (materijal i metode, poglavlja 3.2.6.2. i 3.2.9.2.).

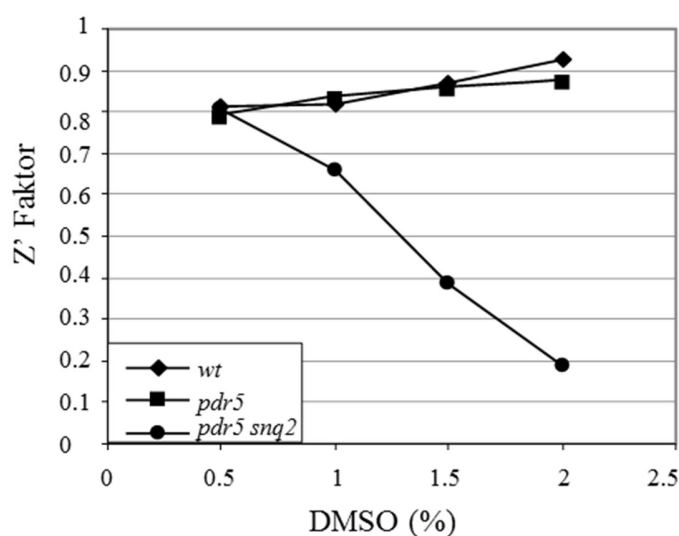


Slika 15. Uticaj gustine početnih kultura i koncentracije alamarBlue® na kvalitet eseja (Z' vrednosti). Vrednosti na slici predstavljaju srednju vrednost izračunatu iz četiri uzorka ($n=4$).

Rezultati dobijeni ispitivanjem uticaja početne gustine wt kulture kvasca i koncentracije alamarBlue® prikazani su na slici 15. Kako se sa grafika može jasno videti, još jednom je pokazano da je za dobar fluorescentni signal, a posledično kvalitet eseja, neophodno da gustina početne wt kulture kvasca bude u opsegu od OD₆₀₀ 0,006 do 0,028. Isto tako, najbolje Z' vrednosti Z' (iznad 0,68) za najveći opseg početnih gustina je dobijen pri alamarBlue® koncentraciji od 1,5%.

4.1.2.3. Uticaj koncentracije DMSO na rast kulture kvasca

Sa ciljem da se ispita uticaj rastućih koncentracija DMSO na vijabilitet ćelija kvasca, korišćena su tri različita soja kvasca: wt soj *S. crevisiae*, kao i dva mutantna soja kojima je uklonjen jedan (*pdr5*) ili oba (*pdr5* i *snq2*) gena (materijal i metode, poglavlja 3.2.6.3. i 3.2.9.2.).



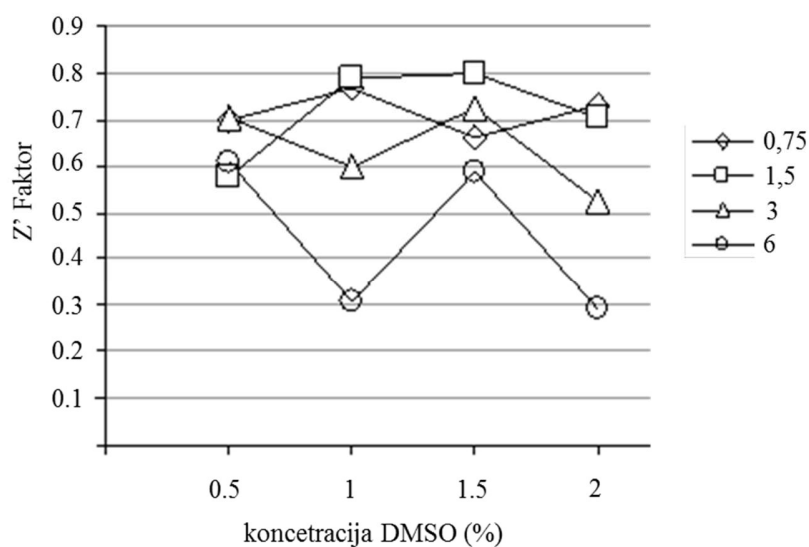
Slika 16. Uticaj DMSO na rast wt *pdr5* i *pdr5snq2* sojeva kvasca predstavljen Z' vrednostima. Rezultati na slici predstavljaju srednju vrednost izračunatu iz četiri uzorka (n=4).

Prema rezultatima prikazanim na slici 16, pri koncentraciji do 2%, DMSO ne utiče na ćelijski rast wt i *pdr5* soja. Sa druge strane, rast *pdr5snq2* soja je značajno smanjen već pri koncentracijama DMSO iznad 0,5%.

4.1.2.4. Uticaj smanjenog volumena ćelijske kulture na kvalitet eseja

Na osnovu gore pomenutih rezultata *pdr5* soj je dao najbolje rezultate pa su dalja testiranja rađena na ovom soju kvasca. U cilju sagledavanja uticaja smanjenog volumena na kvalitet eseja, ispitivali smo rast *pdr5* soja kvasca u minimalnom medijumu u 4 μ L/bunarčiću u prisustvu različitih koncentracija DMSO. Sledećeg dana fluorescentni signal je meren na pH 6,4 pri različitim koncentracijama alamarBlue® (materijal i metode, poglavlje 3.2.6.4.).

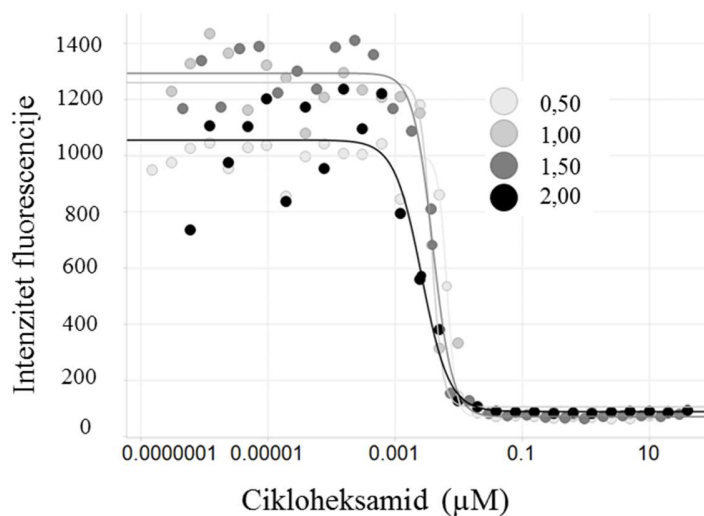
Na osnovu rezultata prikazanih na slici 17, smanjen volumen ćelijske kulture ne utiče značajno na kvalitet eseja pri koncentracijama alamarBlue® od 0,75 i 1,5% i DMSO u opsegu od 0,5 do 2%. Za date parametre Z' je iznad 0,65. Pri alamarBlue® koncentracijama iznad 3% povećava se i varijabilnost Z' vrednosti.



Slika 17. Uticaj volumena hranljivog medijuma na Z' vrednosti pri različitim koncentracijama alamarBlue® i DMSO.

4.1.2.5. Uticaj DMSO na osetljivost na cikloheksamid

Cilj ovog eksperimenta je bio da se ispita osetljivost *pdr5* soja kvasca na rastuće koncentracije cikloheksamida i DMSO (materijal i metode, poglavlje 3.2.6.5.).



Slika 18. IC₅₀ cikloheksamida za *pdr5* soj kvasca pri rastućim koncentracijama DMSO.

Rezultati na slici 18, slično rezultatima eksperimenata prikazanih na slikama 16 i 17, potvrđuju da 1% DMSO ne utiče na osetljivost kvasca na cikloheksamid.

4.1.2.6. Reproducibilnost rezultata

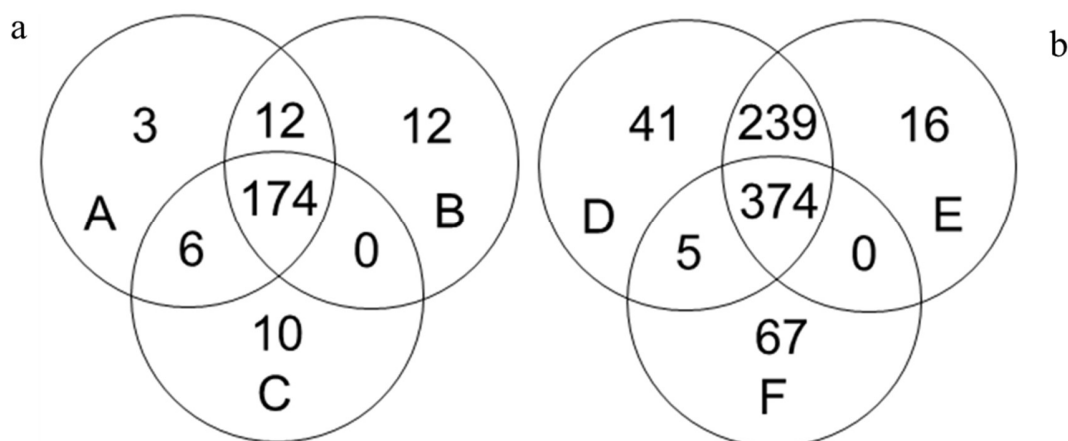
Da bi se ispitala reproducibilnost rezultata primarnog testiranja, izvedena su dva eksperimenta u finalnim uslovima alamarBlue® eseja: gustina početne kulture *pdr5* soja OD₆₀₀ 0,01 je gajena 16 sati u 4 μL u prisustvu 20μM jedinjenja, 1% DMSO (maksimalni rast) ili 100 mM cikloheksamida (maksimalna inhibicija). Zatim je u kulture dodat alamarBlue® u fosfatnom puferu pH 6,4 (finalna koncentracija 1,5%) a fluorescentni signal meren nakon 3 sata inkubacije na 30°C pri na Viewlux čitaču (metode 3.2.6.6).

Narednog dana, nakon 16 sati inkubacije na 30°C u uslovima visoke vlažnosti dodato je 2 μL/ bunarčiću alamarBlue® u fosfatnom puferu pH 6,4 (finalno 1.5% alamarBlue®, 50 mM fosfatnog pufera). Fluorescentni signal je meren nakon 3 sata inkubacije na 30°C na Viewlux 1430 multičitaču pri excitaciji na 525 nm i emisiji 598 nm.

U prvom eksperimentu, testirano je 9856 jedinjenja u tri nezavisna testa, proizvoljno nazvana A, B i C, urađena su u triplikatu (na odvojenim mikrotitarskim pločama).

U drugom eksperimentu, 4224 jedinjenja je testirano pod identičnim eksperimentalnim uslovima na odvojenim mikrotitarskim pločama (test D i E). U treću mikrotitarsku ploču (test F), pre dodatka suspenzije kvasca, hemijska jedinjenja su čuvana

preko noći (16.5 sati). Inhibicija > 50% je korišćena kao gornja granica za definisanje inhibitornog efekta.



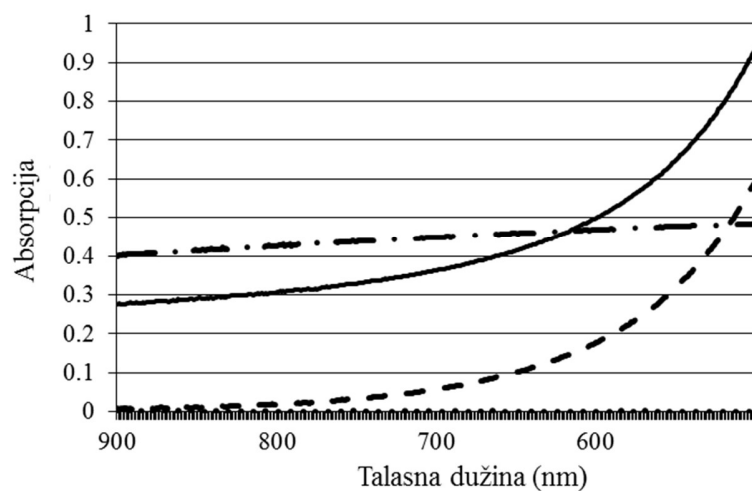
Slika 19. Venov dijagram sa totalnim brojem aktivnih jedinjenja dobijenih u dva eksperimenta sa dve različite kolekcije a) 4224 jedinjenja i b) 9856 jedinjenja.

Rezultati testova A, B i C prikazani na slici 19a, pokazuju da je od 217 (2,2% ukupno testiranih jedinjenja), aktivnost 174 (80%) potvrđena u sva tri eksperimenta. U slučaju drugog eksperimenta (slika 19b), podudarnost broja aktivnih jedinjenja dobijenih u identičnim testovima D i E je 82,6% (613 od 742). Podudarnost sa trećim testom (F) iznosila samo 50% (374 od 742) što ukazuje da produženo čuvanje 40 nL dovodi do smanjene osetljivosti testiranja.

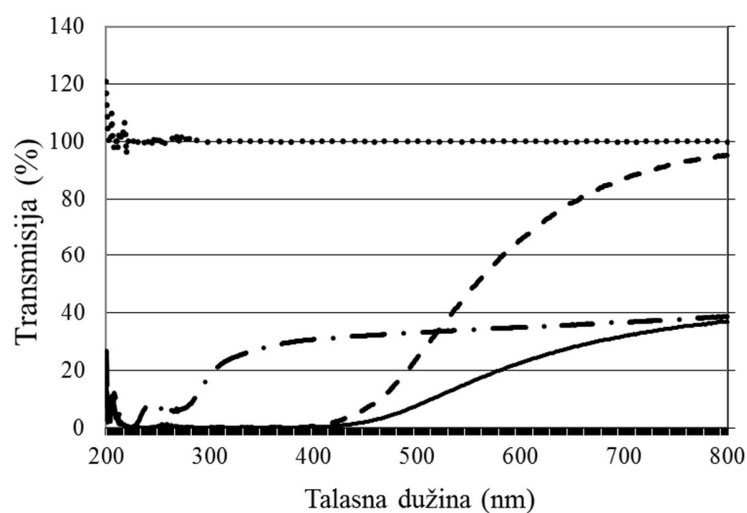
4.2. Razvoj eseja zasnovanog na merenju optičke gustine

4.2.1. Uticaj medijuma na apsorpciju u transmisiju

Za procenu mogućeg uticaja medijuma na dobijene rezultate bilo je neophodno definisati njegov apsorpciji i transmisioni spektar. Sa tim ciljem se merila apsorpcija i transmisija minimalnog i bogatog medijuma, u prisustvu i odsustvu ćelija *pdr5* soja, u opsegu talasnih dužina od 190 do 1.100 nm (materijal i metode 3.2.3.).



Slika 20. Uticaj bogatog, odnosno minimalnog medijuma, u prisustvu i odsustvu wt ćelija kvasca, na apsorpcioni spektar. Apsorpcioni spektar je predstavljen linijama: minimalni medijum; - - - bogati medijum _ . _ . _ minimalni medijum u prisustvu ćelijske kulture; _____ bogati medijum u prisustvu ćelijske kulture.



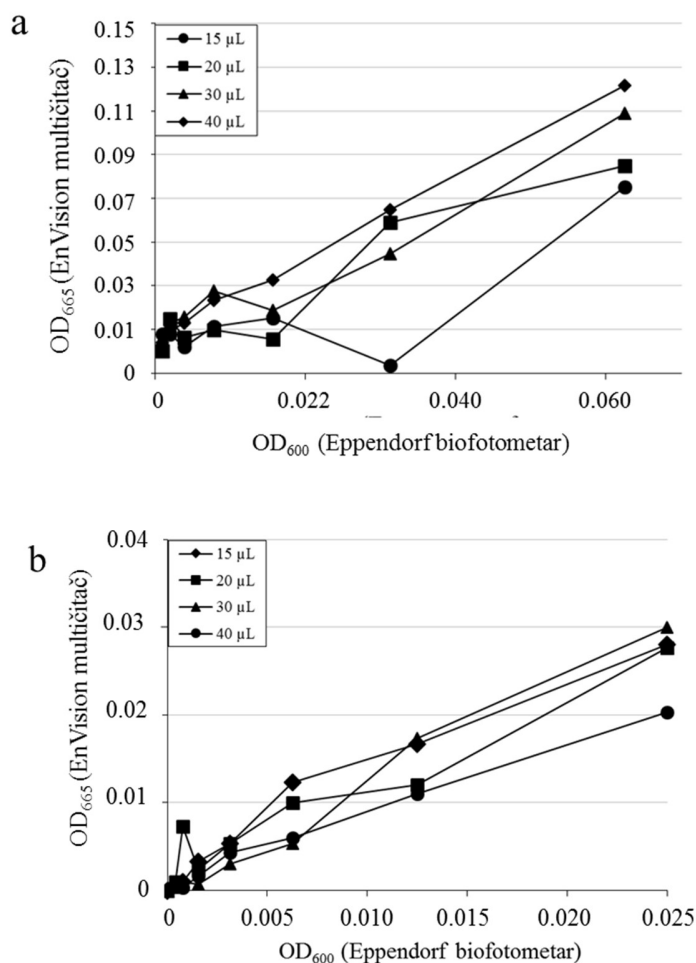
Slika 21. Uticaj bogatog, odnosno minimalnog medijuma, u prisustvu i odsustvu ćelijske kulture kvasca na transmisioni spektar. Transmisioni spektar je predstavljen linijama: - - - minimalni medijum; bogati medijum _ . _ . minimalni medijum u prisustvu ćelijske kulture; _____ bogati medijum u prisustvu ćelijske kulture.

Na osnovu vrednosti predstavljenih na grafikonima (Slike 20 i 21), zaključeno je da minimalni medijum nema veliki uticaj na apsorpcioni spektar, dok bogati medijum značajno apsorbuje na nižim talasnim dužinama ispod 700 nm. Sa ovim rezultatom su saglasne i vrednosti dobijene merenjem transmisije; dok minimalni medijum propušta 100% svetlosti u opsegu merenih vrednosti uticaj bogatog medijuma se značajno smanjuje iznad 700 nm, a potpuno prestaje iznad 800 nm talasne dužine.

4.2.2. Osetljivost mernog instrumenta u visoko automatizovanim uslovima

Obzirom na to da se za merenje optičke gustine kulture kvasca gajene u mikrotitarskim pločama koristi EnVision 2100 multičitač bilo je neophodno utvrditi njegovu osetljivost u odnosu na optičku vrednost dobijenu merenjem na standardnim Eppendorf biofotometrom na 600 nm (OD_{600}). Sa tim ciljem kulture kvasca *pdr5* soja poznatih optičkih gustina odredjenih na standardnom Eppendorf biofotometru (materijal i metode, poglavlje 3.2.7.1.) su prebačene u mikrotitarske ploče sa 384 bunarčića u volumenima 15 μ L, 20 μ L, 30 μ L i 4 μ L, a optičke gustine merene u EnVision 2100 multičitaču na 665 nm.

Pri merenju optičkih gustina odredjenih Eppendorf biofotometrom na EnVision 2100 multičitaču pokazano je da se optička gustina ne može precizno meriti u volumenu manjem od 30 μ L/bunarčiću. Takođe je pokazano da razblaženje ćeljske kulture *pdr5* soja utiče na preciznost mernog instrumenta, varijabilnost je veća kada je OD_{600} ispod 0,01 u minimalnom (Slika 22a) odnosno 0,008 u bogatom medijumu (Slika 22b). Volumen suspenzije je imao manje uticaja na preciznost merenja u bogatom medijumu.

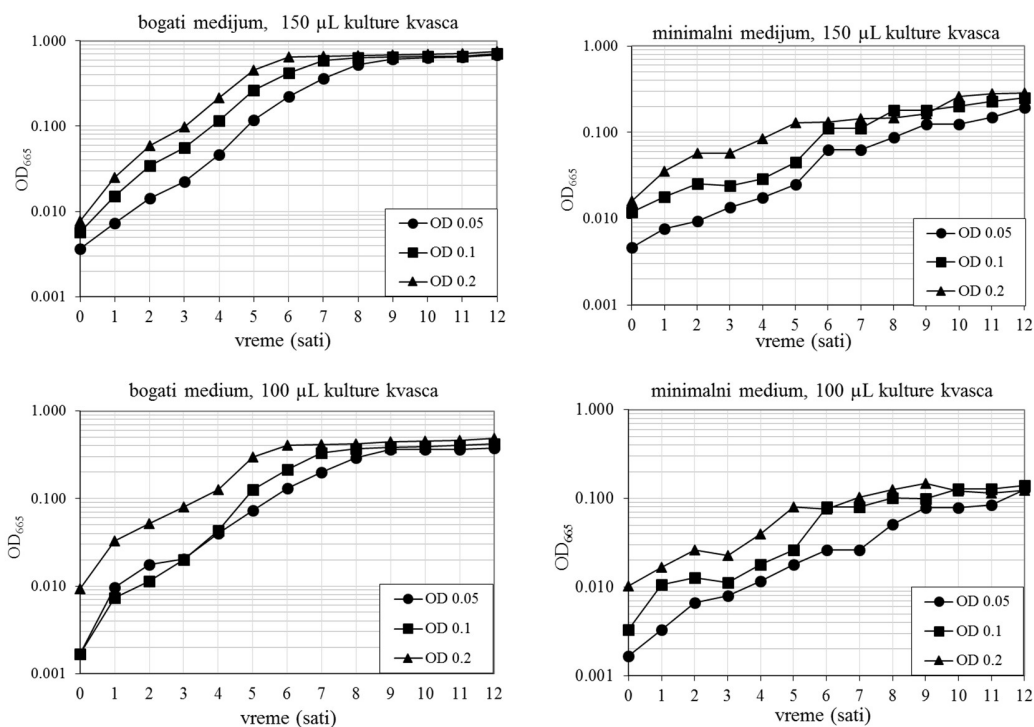


Slika 22. Određivanje osetljivost EnVision 2100 multičitača (Perkin Elmer) merenjem optičke gustine u različitim volumenima suspenzije kvasca u minimalnom (a) i bogatom (b) medijumu. Vrednosti na grafiku predstavljaju srednju vrednost izračunatu iz 6 bunarčića (n=6).

4.2.3. Standardizacija eseja u mikrotitarskim pločama sa 96 i 384 bunarčića

4.2.3.1. Rast kvasca u mikrotitarskim pločama sa 96 bunarčića

U cilju određivanja brzine rasta kvasca praćena je kriva rasta u volumenima 150 i 100 μL . Čelijske kulture *pdr5* soja su inkubirane na 30°C pri konstantnoj aeraciji, a optička gustina merena na svakih sat vremena (materijal i metode, poglavlje 3.2.7.2. i Slika 23).

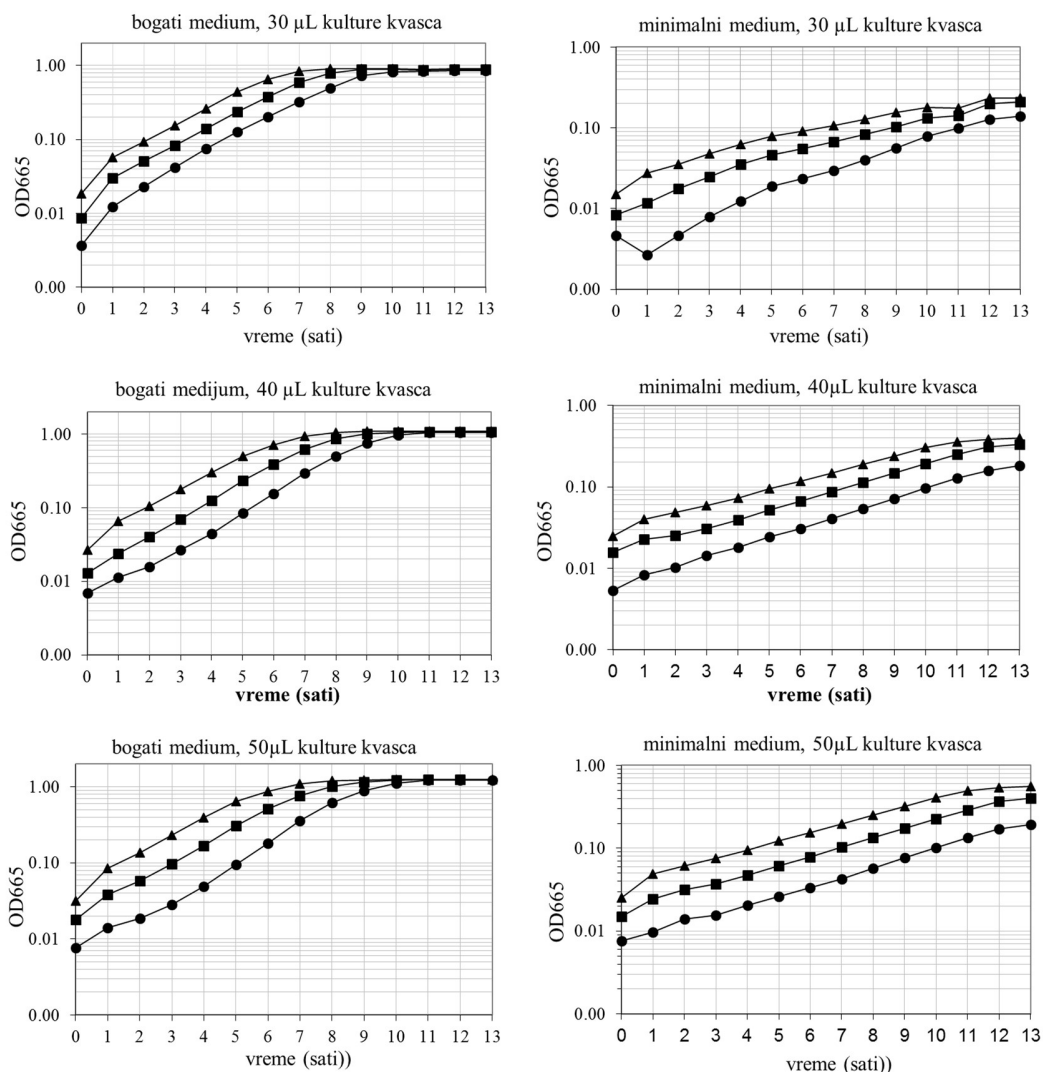


Slika 23. Kriva rasta ćelijske kulture *pdr5* soja kvasca u bogatom i minimalnom medijumu u mikrotitarskim pločama sa 96 bunarčića pri početnim zasejanjima od OD_{600} –●– 0,05, –■– 0,1, –▲– 0,2. Vrednosti na grafiku predstavljaju srednju vrednost izračunatu iz 6 bunarčića ($n=6$).

Na osnovu dobijenih rezultata je uočeno da je u bogatom medijumu ćelijama kvasca potrebno 5 do 9 sati za dostizanje stacionarne faze rasta, dok u minimalnom medijumu to vreme iznosi 8 do 10 sati. Međutim, pri početnim gustinama u opsegu od OD_{600} 0,05 do 0,1, devet sati inkubacije je dovoljno da se prati rast kulture kvasca u oba medijuma.

4.2.3.2. Rast kvasca u mikrotitarskim pločama od 384 bunarčića

Da bi se odredila brzina rasta u pločama gustine 384 bunarčića testirali smo iste početne gustine kulture *pdr5* soja kvasca kao i u prethodnom eksperimentu (OD_{600} 0,05, 0,1 i 0,2) – materijal i metode, poglavlje 3.2.7.2.



Slika 24. Kriva rasta kulture *pdr5* soja kvasca u bogatom i minimalnom medijumu u mikrotitarskim pločama sa 384 bunarčića pri početnim gustinama od OD₆₀₀ –●– 0,05, –■– 0,1, –▲– 0,2. Vrednosti na grafiku predstavljaju srednju vrednost izračunatu iz 3 bunarčića (n=3).

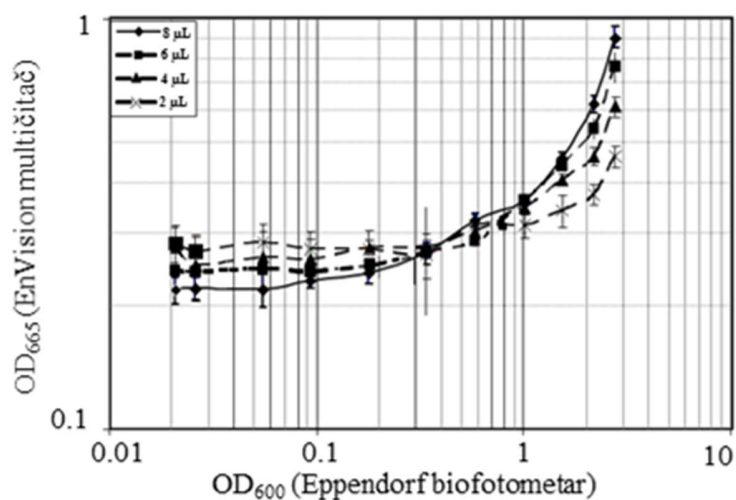
Slično prethodnom eksperimentu u mikrotitarskoj ploči sa 96 bunarčića, dobijeni rezultati su pokazali da ćelijske kulture *pdr5* soja kvasca rastu istim brzinom u bogatom medijumu (9 sati), dok je za dostizanje stacionarne faze rasta u minimalnom medijumu potrebno 13 sati inkubacije. Pored toga, volumen u opsegu od 30-50 µL nije uticao na brzinu rasta što otvara mogućnost za značajnu uštedu bez uticaja na kvalitet esejja.

4.2.4. Razvoj eseja za merenje optičke gustine ćelijske kulture u mikrotitarskim pločama sa 1536 bunarčića

Sa smanjenjem volumena ćelijske kulture *pdr5* soja kvasca uticaj fizičkih faktora kao što su temperatura, evaporacija, dostupnost kiseonika i hranljivih materija postaju značajniji, a ćelijska kultura osetljivija. Zbog toga se u narednim eksperimentima ispitivao uticaj volumena kulture na osetljivost multičitača za merenje optičke gustine kulture u mikrotitarskim pločama formata 1536 bunarčića, kao i odnos maksimalnih i minimalnih vrednosti signala i Z' vrednost. Pored toga se ispitivao uticaj evaporacije na homogenost rezultata i na kraju testirao rast kulture pri različitim fizičkim parametrima: temperaturi, početnoj gustini, vlažnosti i aeraciji.

4.2.4.1. Uticaj volumena kulture na preciznost mernog instrumenta

Cilj ovog eksperimenta je bio određivanje osetljivosti mernog instrumenta u zavisnosti od volumena kulture po bunarčiću (materijal i metode, poglavlje 3.2.8.1.).

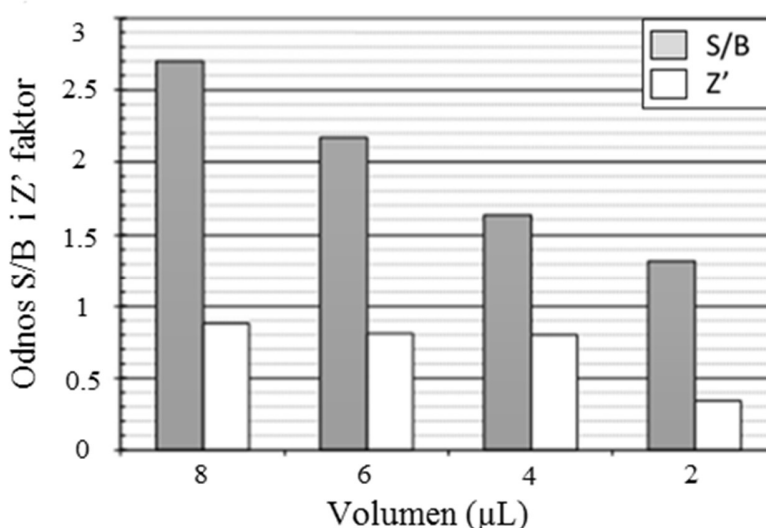


Slika 25. Uticaj volumena na preciznost mernog instrumenta. Pojedinačni rezultati predstavljaju srednju vrednost izračunatu iz osam bunarčića (n=8).

Na slici 25 je prikazana serija razblaženja kulture *pdr5* soja kvasca u minimalnom medijumu volumena 2 μ L, 4 μ L, 6 μ L, i 8 μ L u ploči sa 1536 bunarčića. Sa povećanjem volumena se dobija veći dinamički odnos i smanjuje varijabilnost rezultata. Ove vrednosti ukazuju na mogući uticaj refrakturnog efekata koji se smanjuje sa povećanjem volumena. Najjasniji signal je dobijen pri volumenu od 8 μ L.

4.2.4.2. Odnos maksimalnog i minimalnog signala i Z' vrednosti

Za određivanje uticaja volumena kulture na dinamički odnos maksimalnog (“S”) i minimalnog signala kao i Z' vrednosti korišćena je ćelijska kultura *pdr5* soja kvasca gustine $OD_{665} \sim 2$ i minimalni medijum bez prisustva ćelija (materijal i metode, poglavlje 3.2.8.2.).



Slika 26. Odnos maksimalnog i minimalnog signala u različitim volumenima ćelijske kulture *pdr5* soja kvasca. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrednost izračunatu iz osam bunarčića ($n=8$). Sivo obojeno – odnos S i B vrednosti, belo Z' vrednost.

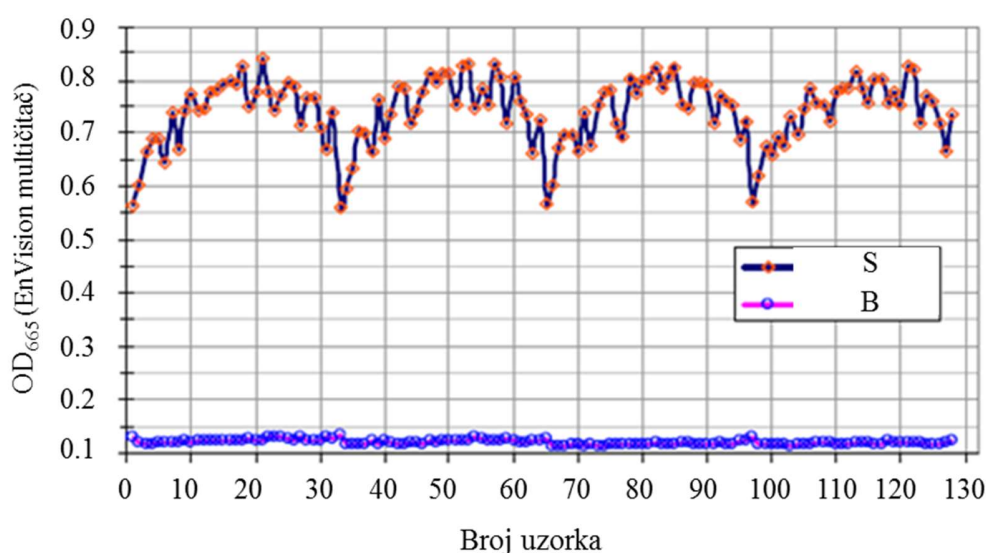
Rezultati prikazani na slici 26 koreliraju sa rezultatima prethodnog eksperimenta (Slika 25) i ukazuju na zaključak da se sa smanjenjem volumena ćelijske kulture *pdr5* soja kvasca, smanjuje i odnos S i B vrednosti sa 2,7 na 1,3.

Najviši dinamički odnos kao i Z' vrednosti Z' od 0,9 su dobijene pri volumenu od 8 μ L, a najniže od 0,3 u 2 μ L ćelijske kulture *pdr5* soja kvasca. Maksimalna moguća Z' vrednost Z' 1, esej sa Z' vrednostima iznad 0,5 je poželjan za izvođenje visoko

automatizovanih testova. Više Z' vrednosti Z' ukazuju da su uslovi za ćelijski rast bolji i da su dobijeni rezultati reproducibilni.

4.2.4.3. Uticaj fizičkih faktora na homogenost rezultata

Uticaj fizičkih faktora kao što su temperatura i vlažnost je praćen kroz merenje optičke gustine OD_{665} prekončne kulture *pdr5* soja kvasca u minimalnom medijumu u prisustvu 1% DMSO (S) ili 1% DMSO +100 μ M cikloheksamida (B) (materijal metode, poglavlje 3.2.8.2.).



Slika 27. Vrednosti predstavljene na grafiku su dobijene merenjem optičke gustine u 128 bunarčića ($n=128$).

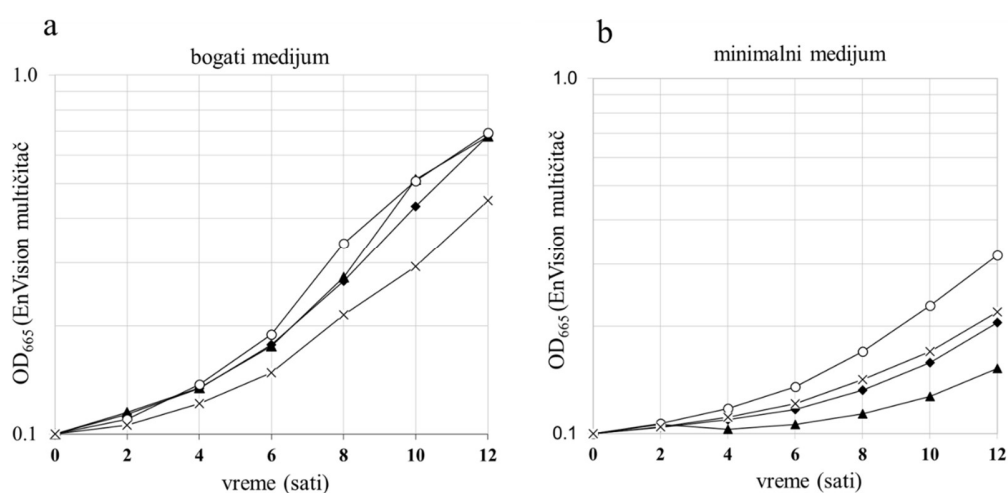
Z' vrednost dobijena računanjem maksimalnog “S” i minimalnog “B” signala je 0,674 što ukazuje na solidnu statističku vrednost eseja (Slika 27). Isto tako, u perifernim bunarčićima su primećene vidljivo niže vrednosti optičke gustine označene kao ivični efekat (od eng. *edge effect*). Ivični efekat predstavlja razliku između vrednosti optičkih gustina dobijenih u centralno pozicioniranim bunarčićima u odnosu na bunarčiće rasporedjene po ivici mikrotitarske ploče. *Ivični efekat* može imati veliki uticaj na Z' vrednosti, a samim tim i na kvalitet eseja, a može biti uzrokovan direktnim uticajem temperature koja dovodi do pojačane evaporacije koji predstavlja i najčešći uzrok ivičnog efekta. Njegov uticaj na

kvalitet eseja se može smanjiti kraćim vremenom izvođenja eseja. Ukoliko to nije moguće mikrotitarske ploče se mogu pokriti kompatibilnim poklopcem ili polupropustljivom folijom ili gajiti u uslovima visoke vlažnosti. Na osnovu našeg iskustva poklopci su primenjivi samo ukoliko se eksperiment ne izvodi na velikom broju ploča.

Isto tako, u maksimalnoj kontroli je primećena oscilacija u vrednostima optičke gustine nezavisno od smanjenja signala na ivicama ploče. Ovaj trend ukazuje na moguće prisustvo nečistoća u metalnim kanalčićima dispenzora koji posledično dovode do nejednake distribucije količine tečnosti po bunarčiću, a samim tim i dobijenih vrednosti optičkih gustina.

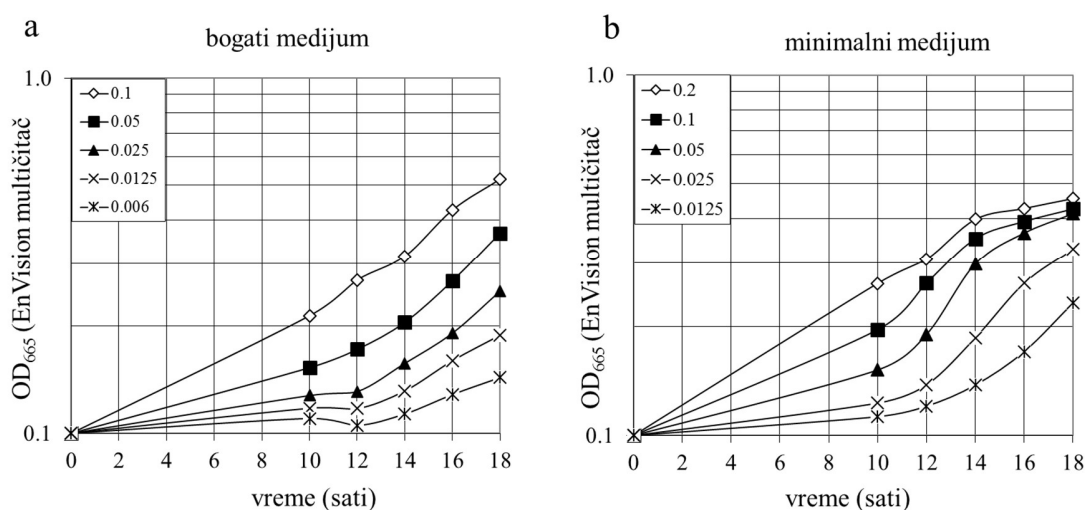
4.2.4.4. Uticaj fizičkih faktora na rast kulture kvasca

U cilju utvrđivanja optimalnih uslova za gajenje *pdr5* soja kvasca u mikrovolumenu bogatog i minimalnog medijuma, ispitivan je uticaj nekoliko parametara: temperature, vlažnosti, aeracije i dužine inkubacije (materijal i metode, poglavlje 3.2.8.3. i Slika 28).



Slika 28. Uticaj spoljašnjih faktora (temperature, vlažnosti i aeracije) na rast ćelijske kulture *pdr5* soja kvasca u bogatom (a) i minimalnom medijumu (b) u mikrotitarskoj ploči sa 1536 bunarčića: (-○-) na 30°C pri konstantnoj aeraciji bez prisustva vlažnosti, (-●-) na 30°C sa aeracijom (svakih 2 sata po 5 sekundi), bez prisustva vlažnosti, (-x-) na sobnoj temperaturi, sa aeracijom, bez prisustva vlažnosti, (-▲-) na 37°C, sa aeracijom na svakih dva sata po 5 sekundi i vlažnosti od 99,97%.

Da bi se utvrdilo vreme potrebno za postizanje stacionarne faze rasta ćelije *pdr5* soja kvasca su gajene na 30°C, bez prisustva vlažnosti. Prvih deset sati ćelije su inkubirane bez aeracije, a nakon toga kulture su aerisane po 5 sekundi svakih 2 sata upotrebom šejkera visoke frekvencije.



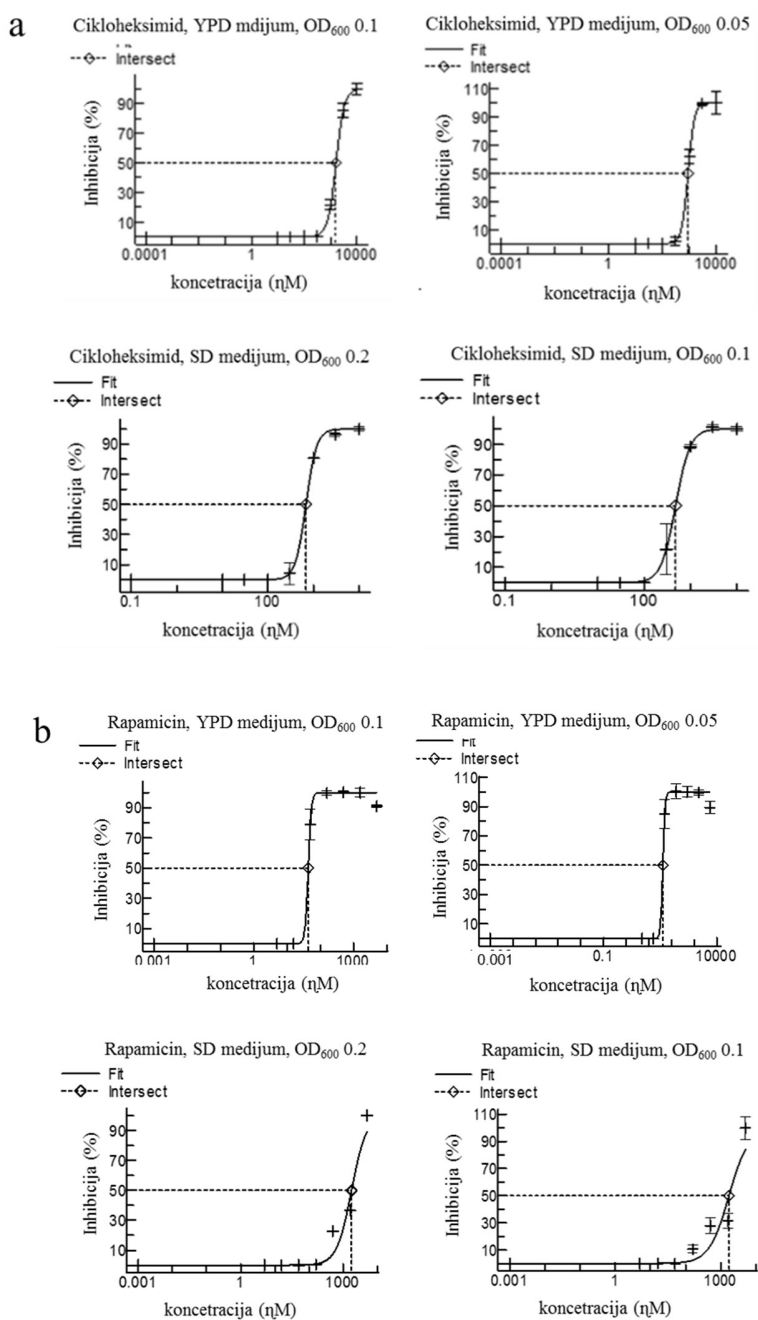
Slika 29. Kriva rasta kulture *pdr5* soja kvasca u bogatom (a) i minimalnom (b) medijumu u 8 µL volumena pri različitim početnim razblaženjima.

Rezultati prikazani na slici 29a i 29b su pokazali da je optimalna početna gustina kulture kvasca u opsegu od 0,05 do 0,1 u bogatom medijumu i 0,05 do 0,2 u minimalnom medijumu. Isto tako je primećeno da je kultura kvasca gajena u bogatom medijumu i posle 18 sati i dalje u eksponencijalnoj fazi rasta dok se u minimalnom medijumu, pri većim početnim gustinama, nakon 16 sati rast kvasca usporava. Dok pri nižim početnim razblaženjima aeracija ima jasan uticaj na eksponencijalni rast kvasca i izgled njegove krive rasta, u kulturama sa početnom gustinom od OD₆₀₀ 0,1 u bogatom, odnosno 0,2 u minimalnom medijumu može se primetiti da se njegov uticaj značajno smanjuje, kriva rasta je gotovo linearna.

4.2.4.5. *Određivanje IC₅₀ rapamicina i cikloheksamida*

Sa ciljem merenja inhibitorne koncentracije 50% korišćena su dva inhibitora rasta: rapamicin koji deluje direktno na rast i razmnožavanje kvasca inhibicijom mTOR signalnog puta, i cikloheksamid – inhibitor sinteze proteina (materijal i metode, poglavlje 3.2.8.4.).

Vrednosti prokazane na slici 30 predstavljaju srednju vrednost 4 bunarčića (n=4).

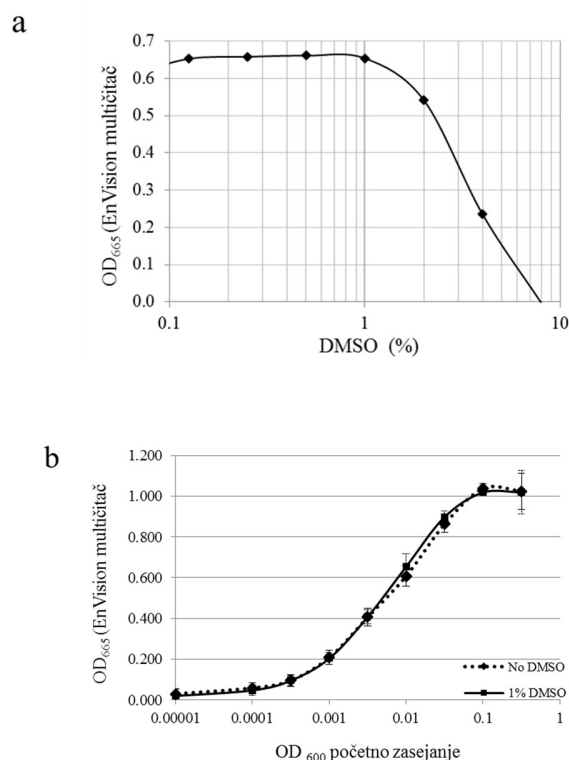


Slika 30. Uticaj početnih gustina ćelijske kulture *pdr5* soja kvasca na IC₅₀ vrednost cikloheksamida (a) i rapamicina (b) u bogatom (YPD) i minimalnom (SD) medijumu. Vrednosti na slici predstavljaju srednju vrednost izračunatu iz četiri uzorka (n=4).

TOR (eng. *Target Of Rapamycin*) signalni put reguliše ćelijski rast i proliferaciju. U povoljnim uslovima spoljašnje sredine, signalni put je aktivan i doprinosi rastu ćelije kroz pojačanu sintezu makromolekula (ribozoma i proteina) kao i ulaska nutrijenata u ćeliju. Koncentracija rapamicina potrebna da zaustavi rast ćelija u bogatom medijumu je u opsegu trocifrenih brojeva (150-500 nM). Kako medijum postaje siromašniji (bez prisustva većine amino kiselina, purinskih i pirimidinskih baza), ćelije sintetišu amino kiseline i nukleotide na osnovu dostupnih izvora azota i ugljenika, a TOR signalni put postaje manje važan za kontrolu rasta. Shodno tome IC_{50} vrednost u minimalnom medijumu značajno povećana (do 1700 nM). Vrednosti IC_{50} cikloheksamida su između 500 i 700 nM i zavise od gustine početne kulture kvasca.

4.2.4.6. Uticaj DMSO na rast kulture kvasca

Cilj ovog eksperimenta je bio da se odredi optimalna koncentracija DMSO koja ne utiče na rast ćelija kvasca (materijal i metode, poglavlje 3.2.8.5.).



Slika 31. Uticaj DMSO na optičku gustinu kulture *pdr5* soja kvasca u minimalnom medijumu (a). Rast kvasca sa i bez prisustva 1% DMSO (b).

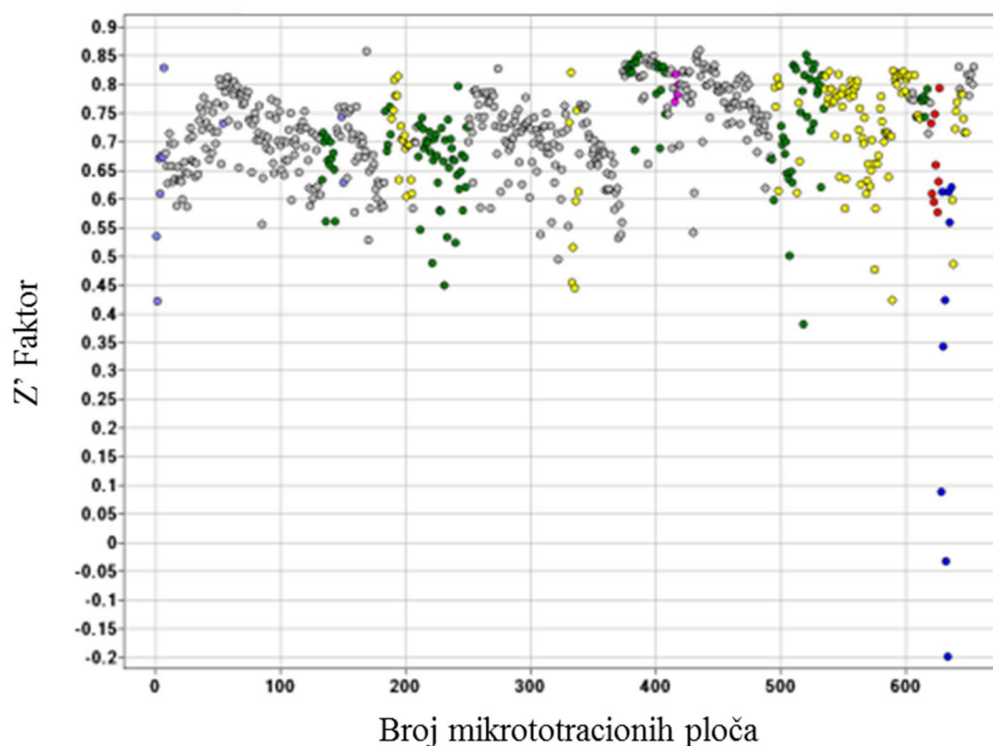
Kao i kod AlamarBlue® testa (Slika 17 i 17), rezultati predstavljeni na slici 31a, su pokazali da ćelije kvasca dobro tolerišu koncentracije do 1% DMSO i rastu podjednako dobro kao i u medijumu bez njegovog prisustva (Slika 31b).

4.3. Primarno testiranje inhibitorne aktivnosti Novartisove kolekcije jedinjenja

Iako je merenjem optičke gustine i fluorescentnog signala pokazana podjednako dobra osetljivost, zbog veličine eksperimenta, korišćen je alamarBlue® metod. Ova odluka je zasnovana na ograničenoj mogućnosti aeracije velikog broja ploča u ultra visoko automatizovanim uslovima testiranja, neophodnoj za postizanje jasne razlike između B i S vrednosti merenjem optičke gustine. Pored toga za alamarBlue® esej je potrebna manja količina medijuma i ispitivanih jedinjenja u odnosu na esej optičke gustine.

Kada se tretira veliki broj jedinjenja (broj mikrotitarskih ploča +100 po danu) i kada uslovi pod kojima se eksperiment izvodi mogu odstupati od standarda, Z' vrednosti ukazuju na kvalitet rezultata po ploči. Z' vrednost je statistička vrednost koja ukazuje na kvalitet eseja na osnovu dva parametra: dinamičkog odnosa i varijabilnosti prisutne u maksimalnom tj. minimalnom signalu (Zhang et al., 1999). Z' vrednosti iznad 0,5 ukazuju na visoko reproducibilan esej u kojem postoji jasna razlika između minimalnih (B) i maksimalnih (S) vrednosti kao i mala varijabilnost unutar njih. Ispod te vrednosti kvalitet eseja opada. Koristeći taj parametar, jedinjenja sa ploča koje su pokazale lošije statističke vrednosti nisu korišćena za dalja testiranja (Slika 32).

U primarnom testiranju ispitano je 1.101.408 jedinjenja na *pdr5* soju kvasca. Kvalitet dobijenih podataka, prikazanih kroz Z' vrednosti, se kretao od 0,5 do 0,9 (Slika 32). Dobijene vrednosti su u skladu sa Z' vrednošću dobijenom tokom razvijanja protokola eseja, a iznosila je oko 0,7. Jedinjenja su testirana u finalnoj koncentraciji od 20 μ M kao što je opisano u poglavlju 3.2.7.6. (materijal i metode). Svako jedinjenje je bilo zastupljeno samo jedanput, a aktivnim jedinjenjima su smatrana ona čija je inhibitorna aktivnost bila ispod definisane granične vrednosti ili veća od 50% (ispod – 50%) – materijal i metode, poglavlje 3.2.10.).

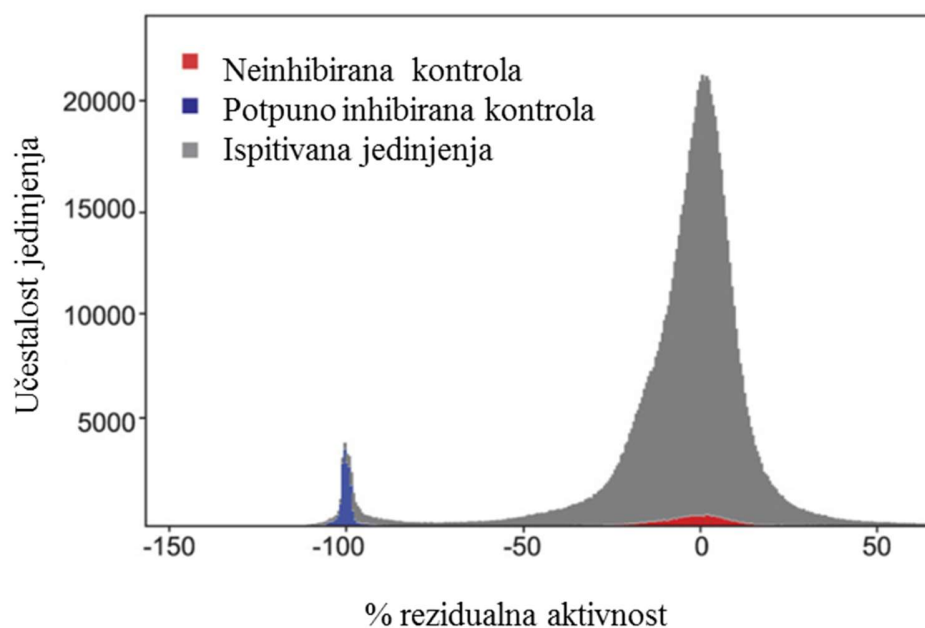


Slika 32. Statistički kvalitet primarnog testiranja. Svaka tačka na slici 32 predstavlja Z' vrednost pojedinačnih mikrotitracionih ploča, a njihova boja označava kojoj kolekciji hemijskih jedinjenja pripadaju.

Na osnovu Z' vrednosti primarno testiranje je zadovoljavajućeg kvaliteta, sa nekoliko izuzetaka (Slika 32), što je u saglasnosti sa prethodnim eksperimentima i slično sa podacima iz literature (Hamid et al., 2004).

Na slici 33 je prikazana distribucija jačina fluorescentnog signala svih jedinjenja, pri koncentraciji od 20 μM , iz primarnog testiranja. Najveći broj jedinjenja je grupisan oko neinhibirane kontrole što pokazuje da nemaju uticaj na rast kvasca. Pored toga je pokazano da 25.144 (2.28%) jedinjenja inhibiraju njegov intenzitet za više od 50% (ekvivalent inhibicije ćelijskog rasta). Vrh oko potpuno inhibirane kontrole predstavlja 9.912 (0,9%) jedinjenja sa > 90% inhibicije ćelijskog rasta i razmnožavanja (antifungalno delovanje). Na krajnjoj desnoj strani slike prikazano je ~ 10.000 jedinjenja u čijem je prisustvu fluorescentni signal bio jači (ekvivalent rasta do +50) što može da ukazuje na ili pojačanu metaboličku

aktivnost i rast kvasca ili na fluorescentni potencijal ispitivanog hemijskog jedinjenja. Svaka ploča sa 1536 bunarčića sadrži 24 bunarčića sa potpuno inhibiranom kontrolom (plavo - rast u prisustvu 100 μ M cikloheksamida) i 24 bunarčića sa neinhbiranom kontrolom (crveno - rast u prisustvu 1% DMSO).

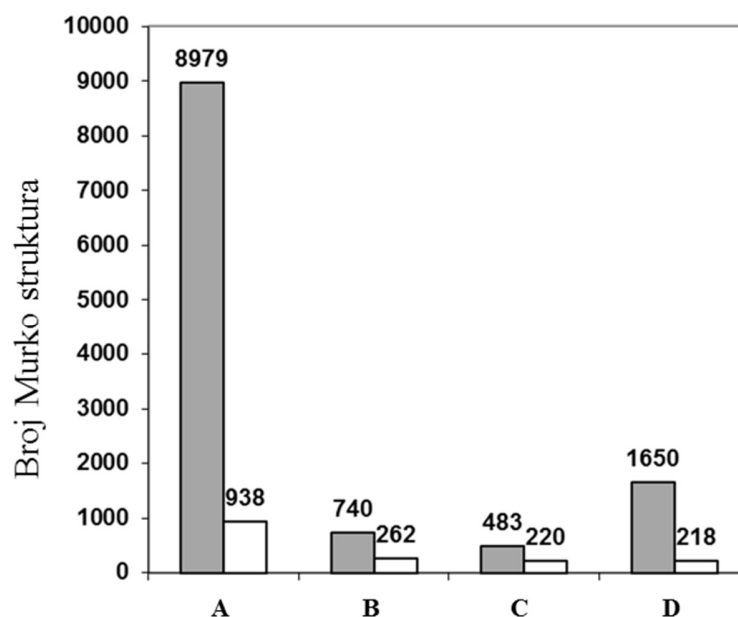


Slika 33. Rezultati primarnog testiranja 1,101,408 jedinjenja u ultra visoko automatizovanim uslovima. Aktivnost jedinjenja u inhibiciji rasta *pdr5* soja kvasca u primarnom testiranju. Korišćene su dve kontrole rasta: potpuno inhibirana kontrola (plavo) - ekvivalent inhibicije ćelijskog rasta = - 100%) neinhbirana kontrola (crveno) ekvivalent maksimalnog rasta = 0).

4.3.1. **Selekcija aktivnih jedinjenja iz primarnog testa korišćenjem Bemis i Murko kriterijuma**

Aktivna jedinjenja (25.144) dobijena primarnim testiranjem predstavljala su polaznu tačku za selekciju onih koji će se dalje ispitivati u validacionom testu praćenjem rasta kvasca merenjem fluorescencije (alamarBlue®) i optičke gustine kulture. Da bi se sagledala raznovrsnost njihovog delovanja na rast kulture bilo neophodno da se odaberu kandidati

različitih struktura. Cilj ovog pristupa nije bio da se odrede potencijalni budući lekovi već jedinjenja sa različitim inhibitornim dejstvom koja bi se koristila za dalje istraživanje signalnih puteva uključenih u inhibiciju rasta ćelija gljiva (antifungalno delovanje) i viših eukariota (citostatici). Zbog toga je od ukupnog broja aktivnih jedinjenja identifikovanih u primarnom testu odabrano ~ 10% za dalje ispitivanje.



Slika 34. Odnos ukupnog broja Bemis i Murko molekularnih struktura među aktivnim jedinjenjima dobijenim u primarnom testiranju u odnosu na listu jedinjenja odabranih za validacioni eksperiment. A, B, C, D predstavljaju 4 kolekcije jedinjenja korišćenih u primarnom testu. Sivom bojom je predstavljena primarna lista aktivnih jedinjenja; belom bojom jedinjenja odabrana za validacioni eksperiment.

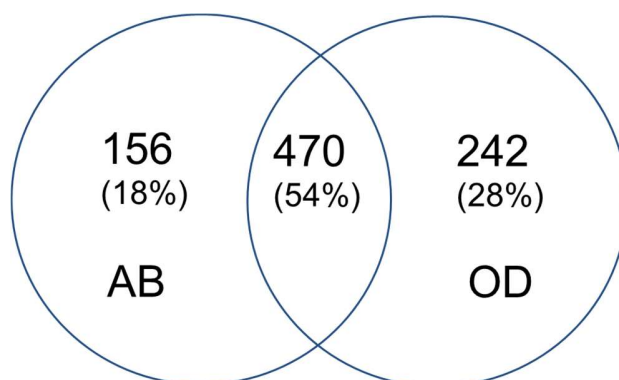
Važno je napomenuti da potentnost samih jedinjenja kao i povezanosti između njihove strukturne sličnosti i biološke aktivnosti (eng. *Structure activity relationship - SAR*) nisu bili glavni kriterijumi za odabir jedinjenja za dalje testiranje u validacionom eksperimentu. Za analizu različitosti, u ovom eksperimentu je korišćena definicija molekularnih struktura predložena od strane Bemis i Murko (Bemis, G.W. and Murcko, 1996) “Bemis i Murko strukture” predstavljaju osnovne strukture jedinjenja, molekularne prstenove kao i različite tipove atoma i veza kojima su povezani. Broj Bemis i Murko

struktura aktivnih jedinjenja iz primarnog testa kao i 1930 jedinjenja odabranih za dalju testiranje je predstavljena na slici 34.

Glavni cilj ovakvog odabira je da prati delovanje najraznovrsnijeg broja struktura iz testiranih kolekcija jedinjenja.

4.4. Validacioni eksperiment

U cilju sagledavanja inhibitornog potencijala 1.930 prethodno odabranih aktivnih jedinjenja dobijenih primarnom pretragom, testirane su njihove IC₅₀ vrednosti. Da bi se odredila koncentracija koja inhibira rast za 50%, kultura *pdr5* soja kvasca je gajena u prisustvu jedinjenja koja su serijski razblažena u opsegu od 20 µM do 6,3 nM (materijal i metode, poglavlje 3.2.1.), a inhibitorni efekat je određen na osnovu merenja fluorescentnog signala i optičke gustine.



Slika 35. Odnos rezultata dobijenih merenjem optičke gustine (OD) i fluorescentnog signala (AB - alamarBlue®). Od 868 jedinjenja 54% (470 jedinjenja) je potvrđeno u oba eseja. Kao gornja granica za procenu inhibitornog delovanja korišćene su vrednosti < -50%.

Na osnovu dobijenih rezultata jedinjenja sa potencijalom da inhibiraju rast kulture kvasca za 50% su svrstana u tri kategorije (materijal i metode, poglavlje 3.2.11.). Ukupno 154 jedinjenja prikazanih u prilogu 1 je inhibiralo rast kvasca sa IC₅₀ vrednostima ispod 10 µM (Kategorija I, jasno definisana IC₅₀ koncentracija u oba eseja). U prilogu 2 predstavljeno

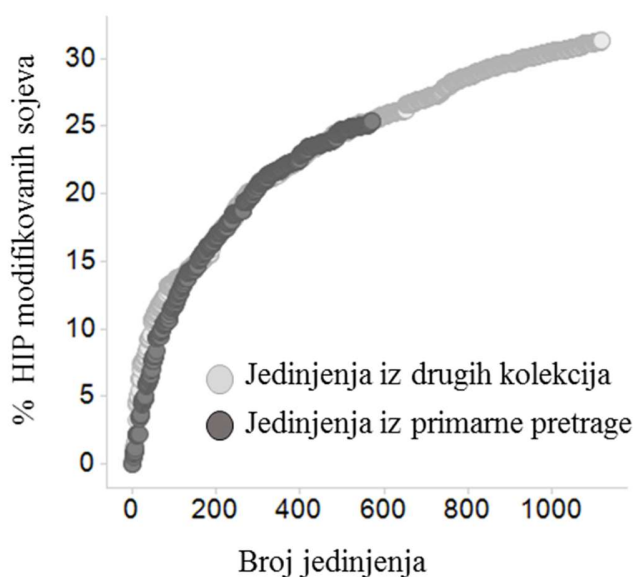
je dodatnih 316 jedinjenja koja su inhibirala ćelijski rast najmanje 50% (Kategorija II, < -50% u oba eseja). U prilogu 3 je prikazano 398 jedinjenja koja su inhibirala ćelijski rast najmanje 50% pri najvišoj testiranoj koncentraciji (20 μ M) bar u jednom eseju (Kategorija III, inhibicija < -50% u jednom od eseja). Veoma zanimljivo, od 1930 ukupno testiranih jedinjenja, njih 1062 (55%) nije dovelo do značajnije inhibicije ćelijskog rasta pri maksimalnoj koncentraciji od 20 μ M (Prilog 4).

Dobijeni rezultati su pokazali da od 1.930 (100%) odabranih jedinjenja iz primarnog testiranja inhibitorna aktivnost ($IC_{50} \leq 20 \mu M$) je potvrđena samo za njih 868 (45%) u barem jednom od eseja. Odnos aktivnih jedinjenja potvrđenih obema metodama je 54%, a broj onih identifikovanih samo jednom metodom je 242 (28%) merenjem optičke gustine odnosno 156 (18%) merenjem fluorescentnog signala. Dobijeni rezultati su pokazali da je metoda zasnovana na merenju optičke gustine osetljivija od merenja fluorescentnog signala (Slika 35, prilozi 1-4).

4.5. Raznovrsnost delovanja odabranih jedinjenja potvrđenih HIP metodom

Primarnim testiranjem je dobijeno 25.144 jedinjenja koja inhibiraju rast kvasca preko 50%. Od toga je validacionim eksperimentom, za koji su odabrana jedinjenja najraznovrsnijih hemijskih struktura, testirano 1930, a biološka aktivnost potvrđena u njih 868 sa ciljem da se pronađu novi načini delovanja na biosintetske puteve i/ili njihove komponente.

U nastavku istraživanja potencijal raznovrsnosti delovanja odabranih 572 jedinjenja je analiziran genomskom haplodeficijentnim metodom (Giaever et al., 1999; Pierce et al., 2007; Hoepfner et al., 2014) i upoređen sa profilom 1.118 molekula dobijenih iz različitih izvora, a koji su pokazali aktivnost prema kvascima (materijal i metode, poglavlje 3.2.12.). Potencijal raznovrsnosti je predstavljen kroz broj haplodeficijentnih sojeva kvasca sa smanjenim rastom (pod uticajem bioaktivnih molekula) u odnosu na ukupan broj testiranih sojeva.

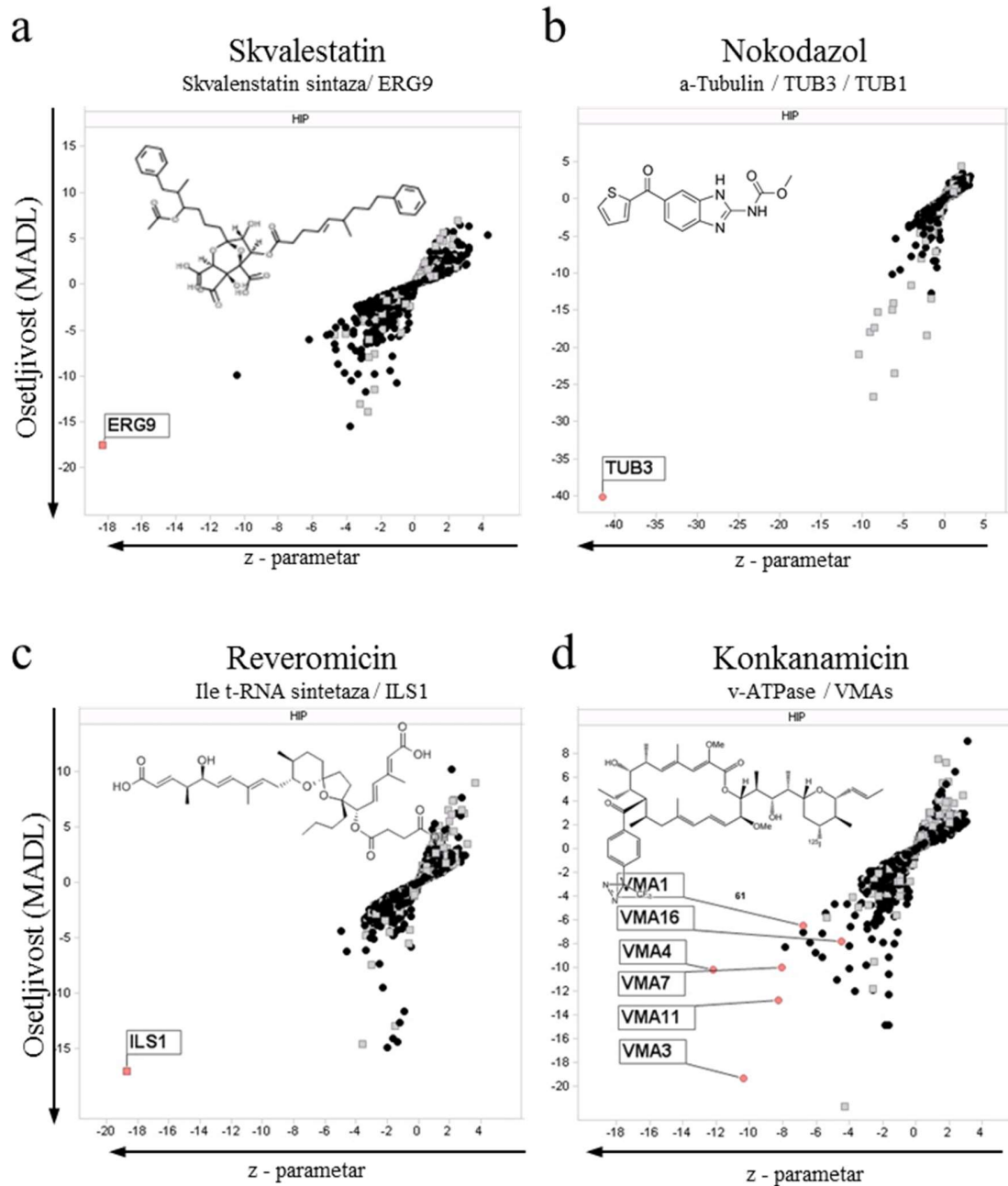


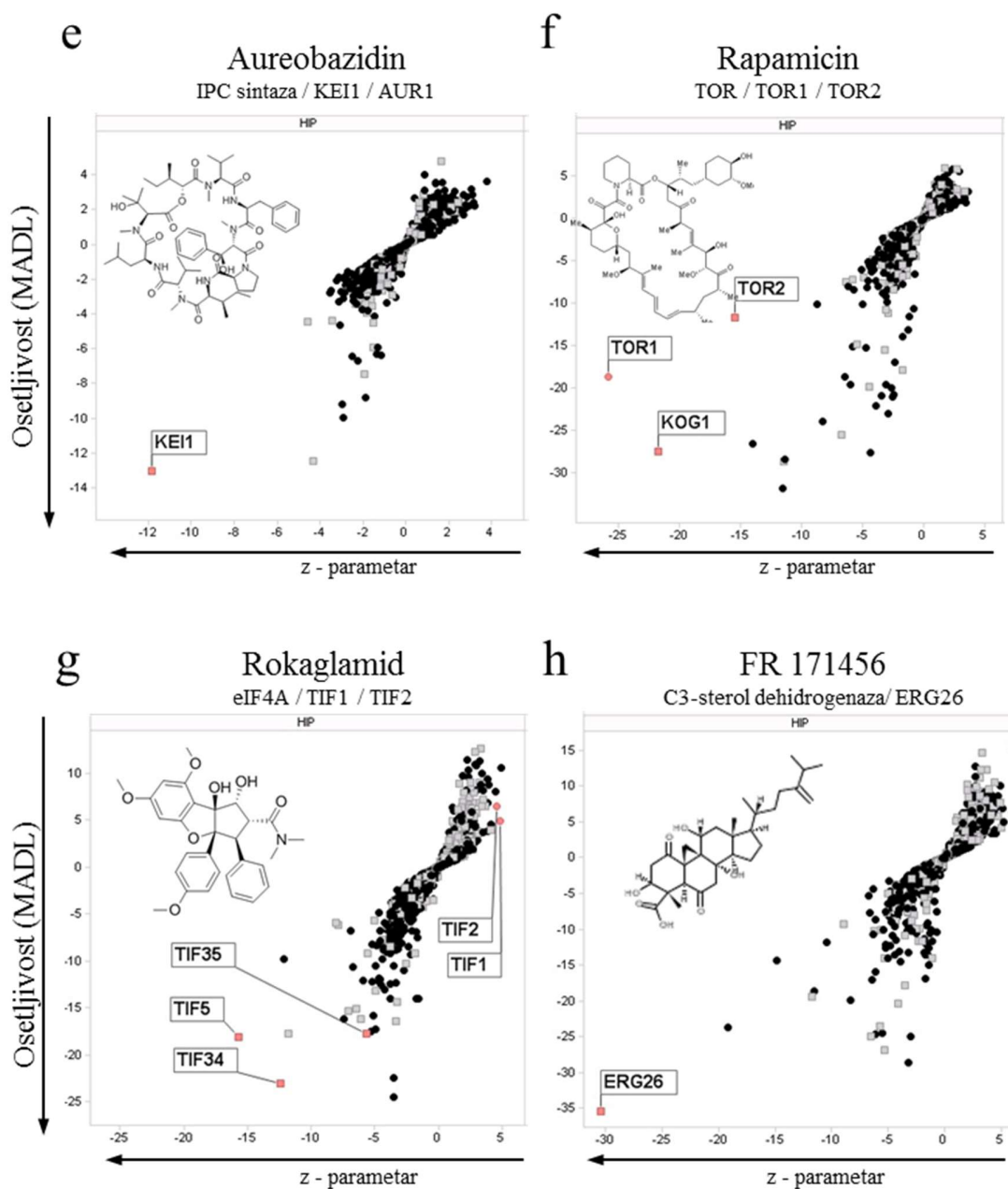
Slika 36. Procenat osetljivih haplodeficijentnih (HIP) sojeva kvasca u odnosu na broj testiranih jedinjenja. Osetljivi sojevi su imali vrednost z-parametra ≤ -5 .

Za određivanje stepena inhibicije rasta korišćen je parametar osetljivosti (z-parametar) koji može biti negativan (za osetljive sojeve) ili pozitivan (za rezistentne sojeve), a kao granična vrednost po kojoj se određuje da li je soj kvasca osetljiv ili otporan na delovanje ispitivanog jedinjenja uzimana je vrednost ≤ -5 , odnosno ≥ 5 (Hoepfner et al., 2014). Ovim je pokazano da odabrana jedinjenja iz primarnog testiranja pokazuju sličnu raznovrsnost delovanja kao i jedinjenja iz drugih izvora i deluju na $> 25\%$ proteina kodiranih u genomu kvasca.

4.5.1. *Mehanizam delovanja bioaktivnih jedinjenja*

Primenjivost i pouzdanost haplodeficijentne (HIP) metode je testirana profilisanjem jedinjenja sa poznatim mehanizmom delovanja, a geni na čije produkte deluju ispitivana jedinjenja su predstavljena na slici 37 a-f.





Slika 37. Primeri bioaktivnih jedinjenja sa poznatim mehanizmom delovanja (a-f) i kao i jedinjenja čiji precizan mehanizam delovanja nije dovoljno poznat (g i h). Sojevi koji nose gene esencijalne za preživljavanje su obeleženi crnim, a ne-esencijalni sivim krugovima. Sojevi osetljivi i/ili rezistentni na ispitivano jedinjenje su uokvireni crnim kvadratom. Na y-osi je predstavljena skala osetljivosti (MADL) sojeva kvasca na ispitivano jedinjenje u odnosu na neutralnu kontrolu. Z-parametar na x-osi pokazuje statističku meru, odnosno koliko često je rast specifičnog heterozigotnog soja inhibirana ispitivanim jedinjenjima.

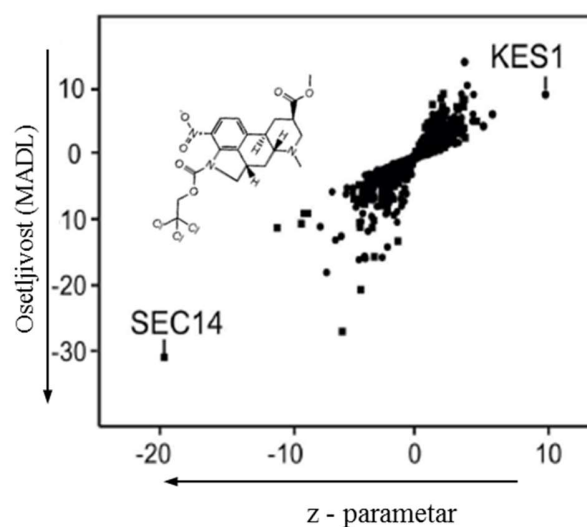
HIP profil Skvalestatina (zaragosična kiselina – eng. *zaragosic acid*) inhibira sintezu sterola kroz skvalen sintazu izdvajajući *ERG9* gen koji kodira skvalen sintazu – prvi korak nakon farnezil (eng. *farnesyl*) di-fosfataze u biosintezi ergosterola (Müllner et al., 2004; Yuan and Ching, 2015). (b) HIP profil Nokodazola (Saunders et al., 1997) koji deluje na polimerizaciju mikrotubula vezujući se sa visokim afinitetom za tubulinske dimere blokirajući njihovo formiranje – sojevi kojima nedostaje jedna kopija gena za alfa tubulin (*TUB3*) su značajno osetljiviji na dejstvo nokodazola (c) HIP profil Reveromicina (Miyamoto et al., 2002), u sisarskim ćelijama deluje na Ile-tRNA sintazu blokirajući kako sintezu proteina tako i rasta ćelija, dovodeći do nagomilavanja ćelija u G1 fazi, *ILS1* gen kodira tRNA^{Ile} sintetazu (IleRS). (d) HIP profil Konkanamicina (Zhang et al., 2008), inhibitora v-ATPase izdvaja *VMA1, 3, 4, 7, 11, 16* gene koji kodiraju v-ATPase subjedinice. (e) HIP profil Aureobazidina (Zhong et al., 2000; Sato et al., 2009) je izdvojio *KEI1*, gen koji kodira esencijalnu regulatornu komponentu inozitol fosforil-cerimid (ICP) sintaznog kompleksa koji spaja fosforilinozitol grupu sa cerimidom formirajući fosforil-cerimid, što je glavni korak u sintezi svingolipida. (f) HIP profil Rapamicina izdvaja tri komponente PI3K/AKT/mTOR signalnog puta, *TOR1, TOR2* (dele 67% identičnosti) i *KOG2* (Raptor u višim eukariotama) koji formira kompleks sa TOR1. Vezivanjem za TOR1 kompleks rapamicin inhibira njegovu aktivnost.

Za mnoge prirodne produkte koji se koriste u medicini je poznato da deluju na specifične molekularno biološke puteve, ali se pouzdano ne zna na koji protein. HIP metodom je bilo moguće izdvojiti gene koji kodiraju proteine koji predstavljaju moguće mesto njihovog delovanja. Na slici 37 predstavljeni su: (g) HIP profil rokglamida (Becker et al., 2016), inhibitora proteinske translacije, izdvaja *TIF5, TIF34* i *TIF35* gene koji kodiraju subjedinice eIF3 neophodne za formiranje 48S translacionog pre-inicirajućeg kompleksa (Farley et al., 2011). Pozitivan z-parametar (~ 5) za *TIF1* i *TIF2* gene ukazuje da njihov produkt eIF4A ima značajnu ulogu u mehanizmu delovanja ovog leka (Sadlish et al., 2013; Sen et al., 2015). Jedna kopija *TIF1/2* gena kodira smanjenu količinu proteina dovodeći do rezistencije na rokglamid smanjujući količinu eIF4A i snižavajući njegov dominantno negativni efekat na započinjanje translacije (h) HIP profil FR171456 (Hatori et al., 2004) inhibitora aktivnosti sterol-4-alfa-carboksilat-3-dehidrogenaze, izdvaja *ERG26* gen, Erg26p je deo sterol biosintetskog puta (Helliwell et al., 2015). Dobijeni rezultati su pokazali značajnost ovog pristupa.

4.5.2. Profil NGx04 jedinjenja

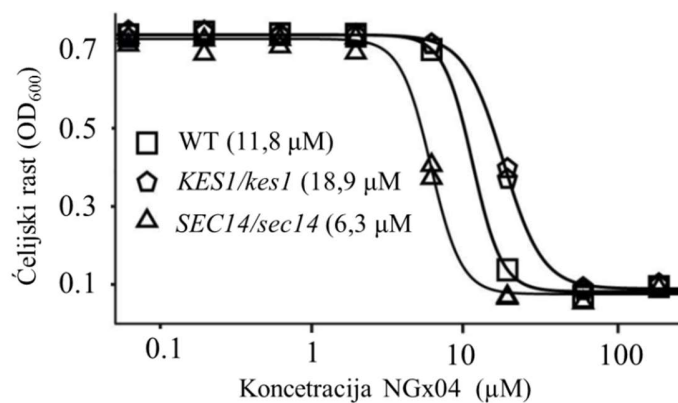
Pored prethodno testiranih molekula testirano je i NGx04 jedinjenje dobijeno primarnim testiranjem.

Ovo jedinjenje spada u grupu antifungalnih ergolina, a dobijeni HIP profil (z-parametar ~ -20) ukazuje da svoje inhibitorno delovanje ostvaruje kroz moguću interakciju sa produktom *SEC14* gena (Sec14p). Pored svoje najvažnije funkcije u lipidnom transferu, Sec14p je uključen u sekreciju faktora virulentnosti na osnovu kojeg gljivice kao što je *Cryptococcus neoformans* ostvaruju svoje patogeno dejstvo. Za razliku od njega, soj koji nosi jednu kopiju *KES1* gena, čiji proteinski produkt negativno reguliše Sec14p zavisnu sekreciju, ima povećanu otpornost na delovanje NGx04, z-parametar blizu 10 (Fang et al., 1996; Li et al., 2002).



Slika 38. HIP profil NGx04 jedinjenja, inhibitora Sec14p. Krugovi predstavljaju ne-esencijalne, dok kvadrati esencijalne gene. Naglašeno osetljivi sojevi se nalaze u donjem levom uglu, a naglašeno rezistentni u gornjem desnom uglu grafika.

Različita osetljivost wt i haplodeficijentnih *KES1/kes1* i *SEC1/sec1* sojeva je potvrđena testiranjem inhibitorne koncentracije (IC_{50}). NGx04 je imao najmanji uticaj na rast *KES1/kes1* soja (IC_{50} 18,9 μ M), a najviši na *SEC1/sec1* soj (IC_{50} 6,3 μ M).



Slika 39. Osetljivost wt, *SEC14/sec14* i *KES1/kes1* sojeva kvasca. Merjenjem optičke gustine OD₆₀₀ je prikazan rast sojeva kvasca u prisustvu rastućih koncentracija NGx04.

DISKUSIJA

5. DISKUSIJA

Ovaj rad je nastao kao deo projekta DMP (eng. *Development and Molecular Pathways*) grupe u okviru Novartisovog Instituta za BioMedicinska istraživanja (NIBR) sa ciljem da razvije platformu zasnovanu na upotrebi kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u istraživanju novih lekova i mehanizama njihovog delovanja na signalne puteve u ćelijama. Zbog konzerviranosti biosintetskih puteva, visoke prilagodljivosti i genetičke plastičnosti, kvasac je izuzetno pogodan jednoćelijski model organizam za ispitivanje jedinjenja sa antifungalnim i citostatskim dejstvom, kao i za istraživanje njihovog mehanizma delovanja (Voisset et al., 2014).

Visoko automatizovane pretrage su se pokazale veoma efikasnim u ispitivanju novih lekova, i kao takve, postale standardni procesi u farmaceutskim kompanijama, a sve više i u istraživačkim laboratorijama. Zasnivaju se na testiranju velikih kolekcija hemijskih jedinjenja i ispitivanju njihovog efekta na biološke ciljeve kroz upotrebu automatizacije, minijaturizacije i opsežne analize dobijenih podataka.

Za potrebe identifikacije jedinjenja sa potencijalnim antifungalnim i citostatskim dejstvom koriste se testovi koji prate ćelijsku proliferaciju (Kauffman and Zarins, 1999; Lall et al., 2013) i metaboličku aktivnost (Larson et al., 2004; Pham et al., 2009). U ovom radu su korišćene metode kojim se, kroz merenje ćelijske respiracije (alarBlue®) i optičke gustine, može pratiti rast i razmnožavanje ćelija kvasca u visoko automatizovanim uslovima.

alarBlue® se bazira na resazurinu, boji za koju je ćelijska membrana propustljiva, i koja koja se unutar ćelije redukcijom prevodi u rezorufin (redukovanu formu), crveno fluorescentno jedinjenje pomoću kojeg se može kvantitativno meriti ćelijska proliferacija i vijabilnost. alarBlue® metoda se podjednako uspešno koristi u bakterijskim, fungalnim, parazitskim i sisarskim sistemima (O'Brien et al., 2000; Sykes and Avery, 2009; Scherr et al., 2012; Lall et al., 2013; Bonnier et al., 2015). U odnosu na druge metode, alarBlue® je brza, jeftina i jednostavna za upotrebu, a zatim pogodna za korišćenje u visoko automatizovanim uslovima. Prednost ove metode je što se može koristiti i za kinetičke

studije jer njenim dodatkom ne dolazi do ćelijske smrti ili prestanka deobe. Kako nijedna metoda ne definiše potpuno ćelijsku vijabilnost za dalju proveru aktivnih jedinjenja dobijenih primarnim testiranjem, standardizovan je metod zasnovan na merenju optičke gustine. Merenje optičke gustine u kulturi ćelija se standardno koristi za procenu njihovog broja i brzine razmnožavanja. Ova metoda je veoma jednostavna, jeftina (ne zahteva upotrebu dodatnih hemikalija), i, kao i u slučaju fluorescentne metode, sa visokim potencijalom za upotrebu u ultra visoko automatizovanim uslovima.

5.1. Esej zasnovan na merenju fluorescentnog signala

Za razvoj alamarBlue® metode u visoko automatizovanim uslovima urađena je najpre serija eksperimenata u mikrotitarskim pločama sa 384, a zatim u 1536 bunarčića. Esej je optimizovan za dnevni ciklus, što znači da su ćelije gajene preko noći 16 sati, alamarBlue® boja je dodavana sledećeg dana ujutru, a fluorescentni signal meren nakon 3 sata inkubacije. Za razvoj eseja su korišćeni sojevi kvasca kojima nedostaju jedan (*pdr5*) ili dva (*pdr5snq2*) gena. Pored drugih proteina, kao što su PgP (P-glikoprotein), Snq2p i Pdr5p pripadaju ABC (ATP binding cassette) superfamiliji. Ovi proteini regulišu prolaz lekova i različitih fizioloških substrata kroz ćelijsku membranu, a dovode i do rezistencije na različite citotoksične i antifungalne lekove (Balzi et al., 1994; Cui et al., 1999).

Optimalna dužina inkubacije, kao i koncentracija alamarBlue® može varirati u zavisnosti od vrste ispitivanog mikroorganizma. Dužina inkubacije može biti od 20 minuta (*Prevotella. intermedia*) pa do 24 sata za *Mycobacterium tuberculosis*, a koncentracija alamarBlue® može ići i do 10% (Sykes and Avery, 2009; Lall et al., 2013). Na osnovu rezultata dobijenih kinetičkim merenjem tokom 4 sata pokazano da pri alamarBlue® koncentraciji 1,4% fluorescentni signal linearno raste bez znakova dalje redukcije alamarBlue® u nefluorescentni hidrozorufin (Slika 10). Najjači signal dobijen u prisustvu pufera pH 6,4, iznad te vrednosti signal je 5 puta niži. Ipak, na osnovu dodatnih testiranja (rezultati nisu prikazani), da bi se izbegla moguća saturacija multičitača koja posledično može da utiče na osetljivost samog testa, za dalje ispitivanje korišćen je pufer pH5,9. Pored dužine inkubacije, alamarBlue® koncentracija i puferisanje rastvora je bilo potrebno i neophodno za razvoj fluorescentnog signala. Rezultati predstavljeni na slici 11 prikazuju da

se i u odsustvu ćelija kvasca, pri rastućim koncentracijama alamarBlue®, nezavisno od medijuma koji se koristi (voda, minimalni ili bogati medijum), fluorescentni signal nelinearno razvija. Pri koncentracijama iznad 3% alamarBlue® utiče na redukciju sopstvenog signala. U isto vreme, interesantno je primetiti da je intenzitet bazalne fluorescencije različit u zavisnosti od sredine i pH vrednosti. Najviše vrednosti pokazuje u vodi, a najniže u minimalnom medijumu (Slika 11).

Na osnovu merenja različitih alamarBlue® koncentracija i početnih gustina suspenzije kvasca je uočeno da se optimalna početna gustina nalazi između OD₆₀₀ 0,01 i 0,015 (Slika 12). Niže vrednosti imaju slabiji signal što za posledicu može imati nedovoljno širok opseg minimalnog i maksimalnog signala, što direktno utiče na kvalitet eseja. Vrednosti iznad OD₆₀₀ 0,02 dovode do redukcije signala, najverovatnije zbog dalje transformacije fluorescentnog rezorufina u ne-fluorescentni hidrozorufin (O'Brien et al., 2000). Dalje je bilo neophodno potvrditi optimalnu alamarBlue® koncentraciju u kulturi kvasca gajenog u minimalnom medijumu u prisustvu tj odsustvu pufera. Slično rezultatima prikazanim na slici 11, u prisustvu ćelija, optimalna koncentracija alamarBlue® je između 1 i 4%, a adekvatnim puferisanjem signal je bio deset puta jači u odnosu na medijum bez pufera.

Dalja standardizacija eseja je nastavljena u mikrotitarskim pločama sa 1536 bunarčića. U ovim uslovima, gde je volumen medijuma u kome se inkubiraju ćelije kvasca smanjen 3 puta, ponovo su ispitivani parametri prethodno definisani u pločama sa 384 bunarčića. Interesantno je primetiti da je u ovom formatu, u odnosu na ploče sa 384 bunarčića pufer pH 6,4 je bio bolji za razvoj fluorescentnog signala u odnosu na pH 5,9, a više vrednosti su dobijene korišćenjem alamarBlue® koncentracije 6% u odnosu na 3% nakon tri sata inkubacije. Ipak, četvoročasovna inkubacija je uslovlila opadanje signala za 30%. Obzirom da je sličan efekat primećen pri istoj koncentraciji na pH 5,9, prepostavili smo da je pri inkubaciji dužoj od 3 sata alamarBlue® uticao na redukciju sopstvenog signala pre nego da je taj efekat izazvan daljom redukcijom rezorufina u hidrozorufin. Na ovaj zaključak navodi i činjenica da pri istoj dužini inkubacije sličan efekat nije primećen pri koncentracijama alamarBlue® od 3% ili 1,5% na pH 6,4 (Slika 14). U tom smislu, iako je najjači signal dobijen pri alamarBlue® koncentraciji od 6%, obzirom na to da stabilnost signala nije bila postojana u odnosu na dužinu inkubacije, za izvođenje eseja u visoko automatizovanim uslovima, 3% alamarBlue® pri pH 6,4 predstavlja gornju granicu. U

daljim eksperimentima je testiran odnos gustine početne kulture wt soja kvasca u odnosu na alamarBlue® koncentraciju i njegov uticaj na kvalitet eseja – izračunavanjem Z' vrednosti (Slika 15). Dobijenim rezultatima je pokazano da gustina početne kulture mora biti iznad OD_{600} 0,005 i ne viša od 0,03, što je važno u kontekstu izvođenja ultra visoko automatizovanog eseja sa velikim brojem mikrotitarskih ploča po danu. Takođe je uočeno da se pri finalnoj koncentraciji alamarBlue® od 1,5% može pratiti rast kvasca pri najširem opsegu gustina početnih kultura sa Z' vrednošću $> 0,68$ (Slika 15). Uzimajući u obzir da vrednosti iznad 0,5 ukazuju na dobar esej, koncentracija alamarBlue® od 1,5% pokazala se dovoljnom za uspostavljanje finalnih uslova testiranja.

U cilju korišćenja soja kvasca sa većom propustljivošću ćelijske membrane, poredili smo rast wt sa dva soja kvasca kojima je uklonjen jedan (*pdr5*) ili oba gena (*pdr5snq2*) odgovornih za multirezistenciju na lekove u prisustvu rastućih koncentracija DMSO. Zbog svoje sposobnosti da rastvori jedinjenja sa različitim hemijskim karakteristikama, niske isparljivosti i toksičnosti kao i sposobnosti da se meša sa vodom bez stvaranja tečnih faza, DMSO je najšire korišćeni organski rastvarač za rastvaranje i čuvanje hemijskih jedinjenja (Waybright et al., 2009). Osetljivost mikroorganizama na DMSO je različita (Sykes and Avery, 2009; Beaumont et al., 2013). Da bi odredili inhibitorni efekat samog jedinjenja testirali smo različite koncentracije DMSO kako bi pronašli onu koja ne utiče na rast i razmnožavanje ćelija kvasca. Osetljivost *pdr5snq2* je značajno veća u odnosu na wt i *pdr5* sojeve, što ukazuje da Snq2p možda ima ulogu u DMSO efluksu. Jasno smanjena Z' vrednost pri koncentracijama DMSO već između 0,5 - 1% ukazuje da ovaj soj kvasca nije pogodan da testiranje rasta pri koncentracijama DMSO iznad 0,5% (Slika 16). Sa druge strane, korišćenjem wt i *pdr5* soja Z' vrednosti nisu smanjene pri koncentraciji DMSO od čak 2%, shodno time ova dva soja se mogu koristiti u prisustvu finalne koncentracije 1% DMSO (Slika 16). Obzirom na to da *pdr5* soj daje širu mogućnost za detekciju biološki aktivnih jedinjenja u odnosu na wt, *pdr5* soj je korišćen za dalju standardizaciju eseja. Finalnom optimizacijom je pokazano da izvođenje eseja u smanjenom u volumenu ćelijske kulture, u svega 4 μ L/bunarčiću nije uticalo na njegov kvalitet, Z' vrednost je bila $> 0,65$ (Slika 17). Da je DMSO koncentracija od 1% optimalna za finalne uslove testiranja je potvrđeno ispitivanjem uticaja DMSO koncentracije na određivanje IC_{50} vrednost cikloheksamida (Slika 18).

U uslovima ultra visoko automatizovanih testiranja velikih kolekcija od preko 1.000.000 jedinjenja, jedinjenja se ispituju pojedinačno, samo u jednom bunarčiću. Da bi utvrdili reproducibilnost primarnog testiranja najpre je testirano 9.856 jedinjenja u tri odvojena eksperimenta izvedena pod istim eksperimentalnim uslovima. Zatim je 4.224 jedinjenja testirano u dva eksperimenta izvedena pod istim eksperimentalnim uslovima, dok su u trećem eksperimentu, pre dodavanja kulture kvasca, mikrotitarske ploče sa pipetiranim jedinjenjima ostavljene preko noći u hladnoj sobi na temperaturi od 4°C. Uzimajući u obzir rezultate prikazane na slikama 19 a i b, očekivani procenat lažno pozitivnih rezultata je do 20% ukoliko je esej urađen u skladu sa standardnom procedurom i ukoliko je produženo čuvanje mikrotitarskih ploča sa jedinjenjima izbegnuto (Woodward et al., 2006; Gilbert et al., 2011).

5.2. Esej zasnovan na merenju optičke gustine

Obzirom na to da je optička gustina podložna uticaju obojenih komponenti iz medijuma koji se koristi za gajenje kulture kvasca, najpre se ispitivao apsorpcioni i transmisioni spektar dva medijuma – bogatog i minimalnog. Dobijeni rezultati su pokazali da se širok apsorpcioni spektar može koristiti za praćenje ćelijskog rasta u minimalnom medijumu. Sa druge strane, u bogatom medijumu se apsorpcija svetlosti značajno povećava, a transmisija smanjuje na talasnim dužinama ispod 650 nm. Shodno tome, da bi se izbegao uticaj medijuma na dobijene rezultate, za merenje optičke gustine ćelijske kulture u bogatom medijumu je preporučljivo korišćenje filtera sa talasnim dužinama iznad 700 nm (Slika 20 i 21). Dalja merenja optičke gustine rastućih razblaženja ćelijskih kultura u seriji različitih volumena su pokazala da spektrofotometar EnVision 2100 (Perkin Elmer), korišćenjem filtera od OD₆₆₅, nije dovoljno osetljiv za merenja optičkih gustina ispod OD₆₀₀ 0,005 u bogatom i 0,01 u minimalnom medijumu (Slika 22).

U pločama sa 96 bunarčića suspenzije ćelija kvasca rastu podjednako dobro u ispitivanim volumenima i pri početnoj gustini od OD₆₀₀ 0,05 do 0,2 kako u bogatom tako i u minimalnom medijumu. Ipak uočeno je da su kulture gajene u minimalnom medijumu imale duže vreme generacije, a krive rasta su bile manje uniformne u odnosu na bogati

medijum (Slika 23). Za dostizanje stacionarne faze rasta u bogatom medijumu bilo je potrebno 9 a u minimalnom medijumu 13 sati. Isto tako je pokazano da je za postizanje najvećeg dinamičkog odnosa (S/B) preporučljivo koristiti početne kulture gustine od OD_{600} 0,1 do 0,05 u bogatom, odnosno 0,2 do 0,1 u minimalnom medijumu (Slika 24).

Jedan od osnovnih nedostataka merenja optičke gustine je neadekvatna preciznost pri velikoj gustini kulture (iznad OD_{600} 2). Samim tim, u slučaju prisutnosti velikog broja ćelija u suspenziji, optičko merenje može dati pogrešne rezultate i umanjiti osetljivost testa. Radi toga je važno odrediti optimalnu dužinu inkubacije i meriti optičku gustinu neposredno pre dostizanja stacionarne faze rasta, kada je dinamički odnos između minimalnog i maksimalnog signala najveći.

Sa povećanjem broja bunarčića u mikrotitarskim pločama (96→384→1536), fizički faktori kao što su volumen medijuma, evaporacija, temperatura i aeracija imaju veći uticaj na rast i razmnožavanje ćelija kvasca, kao i na osetljivost mernog instrumenta. Slično rezultatima iz literature (Petersen and Nguyen, 2005), u mikrotitracionim pločama formata 1536 bunarčića uočeno je da osetljivost optičkog merenja raste sa dužinom svetlosnog puta, što znači da maksimalan volumen tečnosti daje najpreciznije optičke vrednosti pri svakoj gustini kulture (Slika 25). U isto vreme, sa povećanjem volumena tečnosti primećeno je da se povećava i dinamički odnos. To je najjasnije prikazano kroz odnos maksimalnog i minimalnog signala i Z' vrednosti (Zhang et al., 1999) u 8 μ L suspenzije kvasca (Slika 26). Na slici 27, pri maksimalnom rastu, uočen je jasan „ivični efekat“ koji je najčešće posledica evaporacije u perifernim bunarčićima mikrotitarske ploče. Iako sa vidljivim „ivičnim efektom“ i varijabilnim rezultatima, statistički kvalitet eseja bio solidan sa Z' od 0,67, ovaj eksperiment je neophodno uraditi pre svakog izvođenja eseja iz dva razloga: najpre, da bi se ispitala preciznost automatskog pipetora, a zatim i potencijalni uticaj vlažnosti vazduha na evaporaciju. Osim što smanjuje početni volumen tečnosti, evaporacija takođe povećava koncentraciju medijuma i metaboličkih produkata koji nastaju kao posledica rasta i razmnožavanja ćelija kvasca. Time se stvara volumenski i koncentracijski gradijent između periferno i centralno postavljenih bunarčića, što za posledicu ima promenu osmotskog pritiska, povećanje koncentracije aktivne supstance, smanjeno preživljavanje ćelija i lošiji kvalitet signala, a samim tim i eseja. Za smanjenje evaporacije preporučuje se skraćeno vreme inkubacije, povećanje vlažnosti vazduha u inkubatoru, ili upotreba polupropustljive adhezivne trake.

Kao što je pokazano na slici 29, početne gustine kulture kvasca ispod OD_{600} 0,01 u bogatom i 0,02 u minimalnom medijumu daju nedovoljan dinamički odnos S/B. Sa druge strane, pri višim početnim gustinama ćelije koriste više hranljivih supstanci iz medijuma što rezultira ranijim zaustavljanjem rasta. Obzirom na to da je osetljivost eseja najbolja pri višim volumenima ćelijske kulture, a da bi obezbedili dovoljno hranljivih materija i kiseonika, rast kulture kvasca je praćen u 8 μ L. Merenjem optičke gustine je pokazano da je optimalna početna gustina u opsegu od OD_{600} 0,05 do 0,1 za bogati medijum i 0,1 do 0,2 za minimalni medijum (Slika 29). Ova fleksibilnost je izuzetno važna u uslovima visoko automatizovanog zasejavanja od preko 100 mikrotitarskih ploča po danu. Takođe, uočena je i važnost aeracije, posebno pri nižim početnim gustinama kulture. Tokom prvih deset sati inkubacije ćelije su rasle sporo, da bi ušle u eksponencijalnu (log) fazu rasta čim su bile izložene aeraciji.

Za određivanje IC_{50} korišćeni su rapamicin i cikloheksamid čiji je antiproliferativni efekat već opisan u literaturi (Fried and Warner, 1982; Kunz and Hall, 1993). IC_{50} vrednosti rapamicina u bogatom su do 10 puta manje u odnosu na minimalni medijum. U minimalnom medijumu izvor azota i ugljenika je dostupan samo kroz njihove soli, zbog toga ćelije ulažu dodatnu energiju za sintezu građivnih komponenti proteina i nukleinskih kiselina. Obzirom da je sredina siromašna hranjivim materijama, aktivnost mTOR signalnog puta je smanjena pa je shodno tome IC_{50} vrednost rapamicina u minimalnom medijumu značajno povećana. Za cikloheksamid, sa povećanjem početne gustine kulture kvasca raste i vrednost IC_{50} (Slika 30).

Slično fluorescentnom eseju, a potvrđeno rezultatima predstavljenim na slikama 16 i 17, ćelije *pdr5* soja kvasca dobro tolerišu koncentracije DMSO do 1% i rastu podjednako dobro kao i u medijumu bez njegovog prisustva (Slika 31 a i b). Sve koncentracije iznad te vrednosti utiču na ćelijski rast i zbog toga nisu preporučljive za izvođenje eseja.

5.3. Primarno i validaciono testiranje

Iako su obe metode dale dobre rezultate u visoko automatizovanim uslovima, prevladalo je mišljenje da je za primarno testiranje bilo praktičnije koristiti merenje fluorescentnog signala. Za ovu metodu nije bila potrebna dodatna aeracija za postizanje

dobre dinamičke razlike između minimalnog i maksimalnog signala rasta i kvaliteta eseja (Z' faktor). Pored toga, utrošak količine ispitivanih jedinjenja je bio duplo manji.

Za testiranje inhibitorne aktivnosti 1.101.408 jedinjenja korišćene su mikrotitarske ploče sa 1536 bunarčića. Svako jedinjenje je testirano samo jednom, a jedinjenje čiji je inhibicioni efekat na rast ćelija kvasca bio ispod granične vrednosti $GV = \mu s - 3 \times StDEV$ ili ispod - 50% je smatrano aktivnim (materijal i metode, poglavlje 3.2.9.2.). Od ukupnog broja testiranih jedinjenja, 25.144 (2,28%) je klasifikovano kao inhibitori. Ukupan broj aktivnih jedinjenja se činio relativno visok ali ne i neočekivan kada se poredi sa istim esejom u sisarskim ćelijama pri sličnom inkubacionom periodu i istoj finalnoj koncentraciji 20 μM (interna komunikacija).

Kako je svrha ovog projekta da se pronađu jedinjenja koja će se koristiti za istraživanje modulacije signalnih puteva uključenih u proliferaciju, odnos između njihove strukture i aktivnosti nije bio glavni kriterijum za odabir onih koji će se dalje testirati. Na osnovu strukturne različitosti definisane Bemis i Murko kriterijumima (Bemis and Murcko, 1996), za dalje testiranje je odabrano 1.930 jedinjenja (Slika 34).

Od 1.930 (100%) odabranih aktivnih jedinjenja iz primarnog testiranja, inhibitorna aktivnost ($IC_{50} < 20 \mu M$) je bila potvrđena za samo 868 jedinjenja (45%) u bar jednom od eseja dok su obe metode dale iste rezultate u 54%. Dodatnih 28% aktivnih jedinjenja je potvrđeno samo merenjem optičke gustine, a 18% merenjem fluorescentnog signala. Interesantno je primetiti da je aktivnost značajnog broja odabranih jedinjenja potvrđena samo merenjem optičke gustine. Nepodudarnost dobijenih rezultata može poticati od specifičnosti metode, reagensa i različitih početnih gustina kulture, ali isto tako i od fizičkih faktora kao što su evaporacija i temperatura na koje su eseji izvedeni u visoko automatizovanim uslovima, u svega nekoliko mikrolitara ćelijske kulture, posebno osetljivi. Pre nego što se donese ovakav zaključak, smatrali smo da se ove razlike mogu objasniti kroz prirodnu varijabilnost samog eseja, što je takođe potvrđeno prethodnim eksperimentima izvedenim pod identičnim uslovima na istoj kolekciji jedinjenja (Slika 19a). Druga mogućnost je da razlika u rezultatima potiče od jedinstvene karakteristike samog jedinjenja. Na primer, ona koja interferiraju sa enzimima koji učestvuju u razvoju signala ili utiču na promenu boje medijuma mogu oslabiti signal i dati lažno pozitivne ili negativne rezultate (Auld et al., 2008). Iz literature je poznato da resazurin određuje broj vijabilnih ćelija kroz njegovu redukciju u rezorufin, visoko fluorescentnu boju, pomoću enzima diaforaza

(O'Brien et al., 2000; Villegas et al., 2005). Jedinjenja koja moduliraju aktivnost diaforaza i drugih reduktaza mogu uticati na razvoj signala u oba pravca. Povećana aktivnost ovih enzima može dovesti do pojačanog signala i lažno negativnog rezultata, ali isto tako, smanjena aktivnost ovih enzima može dovesti do lažno pozitivnog rezultata (izostanak fluorescentnog signala). Takođe, varijabilnost može nastati ukoliko jedinjenje menja pH vrednost medijuma. Kako jačina fluorescentnog signala zavisi od pH vrednosti, on može biti redukovan ukoliko reakciona sredina nije optimalno puferisana.

Kao alternativni esej, merenje optičke gustine direktno meri rast i razmnožavanje kulture kvasca. Ova metoda je veoma jednostavna i pogodna za ultra visoko automatizovane uslove jer ne zahteva dodatne reagense i međukorake. Njenom primenom se takođe minimalizuje efekat jedinjenja i medijuma na krajnji rezultat i isključuju artefakti koji mogu nastati merenjem fluorescencije. Ipak, u mikrotitarskoj ploči sa 1536 bunarčića, ovaj esej je veoma osetljiv na prisustvo mehurića vazduha i nehomogenu distribuciju ćelija u samom bunarčiću (Petersen and Nguyen, 2005). Mehurići vazduha prelamaju svetlost slično ćelijama kvasca, a njihov broj, posebno u gustim kulturama, može biti veoma visok (Fleming et al., 2008). Upotreba centrifuge u cilju eliminacije mehurića nije unapredila kvalitet eseja, ili je čak bila kontraproduktivna jer su ivične sile preusmerile ćelije u pravcu zidova bunarčića u zavisnosti od njegovog položaja u samoj mikrotitarskoj ploči. Korišćenjem V-prep visokofrekventnog vorteksa 5 sekundi svakih dva sata ovaj efekat nije primećen, a imao je nekoliko pozitivnih efekata. Ćelije su resuspendovane što je suspenziju kvasca homogenizovalo, a da nije došlo do povećanog stvaranja mehurića (vizuelna inspekcija). U isto vreme ćelije su bile izložene dodatnom kiseoniku neophodnom za njihov rast i razmnožavanje.

Validacioni eksperimenti, gde svaki dobijeni rezultat predstavlja srednju vrednost 4 bunarčića ($n=4$), su pokazali da i eventualno prisustvo mehurića nije uticalo na kvalitet eseja i definisanje IC_{50} . Na osnovu toga, a da bi se minimalizovali efekti spoljašnjih faktora koji za posledicu mogu uticati na dobijanje lažno negativnih rezultata, preporučljivo je da se ovi testovi izvode u triplikatu ili kvadriplikatu.

Doprinos značajnom odstupanju od 55% u osetljivosti primarnog i validacionog testa se može objasniti pilot eksperimentima (Slike 19a i 19b) kao i podacima dobijenim u literaturi (Woodward et al., 2006; Fleming et al., 2008). Tokom izvođenja primarnog testiranja, a usled velikog broja ploča, vreme proteklo od momenta pipetiranja jedinjenja u

mikrotitarske ploče i dodatka ćelijske kulture kvasca je bilo različito. Produženo čuvanje ploča nakon distribucije jedinjenja povećava broj lažno pozitivnih rezultata za 50% (Slika 19b). Drugi razlog za smanjenu osetljivost validacionog u odnosu na primarni test može biti obogaćenost Bemis i Murko struktura tokom *in silico* odabira. Primarni cilj ovog projekta je bio da se odabere najveći broj najraznovrsnijih jedinjenja što ima za posledicu da je svaka struktura predstavljena sa svega nekoliko sličnih jedinjenja, testiranih samo jednom ($n=1$) u primarnom testiranju, što povećava šansu da je slaboaktivno jedinjenje odabrano kao predstavnik određene strukture. Zatim, strukture predstavljene manjim brojem jedinjenja ili samo jednim jedinjenjem, su zastupljenije u validacionoj listi. Ukoliko su ova jedinjenja bila lažno pozitivna u primarnom testiranju podudarnost rezultata dva testiranja je bila smanjena.

Primarni i validacioni testovi su dali dragocen doprinos u određivanju značajnog broja jedinjenja za dalje ispitivanje njihovog načina delovanja u specifičnim eukariotskim ćelijama. Od 1.930 jedinjenja koji inhibiraju ćelijski rast za $\geq 50\%$ pri koncentraciji od 20 μM identifikovano je 45%, odnosno 868 molekula (slika 35).

5.4. *Haplodeficientno profilisanje*

Metodom haplodeficientnog profilisanja je pokazano da 572 odabranih jedinjenja pokazuju sličnu raznovrsnost delovanja kao i kolekcija od 1.118 bioaktivnih jedinjenja dobijenih iz drugih izvora (slika 36). To ukazuje na značajan potencijal delovanja na različite proteine uključene u proces rasta i razmnožavanje ćelija kvasca.

Obzirom na to da je homologiju između proteina uključenih u vitalne biohemijske procese u sisarskim i ćelijama kvasca visoka, ova metoda se može uspešno koristiti, kako u ispitivanju mehanizma delovanja jedinjenja specifičnih za sisarske ćelije, tako i onih sa antifungalnim dejstvom (slika 37 a-h). Razumevanje načina na koji jedinjenja dobijena primarnim testiranjem utiču na signalne puteve i njihove komponente je pomoglo da se identifikuju novi proteini na koje se može delovati, a u isto vreme omogućilo funkcionalnu identifikaciju prethodno nedefinisanih otvorenih okvira čitanja u *S. cerevisiae* (Hoepfner et al., 2012a, 2012b; Richie et al., 2013; Sadlish et al., 2013; Helliwell et al., 2015).

Poreklom iz primarnog testiranja, haplodeficientnom metodom je profilisano nekoliko antifungalnih jedinjenja koji deluju na Erg1 lp enzim slično azolnim jedinjenjima

(Hoepfner et al., 2012a) ili koji pripadaju triazolopirimidin-sulfonamidnoj klasi (Richie et al., 2013). Pored njih, profilisano je još jedno novo antifungalno jedinjenje NGx04 koje deluje na Sec14p (Slika 38 i 39). Mutagenezom *SEC14* gena kao i *in silico* analizom strukture Sec14p iz rezistentnih sojeva kvasca je pokazano da se NGx04 vezuje za amino kiselinske ostatke u lipidnom džepu Sec14p proteina. Daljim eksperimentima je pokazano da je strukturna konfiguracija ovih amino kiselina većinom karakteristična za patogene gljive, čime je objašnjena njegova antifungalna specifičnost, kao i manja citotoksičnost prema humanim ćelijskim linijama. Antifungalna aktivnost je potvrđena testiranjem jedinjenja na dva klinička izolata *Cryptococcus neoformans* (Filipuzzi et al., 2016).

Ovim bi zaključili da eksperimenti opisani u ovom radu pokazuju da su eseji zasnovani na optičkoj gustini i fluorescenciji (redukciji resazurina) pogodni za visoko automatizovane uslove testiranja (Petrovic et al., 2017). Oni su jednostavni za upotrebu i koriste jeftine i netoksične materijale. Ipak, nijedna od ovih metoda nije neosetljiva na artefakte nastale usled specifične fizičke i hemijske prirode hemijskih jedinjenja, preciznosti automatizovane tehnologije i fizičkih faktora kao što su evaporacija i temperatura. Predstavljeni rezultati jasno ukazuju na visoku osetljivost metoda na uslove pod kojima se izvode te i na neophodnost kontrole opisanih parametara tokom izvođenja eksperimenata i adekvatne interpretacije dobijenih vrednosti u skladu sa tim.

ZAKLJUČCI

6. ZAKLJUČCI

Iz rezultata dobijenih ispitivanjem faktora koji utiču na rast i deobu *S. cerevisiae* primenom alamarBlue® i merenja optičke gustine, kao i njihove upotrebljivosti za testiranje velikog broja malih molekula koji deluju inhibitorno na njegov rast i razmnožavanje, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. alamarBlue® metoda za praćenje ćelijske vijabilnosti, u mikrotitarskim pločama sa 384 bunarčića, daje najbolje rezultate kada se početna kultura kvasca optičke gustine OD₆₀₀ vrednosti od 0,01 do 0,015 gajila u volumenu od 12 µL tokom 16 sati, a pre očitavanja fluorescentnog signala, suspenzija inkubirala tokom tri sata u 3% rastvoru alamarBlue® i 150mM fosfatnom puferu pH 5,9.
2. alamarBlue® metoda za praćenje ćelijske vijabilnosti, u mikrotitarskim pločama sa 1536 bunarčića, daje najbolje rezultate kada se početna kultura kvasca optičke gustine između OD₆₀₀ 0,006 i 0,028, u volumenu od 6 ili 4 µL gajila tokom 16 sati, a pre očitavanja fluorescentnog signala, suspenzija inkubirala tokom tri sata u 1,5% rastvoru alamarBlue® i 150 mM fosfatnom puferu pH 6,4.
3. Pri koncentracijama do 2%, DMSO ne utiče na kvalitet testa kada se koriste wt i *pdr5* soj kvasca, za razliku od *pdr5snq2* soja, gde je njegov uticaj vidljiv već pri koncentraciji od 1% DMSO.
4. Reproducibilnost alamarBlue® metode, u visoko automatizovanim uslovima, iznosi 80% ukoliko se test izvodi u identičnim eksperimentalnim ulovima. Ta vrednost je smanjena za dodatnih 30% ukoliko jedan od parametara nije optimalan, odnosno kada je vreme između pipetiranja hemijskih jedinjenja i nanošenja suspenzije kvasca produženo na 16,5 sati.
5. Merenje optičke gustine suspenzije kvasca bez dodatnog uticaja minimalnog medijuma je moguće u opsegu talasnih dužina od 190 do 900 nm, za razliku od bogatog medijuma koji apsorbuje već ispod 700 nm.
6. U pločama sa 96 i 384 bunarčića, u ispitivanim uslovima, fizički faktori poput evaporacije i količine medijuma ne utiču značajno na rast kulture kvasca. Najbolji

rezultati se postižu pri gustinama početne kulture od OD₆₀₀ 0,05 do 0,1 u bogatom medijumu odnosno 0,1 do 0,2 u minimalnom medijumu u kulturi volumena 150 μL (sa 96 bunarčića) i iznad 30 μL (sa 384 bunarčića) tokom inkubacije od 9, odnosno 13 sati.

7. U visoko automatizovanim uslovima, u pločama sa 1536 bunarčića, najbolji rezultati su dobijeni gajenjem ćelija u minimalnom medijumu u volumenu od 8 μL i gustini početne kulture OD₆₀₀ u opsegu od 0,01 do 0,05 tokom 16 sati uz visoku vlažnost i aeraciju 5 sekundi na maksimalnoj frekvenciji na svaka dva sata.
8. Primenom alamarBlue® metode u testiranju 1.101.408 hemijskih jedinjenja dobijeno je 25.144 jedinjenja (2,28%) koji inhibiraju rast i deobu kvasca pri koncentraciji od 20 μM (*Z'* vrednost je od 0,5 do 0,9).
9. Određivanjem IC₅₀ vrednosti, od 1.930 odabranih jedinjenja iz primarnog testiranja, inhibitorski potencijal je potvrđen kod 868 (45%) u oba ili bar jednom testu. Merenjem optičke gustine, aktivnost je potvrđena kod 242 (28%) za razliku od alamarBlue® metode u kojoj taj broj iznosi 156 (18%) jedinjenja. Ovim se pokazalo da je metoda merenja optičke gustine osetljivija u odnosu na merenje fluorescentnog signala.
10. Metodom haplodeficijentnog profilisanja je pokazano da 572 jedinjenja iz validacionog eksperimenta imaju visoku raznolikost u načinu delovanju na rast i deobu ćelija kvasca i utiču na > 25% proteina kodiranih u genomu kvasca.
11. Metodom haplodeficijentnog profilisanja je moguća karakterizacija mehanizma delovanja kako poznatih tako i novih antifungalnih jedinjenja. Istom metodom je pokazano da je Sec14p moguće mesto delovanja NGx04.
12. Na osnovu rezultata dobijenih ovom studijom može se zaključiti da su alamarBlue® i merenje optičke gustine u visoko automatizovanim uslovima izuzetno dobar model sistem za testiranje lekova sa potencijalnim antifungalnim delovanjem, ali i cistostatika, imajući u vidu visoko stepen homologije relevantnih gena između kvasca i sisarske ćelije.

LITERATURA

7. LITERATURA

- Acker, Michael G. and Auld, D.S., 2014. Considerations for the design and reporting of enzyme assays in high-throughput screening applications. *Perspectives in Science* 1, 56–73. doi:10.1016/j.pisc.2013.12.001
- Almutary A. and Sanderson BJS, 2016. The MTT and Crystal Violet Assays. *International Journal of Toxicology* 35, 454–462. doi:10.1177/1091581816648906
- Antonio, M. Di, Mcluckie, K.I.E., Balasubramanian, S., 2014. Reprogramming the Mechanism of Action of Chlorambucil by Coupling to a G - Quadruplex Ligand. *Journal of the American Chemical Society* 136, 5860–5863. doi:doi.org/10.1021/ja5014344
- Auld, D.S., Thorne, N., Nguyen, 2008. A Specific Mechanism for Nonspecific Activation in Reporter-Gene Assays. *ACS Chemical Biology* 3, 463–470. doi:10.1021/cb8000793
- Balzi, E., Wang, M., Leterme, S., Van Dyck, L., Goffeau, A., 1994. PDR5, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator PDR1. *Journal of Biological Chemistry* 269, 2206–2214.
- Barberis, A., Gunde, T., Berset, C., Audetat, S., Lüthi, U., 2005. Yeast as a screening tool. *Drug Discovery Today: Technologies* 2, 187–192. doi:10.1016/j.ddtec.2005.05.022
- Barros, M.H., da Cunha, F.M., Oliveira, G.A., Tahara, E.B., Kowaltowski, A.J., 2010. Yeast as a model to study mitochondrial mechanisms in ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* 131, 494–502. doi:10.1016/j.mad.2010.04.008
- Beaumont, T.E., Shekhar, T.M., Kaur, L., Pantaki-Eimany, D., Kvensakul, M., Hawkins, C.J., 2013. Yeast techniques for modeling drugs targeting Bcl-2 and caspase family members. *Cell death & disease* 4, e619. doi:10.1038/cddis.2013.143
- Becker, M.S., Müller, P.M., Bajorat, J., Schroeder, A., Giaisi, M., Amin, E., Ahmadian, M.R., Rocks, O., Köhler, R., Krammer, P.H., Li-Weber, M., 2016. The anticancer phytochemical rocaglamide inhibits Rho GTPase activity and cancer cell migration.

- Oncotarget 7, 51908–51921. doi:10.18632/oncotarget.10188
- Bemis, G.W. and Murcko, M.A., 1996. The Properties of Known Drugs. 1. Molecular Frameworks. *Journal of Medicinal Chemistry* 39, 2887–2893. doi:10.1021/jm9602928
- Bonnier, F., Keating, M.E., Wróbel, T.P., Majzner, K., Baranska, M., Garcia-Munoz, A., Blanco, A., Byrne, H.J., 2015. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: A comparison of 2D and 3D cell culture models. *Toxicology in Vitro* 29, 124–131. doi:10.1016/j.tiv.2014.09.014
- Connolly, D.T., Knight, M.B., Harakas, N.K., Wittwer, A.J., Feder, J., 1986. Determination of the Number of Endothelial Cells in Culture Using an Acid Phosphatase Assay. *Analytical Biochemistry* 152, 136–140.
- Cui, Z., Hirata, D., Miyakawa, T., 1999. Functional Analysis of the Promoter of the Yeast SNQ2 Gene Encoding a Multidrug Resistance Transporter that Confers the Resistance to 4-Nitroquinoline N -Oxide. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 63, 162–167. doi:10.1271/bbb.63.162
- Dasari S. and Tchounwou P.B., 2014. Cisplatin in cancer therapy : molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology* 364–378. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025.
- Demetri, G.D., von Mehren, M., Blanke, C.D., Van den Abbeele, A.D., Eisenberg, B., Roberts, P.J., Heinrich, M.C., Tuveson, D. a., Singer, S., Janicek, M., Fletcher, J.A., Silverman, S.G., Silberman, S.L., Capdeville, R., Kiese, B., Peng, B., Dimitrijevic, S., Druker, B.J., Corless, C., Fletcher, C.D.M., Joensuu, H., 2002. Efficacy and Safety of Imatinib Mesylate in Advanced Gastrointestinal Stromal Tumors. *New England Journal of Medicine* 347, 472–480. doi:10.1056/NEJMoa020461
- Didiot, M.-C., Serafini, S., Pfeifer, M.J., King, F.J., Parker, C.N., 2011. Multiplexed reporter gene assays: monitoring the cell viability and the compound kinetics on luciferase activity. *Journal of biomolecular screening* 16, 786–93. doi:10.1177/1087057111407768
- Eason, R.G., Pourmand, N., Tongprasit, W., Herman, Z.S., Anthony, K., Jejelowo, O., Davis, R.W., Stolc, V., 2004. Characterization of synthetic DNA bar codes in *Saccharomyces cerevisiae* gene-deletion strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 11046–11051. doi:10.1073/pnas.0403672101
- Engeloch, C., Schopfer, U., Muckenschnabel, I., Le Goff, F., Mees, H., Boesch, K., Popov,

- M., 2008. Stability of Screening Compounds in Wet DMSO. *Journal of Biomolecular Screening* 13, 999–1006. doi:10.1177/1087057108326536
- Erdal, H., Berndtsson, M., Castro, J., Brunk, U., Shoshan, M.C., Linder, S., 2005. Induction of lysosomal membrane permeabilization by compounds that activate p53-independent apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 192–197. doi:10.1073/pnas.0408592102
- Ewesuedo R.B. and Ratan M.J., 1997. Topoisomerase I Inhibitors. *The Oncologist* 2, 359–364.
- Fabian, C.J., 2007. The what, why and how of aromatase inhibitors: hormonal agents for treatment and prevention of breast cancer. *International Journal of Clinical Practice* 61, 2051–2063. doi:10.1111/j.1742-1241.2007.01587.x
- Fang, M., Kearns, B.G., Gedvilaite, A., Kagiwada, S., Kearns, M., Fung, M.K., Bankaitis, V.A., 1996. Kes1p shares homology with human oxysterol binding protein and participates in a novel regulatory pathway for yeast Golgi-derived transport vesicle biogenesis. *The EMBO journal* 15, 6447–59.
- Farley, A.R., Powell, D.W., Weaver, C.M., Jennings, J.L., Link, A.J., 2011. Assessing the components of the eIF3 complex and their phosphorylation status. *Journal of Proteome Research* 10, 1481–1494. doi:10.1021/pr100877m
- Filipuzzi, I., Cotesta, S., Perruccio, F., Knapp, B., Fu, Y., Studer, C., Pries, V., Riedl, R., Helliwell, S.B., Petrovic, K.T., Movva, N.R., Sanglard, D., Tao, J., Hoepfner, D., 2016. High-Resolution Genetics Identifies the Lipid Transfer Protein Sec14p as Target for Antifungal Ergolines. *PLOS Genetics* 12, e1006374. doi:10.1371/journal.pgen.1006374
- Fishman M.C. and Porter J.A., 2005. Pharmaceuticals: a new grammar for drug discovery. *Nature* 437, 491–493. doi:10.1038/437491a
- Fleming, J., Outeiro, T.F., Slack, M., Lindquist, S.L., Bulawa, C.E., 2008. Detection of Compounds That Rescue Rab1-Synuclein Toxicity, in: *Methods in Enzymology*. pp. 339–351. doi:10.1016/S0076-6879(07)00425-9
- Fried H.M. and Warner J.R., 1982. Molecular cloning and analyses of yeast gene for cycloheximide resistance and ribosomal protein L29. *Nucleic Acids Research* 10, 3133–3148.
- Giaever, E.A., 2002. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*

- 418, 387–91. doi:10.1038/nature00935
- Giaever, G., Flaherty, P., Kumm, J., Proctor, M., Nislow, C., Jaramillo, D.F., Chu, A.M., Jordan, M.I., Arkin, A.P., Davis, R.W., 2004. Chemogenomic profiling: identifying the functional interactions of small molecules in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 793–798. doi:10.1073/pnas.0307490100
- Giaever, G., Shoemaker, D.D., Jones, T.W., Liang, H., Winzeler, E. a, Astromoff, a, Davis, R.W., 1999. Genomic profiling of drug sensitivities via induced haploinsufficiency. *Nature genetics* 21, 278–283. doi:10.1038/6791
- Gilbert, D.F., Erdmann, G., Zhang, X., Fritzsche, A., Demir, K., Jaedicke, A., Muehlenberg, K., Wanker, E.E., Boutros, M., 2011. A Novel Multiplex Cell Viability Assay for High-Throughput RNAi Screening. *PLoS ONE* 6, e28338. doi:10.1371/journal.pone.0028338
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G., 1996. Life with 6000 Genes. *Science* 274, 546–567. doi:10.1126/science.274.5287.546
- Goodsell, D.S., 2002. The Molecular Perspective : Tamoxifen and the Estrogen Receptor. *The Oncologist* 7, 163–164.
- Gray, K.C., Palacios, D.S., Dailey, I., Endo, M.M., Uno, B.E., Wilcock, B.C., Burke, M.D., 2012. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 2234–9. doi:10.1073/pnas.1117280109
- Guthrie C. and Fink G.R., 1991. Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods in enzymology* 194, 1–863.
- Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R., Bullock, P., 2004. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology in Vitro* 18, 703–710. doi:10.1016/j.tiv.2004.03.012
- Hatori, H., Shibata, T., Tsurumi, Y., Nakanishi, T., Katsuoka, M., Ohtsu, Y., Sakamoto, K., Takase, S., Ueda, H., Hino, M., Fujii, T., 2004. FR171456, a novel cholesterol synthesis inhibitor produced by *Sporormiella minima* No. 15604. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties. *The Journal of antibiotics* 57, 253–9.

- Helliwell, S.B., Howald, I., Barbet, N., Hall, M.N., 1998. TOR2 is part of two related signaling pathways coordinating cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 148, 99–112.
- Helliwell, S.B., Karkare, S., Bergdoll, M., Rahier, A., Leighton-Davis, J.R., Fioretto, C., Aust, T., Filipuzzi, I., Frederiksen, M., Gounarides, J., Hoepfner, D., Hofmann, A., Imbert, P.-E., Jeker, R., Knochenmuss, R., Krastel, P., Margerit, A., Memmert, K., Miault, C. V, Rao Movva, N., Muller, A., Naegeli, H.-U., Oberer, L., Prindle, V., Riedl, R., Schuierer, S., Sexton, J.A., Tao, J., Wagner, T., Yin, H., Zhang, J., Roggo, S., Reinker, S., Parker, C.N., 2015. FR171456 is a specific inhibitor of mammalian NSDHL and yeast Erg26p. *Nature Communications* 6, 8613. doi:10.1038/ncomms9613
- Hillenmeyer, M.E., Fung, E., Wildenhain, J., Pierce, S.E., Hoon, S., Lee, W., Proctor, M., St.Onge, R.P., Tyers, M., Koller, D., Altman, R.B., Davis, R.W., Nislow, C., Giaever, G., 2008. The Chemical Genomic Portrait of Yeast: Uncovering a Phenotype for All Genes. *Science* 320, 362–365. doi:10.1126/science.1150021
- Hoelder, S., Clarke, P.A., Workman, P., 2012. Discovery of small molecule cancer drugs: Successes, challenges and opportunities. *Molecular Oncology* 6, 155–176. doi:10.1016/j.molonc.2012.02.004
- Hoepfner, D., Helliwell, S.B., Sadlish, H., Schuierer, S., Filipuzzi, I., Brachat, S., Bhullar, B., Plikat, U., Abraham, Y., Altorfer, M., Aust, T., Baeriswyl, L., Cerino, R., Chang, L., Estoppey, D., Eichenberger, J., Frederiksen, M., Hartmann, N., Hohendahl, A., Knapp, B., Krastel, P., Melin, N., Nigsch, F., Oakeley, E.J., Petitjean, V., Petersen, F., Riedl, R., Schmitt, E.K., Staedtler, F., Studer, C., Tallarico, J.A., Wetzl, S., Fishman, M.C., Porter, J.A., Movva, N.R., 2014. High-resolution chemical dissection of a model eukaryote reveals targets, pathways and gene functions. *Microbiological Research* 169, 107–120. doi:10.1016/j.micres.2013.11.004
- Hoepfner, D., Karkare, S., Helliwell, S.B., Pfeifer, M., Trunzer, M., De Bonnechose, S., Zimmerlin, A., Tao, J., Richie, D., Hofmann, A., Reinker, S., Frederiksen, M., Movva, N.R., Porter, J.A., Ryder, N.S., Parker, C.N., 2012a. An Integrated Approach for Identification and Target Validation of Antifungal Compounds Active against Erg11p. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56, 4233–4240. doi:10.1128/AAC.06332-11
- Hoepfner, D., McNamara, C.W., Lim, C.S., Studer, C., Riedl, R., Aust, T., McCormack, S.L., Plouffe, D.M., Meister, S., Schuierer, S., Plikat, U., Hartmann, N., Staedtler, F.,

- Cotesta, S., Schmitt, E.K., Petersen, F., Supek, F., Glynne, R.J., Tallarico, J.A., Porter, J.A., Fishman, M.C., Bodenreider, C., Diagana, T.T., Movva, N.R., Winzeler, E.A., 2012b. Selective and Specific Inhibition of the Plasmodium falciparum Lysyl-tRNA Synthetase by the Fungal Secondary Metabolite Cladosporin. *Cell Host & Microbe* 11, 654–663. doi:10.1016/j.chom.2012.04.015
- Huh, W., Falvo, J. V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., Shea, E.K.O., 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686–691.
- Jerusalem, G., Rorive, A., Collignon, J., 2014. Use of mTOR inhibitors in the treatment of breast cancer: An evaluation of factors that influence patient outcomes. *Breast Cancer: Targets and Therapy* 6, 43–57. doi:10.2147/BCTT.S38679
- Jungwirth H. and Kuchler K., 2006. Yeast ABC transporters - A tale of sex, stress, drugs and aging. *FEBS Letters* 580, 1131–1138. doi:10.1016/j.febslet.2005.12.050
- Kauffman C.A. and Zarins L.T., 1999. Colorimetric method for susceptibility testing of voriconazole and other triazoles against *Candida* species. *Mycoses* 42, 539–542.
- Kim, H., Yoon, S.C., Lee, T.Y., Jeong, D., 2009. Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages. *Toxicology Letters* 184, 13–17. doi:10.1016/j.toxlet.2008.10.006
- Kolaczowski, M., Kolaczowska, A., Luczynski, J., Witek, S., Goffeau, A., 1998. In Vivo Characterization of the Drug Resistance Profile of the Major ABC Transporters and Other Components of the Yeast Pleiotropic Drug Resistance Network. *Microbial Drug Resistance* 4, 143–158. doi:10.1089/mdr.1998.4.143
- Krysan D.J. and Didone L., 2008. A high-throughput screening assay for small molecules that disrupt yeast cell integrity. *Journal of biomolecular screening* 13, 657–64. doi:10.1177/1087057108320713
- Kunz J. and Hall, M.N., 1993. Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: more than just immunosuppression. *Trends in Biochemical Sciences* 18, 334–338. doi:10.1016/0968-0004(93)90069-Y
- Kurtz, J.E., Dufour P., Bergerat J.P., E.F., 2005. *Saccharomyces cerevisiae* as a Genetic Model Organism in Anticancer Therapy. *Current Pharmacogenetic* 3, 1–7.
- Kurtz, J.-E., Dufour, P., Duclos, B., Bergerat, J.-P., Exinger, F., 2004. [*Saccharomyces cerevisiae*: an efficient tool and model system for anticancer research]. *Bulletin du*

- cancer 91, 133–9.
- Kwak, E.L., Bang, Y.-J., Camidge, D.R., Shaw, A.T., Solomon, B., Maki, R.G., Ou, S.-H.I., Dezube, B.J., Jänne, P.A., Costa, D.B., Varella-Garcia, M., Kim, W.-H., Lynch, T.J., Fidias, P., Stubbs, H., Engelman, J.A., Sequist, L. V, Tan, W., Gandhi, L., Mino-Kenudson, M., Wei, G.C., Shreeve, S.M., Ratain, M.J., Settleman, J., Christensen, J.G., Haber, D.A., Wilner, K., Salgia, R., Shapiro, G.I., Clark, J.W., Iafrate, A.J., 2010. Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibition in Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine* 363, 1693–1703. doi:10.1056/NEJMoa1006448
- Lall, N., Henley-Smith, C.J., De Canha, M.N., Oosthuizen, C.B., Berrington, D., 2013. Viability Reagent, PrestoBlue, in Comparison with Other Available Reagents, Utilized in Cytotoxicity and Antimicrobial Assays. *International Journal of Microbiology* 2013, 1–5. doi:10.1155/2013/420601
- Larson, B., Worzella, T., Gallagher, A., Ph, D., Matthews, E., Corporation, P., Fluidics, D., Labtech, B.M.G., 2004. Miniaturizing and automating cell viability and reporter assays for high-throughput and ultrahigh-throughput screening. *Cell Notes* 10–14.
- Leeson, P., 2012. Drug discovery: Chemical beauty contest. *Nature* 481, 455–456. doi:10.1038/481455a
- Li, X., Rivas, M.P., Fang, M., Marchena, J., Mehrotra, B., Chaudhary, A., Li, F., Prestwich, G.D., Bankaitis, V.A., 2002. Analysis of oxysterol binding protein homologue Kes1p function in regulation of Sec14p-dependent protein transport from the yeast Golgi complex. *Journal of Cell Biology* 157, 63–77. doi:10.1083/jcb.200201037
- Liu, Z., Zhou, Z., Chen, G., Bao, S., 2007. A putative transcriptional elongation factor hIws1 is essential for mammalian cell proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 353, 47–53. doi:10.1016/j.bbrc.2006.11.133
- Lombardi, P., 2002. Exemestane, a new steroidal aromatase inhibitor of clinical relevance. *Biochimica et Biophysica Acta* 1587, 326–337.
- Macarron, R., 2006. Critical review of the role of HTS in drug discovery. *Drug Discovery Today* 11, 277–279. doi:10.1016/j.drudis.2006.02.001
- Macarron, R., Banks, M.N., Bojanic, D., Burns, D.J., Cirovic, D.A., Garyantes, T., Green, D.V.S., Hertzberg, R.P., Janzen, W.P., Paslay, J.W., Schopfer, U., Sittampalam, G.S., 2011. Impact of high-throughput screening in biomedical research. *Nature Reviews Drug Discovery* 10, 188–195. doi:10.1038/nrd3368

- Maksimovic-Ivanic, D., Mojic, M., Bulatovic, M., Radojkovic, M., Kuzmanovic, M., Ristic, S., Stosic-Grujicic, S., Miljkovic, D., Cavalli, E., Libra, M., Fagone, P., McCubrey, J., Nicoletti, F., Mijatovic, S., 2015. The NO-modified HIV protease inhibitor as a valuable drug for hematological malignancies: Role of p70S6K. *Leukemia Research* 39, 1088–1095. doi:10.1016/j.leukres.2015.06.013
- Mann, P.A., McLellan, C.A., Koseoglu, S., Si, Q., Kuzmin, E., Flattery, A., Harris, G., Sher, X., Murgolo, N., Wang, H., Devito, K., de Pedro, N., Genilloud, O., Kahn, J.N., Jiang, B., Costanzo, M., Boone, C., Garlisi, C.G., Lindquist, S., Roemer, T., 2015. Chemical Genomics-Based Antifungal Drug Discovery: Targeting Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Precursor Biosynthesis. *ACS Infectious Diseases* 1, 59–72. doi:10.1021/id5000212
- Matuo, R., Sousa, F.G., Soares, D.G., Bonatto, D., Saffi, J., Escargueil, A.E., Larsen, A.K., Henriques, J.A.P., 2012. *Saccharomyces cerevisiae* as a model system to study the response to anticancer agents. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 70, 491–502. doi:10.1007/s00280-012-1937-4
- Mayr L.M. and Bojanic D., 2009. Novel trends in high-throughput screening. *Current Opinion in Pharmacology* 9, 580–588. doi:10.1016/j.coph.2009.08.004
- Menacho-Márquez M. and Murguía J. R., 2007. Yeast on drugs: *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for anticancer drug research. *Clinical and Translational Oncology* 9, 221–228. doi:10.1007/s12094-007-0043-2
- Michelini, E., Cevenini, L., Mezzanotte, L., Coppa, A., Roda, A., 2010. Cell-based assays: Fuelling drug discovery. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398, 227–238. doi:10.1007/s00216-010-3933-z
- Min, Junxia, Sridevi, P., Alexander, S., Alexander, H., 2006. Sensitive cell viability assay for use in drug screens and for studying the mechanism of action of drugs in *Dictyostelium discoideum*. *BioTechniques* 41, 591–595. doi:10.2144/000112260
- Miyamoto, Y., Machida, K., Mizunuma, M., Emoto, Y., Sato, N., Miyahara, K., Hirata, D., Usui, T., Takahashi, H., Osada, H., Miyakawa, T., 2002. Identification of *Saccharomyces cerevisiae* isoleucyl-tRNA synthetase as a target of the G1-specific inhibitor Reveromycin A. *Journal of Biological Chemistry* 277, 28810–28814. doi:10.1074/jbc.M203827200
- Müllner, H., Zweytick, D., Leber, R., Turnowsky, F., Daum, G., 2004. Targeting of proteins

- involved in sterol biosynthesis to lipid particles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1663, 9–13. doi:10.1016/j.bbamem.2004.03.001
- Mushegian, A.R., Bassett, D.E., Boguski, M.S., Bork, P., Koonin, E. V., 1997. Positionally cloned human disease genes: Patterns of evolutionary conservation and functional motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 5831–5836. doi:10.1073/pnas.94.11.5831
- Newman D.J. and Cragg G.M., 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products* 70, 461–477. doi:10.1021/np068054v
- Nitiss, J.L., 2009. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer* 9, 338–350. doi:10.1038/nrc2607
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F., 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry* 267, 5421–5426. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x
- O'Brien, S.G., Guilhot, F., Larson, R.A., Gathmann, I., Baccarani, M., Cervantes, F., Cornelissen, J.J., Fischer, T., Hochhaus, A., Hughes, T., Lechner, K., Nielsen, J.L., Rousselot, P., Reiffers, J., Saglio, G., Shepherd, J., Simonsson, B., Gratwohl, A., Goldman, J.M., Kantarjian, H., Taylor, K., Verhoef, G., Bolton, A.E., Capdeville, R., Druker, B.J., 2003. Imatinib Compared with Interferon and Low-Dose Cytarabine for Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* 348, 994–1004. doi:10.1056/NEJMoa022457
- Osborne, C.K., Wakeling, A., Nicholson, R.I., 2004. Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action 90, 2–6. doi:10.1038/sj.bjc.6601629
- Overington, J.P., Al-Lazikani, B., Hopkins, A.L., 2006. How many drug targets are there? *Nature reviews. Drug discovery* 5, 993–6. doi:10.1038/nrd2199
- Petersen J. and Nguyen J., 2005. Comparison of Absorbance and Fluorescence Methods for Determining Liquid Dispensing Precision. *Journal of the Association for Laboratory Automation* 10, 82–87. doi:10.1016/j.jala.2005.01.009
- Petrovic, K., Pfeifer, M., Parker N.C., Schuierer, S., Tallarico, J., Hoepfner, D., Movva, N.R., Scheel, G., Helliwell, B.S., 2017. Two low complexity ultra-high throughput methods to identify diverse chemically bioactive molecules using *Saccharomyces*

- cerevisiae. *Microbiological research* 199, 10-18. doi.org/10.1016/j.micres.2017.02.004
- Pham, C.D., Yu, Z., Sandrock, B., B?lker, M., Gold, S.E., Perlin, M.H., 2009. *Ustilago maydis rho1 and 14-3-3 homologues participate in pathways controlling cell separation and cell polarity. Eukaryotic Cell* 8, 977–989. doi:10.1128/EC.00009-09
- Pierce, S.E., Davis, R.W., Nislow, C., Giaever, G., 2007. Genome-wide analysis of barcoded *Saccharomyces cerevisiae* gene-deletion mutants in pooled cultures. *Nature protocols* 2, 2958–74. doi:10.1038/nprot.2007.427
- Pommereau, A., 2004. Two Simple and Generic Antibody-Independent Kinase Assays: Comparison of a Bioluminescent and a Microfluidic Assay Format. *Journal of Biomolecular Screening* 9, 409–416. doi:10.1177/1087057104264175
- Radovic, J., Maksimovic-Ivanic, D., Timotijevic, G., Popadic, S., Ramic, Z., Trajkovic, V., Miljkovic, D., Stosic-Grujicic, S., Mijatovic, S., 2012. Cell-type dependent response of melanoma cells to aloe emodin. *Food and Chemical Toxicology* 50, 3181–3189. doi:10.1016/j.fct.2012.05.047
- Rampersad, S.N., 2012. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors* 12, 12347–12360. doi:10.3390/s120912347
- Rana, A., Shah, S.H., Rehman, N., Ali, S., Ali, hulam M., Bhatti, S., Farooqi, A.A., 2011. Chronic myeloid leukemia: Attributes of break point cluster region-abelson (BCR-ABL). *Journal of Cancer Research and Experimental Oncology* 3, 62–66.
- Reed, J.C., 2000. Mechanisms of Apoptosis. *American Journal of Pathology* 157, 1415–1430.
- Richie, D.L., Thompson, K. V., Studer, C., Prindle, V.C., Aust, T., Riedl, R., Estoppey, D., Tao, J., Sexton, J.A., Zabawa, T., Drumm, J., Cotesta, S., Eichenberger, J., Schuierer, S., Hartmann, N., Movva, N.R., Tallarico, J.A., Ryder, N.S., Hoepfner, D., 2013. Identification and evaluation of novel acetolactate synthase inhibitors as antifungal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57, 2272–2280. doi:10.1128/AAC.01809-12
- Sadlish, H., Galicia-Vazquez, G., Paris, C.G., Aust, T., Bhullar, B., Chang, L., Helliwell, S.B., Hoepfner, D., Knapp, B., Riedl, R., Roggo, S., Schuierer, S., Studer, C., Porco, J.A., Pelletier, J., Movva, N.R., 2013. Evidence for a Functionally Relevant Rocaglamide Binding Site on the eIF4A–RNA Complex. *ACS Chemical Biology* 8,

- 1519–1527. doi:10.1021/cb400158t
- Saotome, K., Morita H., Umeda, M., 1989. Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs. *Toxicology in Vitro* 3, 317–321.
- Sato K., Noda Y., Yoda K., 2009. Kei1: A Novel Subunit of Inositolphosphorylceramide Synthase, Essential for Its Enzyme Activity and Golgi Localization. *Molecular biology of the cell* 20, 4444–4457. doi:doi/10.1091/mbc.E09-03-0235
- Saunders, W., Hornack, D., Lengyel, V., Deng, C., 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* kinesin-related motor Kar3p acts at preanaphase spindle poles to limit the number and length of cytoplasmic microtubules. *Journal of cell biology* 137, 417–31.
- Scherr, N., Röltgen, K., Witschel, M., Pluschke, G., 2012. Screening of antifungal azole drugs and agrochemicals with an adapted alamarblue-based assay demonstrates antibacterial activity of croconazole against *Mycobacterium ulcerans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56, 6410–6413. doi:10.1128/AAC.01383-12
- Sen, N.D., Zhou, F., Ingolia, N.T., Hinnebusch, A.G., 2015. Genome-wide analysis of translational efficiency reveals distinct but overlapping functions of yeast DEAD-box RNA helicases Ded1 and eIF4A. *Genome research* 25, 1196–1205. doi:10.1101/gr.191601.115.25
- Shackelford R. and El-Osta H., 2015. Personalized treatment options for ALK-positive metastatic non-small-cell lung cancer: potential role for Ceritinib. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine* 8, 145. doi:10.2147/PGPM.S71100
- Shaw, A.T., Kim, D.-W., Mehra, R., Tan, D.S.W., Felip, E., Chow, L.Q.M., Camidge, D.R., Vansteenkiste, J., Sharma, S., De Pas, T., Riely, G.J., Solomon, B.J., Wolf, J., Thomas, M., Schuler, M., Liu, G., Santoro, A., Lau, Y.Y., Goldwasser, M., Boral, A.L., Engelman, J. a., 2014. Ceritinib in ALK -Rearranged Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine* 370, 1189–1197. doi:10.1056/NEJMoa1311107
- Siddik, Z., 2002. Mechanisms of Action of Cancer Chemotherapeutic Agents: DNA-Interactive Alkylating Agents and Antitumour Platinum-Based Drugs, *The Cancer Handbook*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Slater, K., 2001. Cytotoxicity tests for high-throughput drug discovery. *Current Opinion in Biotechnology* 12, 70–74. doi:10.1016/S0958-1669(00)00177-4
- Smith, A.M., Ammar, R., Nislow, C., Giaever, G., 2010. A survey of yeast genomic assays

- for drug and target discovery. *Pharmacology and Therapeutics* 127, 156–164. doi:10.1016/j.pharmthera.2010.04.012
- Sui Y. and Wu Z., 2007. Alternative Statistical Parameter for High-Throughput Screening Assay Quality Assessment. *Journal of Biomolecular Screening* 12, 229–234. doi:10.1177/1087057106296498
- Sykes M.L. and Avery V.M., 2009. Development of an Alamar Blue™ Viability Assay in 384-Well Format for High Throughput Whole Cell Screening of *Trypanosoma brucei* brucei Bloodstream Form Strain 427. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 81, 665–674. doi:10.4269/ajtmh.2009.09-0015
- Templitsky, E., Joshi, K., Ericson, D.L., Scalia, A., Mullen, J.D., Sweet, R.M., Soares, A.S., 2015. High throughput screening using acoustic droplet ejection to combine protein crystals and chemical libraries on crystallization plates at high density. *Journal of Structural Biology* 191, 49–58. doi:10.1016/j.jsb.2015.05.006
- Tiballi, R.N., Spiegel, J.E., Zarins, L.T., et al., 1995. *Saccharomyces cerevisiae* Infections and Antifungal Susceptibility Studies by Colorimetric and Broth Macrodilution Methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 23, 135–140. doi:10.1016/0732-8893(95)00188-3
- Twelves, C., Cortes, J., Vahdat, L., Olivo, M., He, Y., Kaufman, P.A., Awada, A., 2014. Efficacy of eribulin in women with metastatic breast cancer: a pooled analysis of two phase 3 studies. *Breast Cancer Research and Treatment* 148, 553–561. doi:10.1007/s10549-014-3144-y
- Vanicha V. and Kirtikara K., 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols* 1, 1112–1116. doi:10.1038/nprot.2006.179
- Villegas, M.L., Bertolotti, S.G., Previtali, C.M., Encinas, M. V., 2005. Reactions of Excited States of Phenoxazin-3-one Dyes with Amino Acids. *Photochemistry and Photobiology* 81, 884–890. doi:10.1111/j.1751-1097.2005.tb01458.x
- Voisset, C., Daskalogianni, C., Contesse, M.-A., Mazars, A., Arbach, H., Le Cann, M., Soubigou, F., Apcher, S., Fåhraeus, R., Blondel, M., 2014. A yeast-based assay identifies drugs that interfere with immune evasion of the Epstein-Barr virus. *Disease models & mechanisms* 7, 435–44. doi:10.1242/dmm.014308
- Wagstaff, K.M., Rawlinson, S.M., Hearps, A.C., Jans, D.A., 2011. An AlphaScreen(R)-Based Assay for High-Throughput Screening for Specific Inhibitors of Nuclear Import.

- Journal of biomolecular screening 16, 192–200. doi:10.1177/1087057110390360
- Waybright, T.J., Britt, J.R., McCloud, T.G., 2009. Overcoming Problems of Compound Storage in DMSO: Solvent and Process Alternatives. *Journal of Biomolecular Screening* 14, 708–715. doi:10.1177/1087057109335670
- Winzeler, E.A., 1999. Functional Characterization of the *S. cerevisiae* Genome by Gene Deletion and Parallel Analysis. *Science* 285, 901–906. doi:10.1126/science.285.5429.901
- Woodward, P.W., Williams, C., Sewing, A., Benson, N., 2006. Improving the Design and Analysis of High-Throughput Screening Technology Comparison Experiments Using Statistical Modeling. *Journal of Biomolecular Screening* 11, 5–12. doi:10.1177/1087057105280779
- Yuan J. and Ching C-B., 2015. Dynamic control of ERG9 expression for improved amorphous 4,11-diene production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories* 14, 38. doi:10.1186/s12934-015-0220-x
- Zang, R., Li, D., Tang, I.-C., Wang, J., Yang, S.-T., 2012. Cell-Based Assays in High-Throughput Screening for Drug Discovery. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries* 1, 31–51. doi:10.6000/1927-3037.2012.01.01.02
- Zhang, J., Chung, T., Oldenburg, K., 1999. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J. Biomol. Screen.* 4, 67–73. doi:0803973233
- Zhang, Z., Zheng, Y., Mazon, H., Milgrom, E., Kitagawa, N., Kish-Trier, E., Heck, A.J.R., Kane, P.M., Wilkens, S., 2008. Structure of the yeast vacuolar ATPase. *Journal of Biological Chemistry* 283, 35983–35995. doi:10.1074/jbc.M805345200
- Zhong, W., Jeffries, M.W., Georgopapadakou, N.H., 2000. Inhibition of inositol phosphorylceramide synthase by aureobasidin A in *Candida* and *Aspergillus* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, 651–653. doi:10.1128/AAC.44.3.651-653.2000

PRILOZI

PRILOG 1.

Jedinjenja sa IC₅₀ vrednostima <10 µM (jaki inhibitori) identifikovani u oba eseja. Za svako jedinjenje IC₅₀ vrednost je predstavljena zajedno sa donjim i gornjim 95% intervalom poverljivosti (LCL95 i UCL95). Takođe, predstavljen je i maksimalni i minimalni efekat koji pokazuje najjaču i najmanju inhibiciju primećenu u opsegu ispitivanih koncentracija (6.3nM do 20 µM). Sive obojene tabele predstavljaju vrednosti dobijene AB esejom, a bele merenjem optičke gustine.

Broj jedinjenja	NOVARTIS kod	alarmar Blue®						Optička gustina					
		L95CL vrednost	IC50 vrednost	U95CL vrednost	SQRT(CHISQ/df)	Maksimalni inhibitorni efekat	Minimalni inhibitorni efekat	L95CL vrednost	IC50 vrednost	U95CL vrednost	SQRT(CHISQ/df)	Maksimalni inhibitorni efekat	Minimalni inhibitorni efekat
1	NOV00024	3.9	4.2	4.6	5.7	-99.1	89.6	3.48	4.32	5.77	12.6	-82.6	7.7
2	NOV00033	3.4	3.7	4.0	3.3	-103.2	20.1	3.19	3.53	3.91	7.5	-108.7	7.1
3	NOV00036	1.7	2.2	3.0	6.7	-82.7	37.6	1.35	1.64	2.19	6.8	-81.3	6.4
4	NOV00038	3.9	4.3	4.7	6.9	-102.7	60.5	1.43	2.63	4.95	16.6	-93.7	13.4
5	NOV00043	3.6	4.6	6.8	25.4	-87.6	83.2	3.98	4.68	5.68	8.0	-80.6	1.6
6	NOV00058	4.2	4.5	4.8	6.5	-102.6	68.5	3.13	3.77	4.57	8.3	-95.8	31.9
7	NOV00065	3.7	3.9	4.2	3.1	-105.5	27.7	3.32	3.88	4.55	10.6	-101.5	-0.3
8	NOV00067	1.0	1.1	1.2	6.1	-94.1	18.9	1.00	1.13	1.28	7.6	-104.4	10.4
9	NOV00068	5.0	5.9	7.2	6.3	-94.9	38.4	3.25	4.18	5.47	11.8	-100.0	1.2
10	NOV00071	5.6	7.1	8.7	4.5	-96.7	34.5	2.88	4.51	7.30	12.8	-94.2	-5.4
11	NOV00074	1.5	1.6	1.7	3.5	-82.7	93.2	0.42	0.49	0.59	6.2	-83.4	0.8
12	NOV00082	4.0	4.5	5.1	8.0	-92.9	32.1	4.90	6.76	10.88	5.7	-66.9	-0.8
13	NOV00086	3.6	3.9	4.2	5.0	-103.5	14.4	5.00	7.82	11.04	14.7	-96.1	5.9
14	NOV00088	0.4	0.4	0.5	6.6	-96.1	30.0	0.90	1.00	1.11	4.1	-102.6	3.1
15	NOV00089	7.1	8.4	9.9	4.5	-93.4	36.4	4.07	7.01	10.57	13.1	-98.5	20.1
16	NOV00092	3.7	4.1	4.6	6.4	-97.8	44.1	1.71	2.77	3.95	9.3	-101.6	-9.0
17	NOV00099	4.9	5.3	5.9	4.2	-93.1	62.2	1.07	1.40	1.91	12.5	-99.5	7.6
18	NOV00101	8.6	10.0	11.5	4.8	-92.9	21.2	6.87	9.48	12.34	8.8	-79.8	-1.9
19	NOV00112	4.0	4.6	5.3	5.8	-93.2	16.3	3.05	4.55	7.46	17.0	-97.6	0.9
20	NOV00123	5.8	7.2	9.3	7.1	-88.4	51.3	4.21	7.26	12.41	13.8	-77.6	-9.4
21	NOV00124	1.2	1.3	1.4	6.5	-103.3	32.8	3.72	4.66	6.25	8.3	-72.9	-9.2
22	NOV00151	6.8	8.3	9.9	6.9	-90.1	46.0	0.63	2.04	11.86	22.7	-87.8	2.4
23	NOV00186	6.7	7.7	8.7	5.0	-99.8	28.2	0.99	1.10	1.23	5.1	-100.8	6.7
24	NOV00189	4.0	4.4	4.8	9.5	-102.7	63.3	2.29	3.15	4.25	11.7	-96.7	16.2
25	NOV00197	1.5	1.7	2.0	8.3	-99.4	63.5	0.54	0.95	1.77	17.8	-96.9	12.2
26	NOV00198	4.9	5.4	6.2	11.1	-82.2	91.6	2.80	4.30	9.44	16.9	-73.9	12.8
27	NOV00202	3.5	4.0	4.6	12.8	-106.3	105.1	3.03	3.46	3.95	8.3	-104.7	8.9
28	NOV00204	4.2	4.5	4.9	6.8	-102.6	65.0	1.26	1.58	2.05	10.9	-97.7	24.3
29	NOV00223	3.7	4.0	4.3	5.0	-100.4	35.9	3.18	4.33	6.21	15.7	-106.2	11.3
30	NOV00228	4.2	4.5	5.0	9.6	-100.3	68.4	8.16	9.57	11.05	4.6	-99.4	6.1
31	NOV00243	1.3	1.4	1.4	4.3	-104.6	44.9	2.72	3.04	3.39	4.5	-103.5	8.6
32	NOV00247	4.1	4.3	4.5	3.7	-109.6	59.3	3.02	3.31	3.62	6.3	-109.7	8.5
33	NOV00248	0.0	0.0	0.0	5.6	-108.3	90.4	0.34	0.46	0.66	14.9	-100.8	10.9
34	NOV00258	3.3	3.6	4.0	5.2	-103.7	22.5	5.99	8.03	10.13	11.3	-102.9	6.2
35	NOV00261	4.6	5.1	5.8	6.9	-91.2	36.7	7.73	9.34	10.98	8.0	-96.1	20.7
36	NOV00271	1.1	1.4	2.5	8.9	-78.7	20.3	3.69	4.47	5.53	6.6	-89.0	-2.8
37	NOV00274	4.6	4.9	5.2	6.1	-92.6	67.7	5.02	6.32	7.94	7.1	-98.8	8.3
38	NOV00286	0.1	0.1	0.1	3.5	-73.6	79.0	0.04	0.04	0.05	4.6	-83.2	-3.8
39	NOV00288	0.5	0.6	0.6	4.0	-100.9	108.0	0.87	1.02	1.19	6.8	-100.8	-1.4
40	NOV00291	0.4	0.5	0.7	5.4	-75.8	103.5	2.25	3.53	6.04	9.9	-91.6	23.0

Broj jedinjenja	NOVARTIS kod	alamar Blue®						Optička gustina					
		I95CL vrednost	IC50 vrednost	U95CL vrednost	SQRT(CHISQ/df)	Maksimalni inhibicioni efekat	Minimalni inhibicioni efekat	I95CL vrednost	IC50 vrednost	U95CL vrednost	SQRT(CHISQ/df)	Maksimalni inhibicioni efekat	Minimalni inhibicioni efekat
41	NOV00296	0.8	0.9	1.0	7.5	-99.2	48.4	1.04	1.12	1.19	2.5	-103.1	-0.5
42	NOV00303	0.6	0.8	1.1	9.9	-98.6	28.6	1.49	1.90	2.62	9.0	-94.4	24.2
43	NOV00306	0.3	0.4	0.8	7.5	-75.3	18.2	1.85	2.51	3.60	4.2	-80.2	7.0
44	NOV00315	1.3	1.4	1.5	4.4	-107.4	76.2	3.43	3.77	4.16	5.3	-102.9	5.2
45	NOV00318	1.3	1.4	1.6	5.1	-80.9	27.5	3.17	3.57	4.04	4.7	-83.9	2.2
46	NOV00320	3.4	3.7	4.1	6.7	-102.9	30.7	2.91	3.22	3.58	6.2	-103.5	2.7
47	NOV00322	6.9	9.2	12.0	13.8	-95.1	52.7	5.90	6.94	8.05	4.1	-100.0	4.6
48	NOV00327	4.6	5.2	6.0	6.5	-73.6	35.4	4.07	4.94	6.33	8.1	-95.9	2.4
49	NOV00343	5.1	5.5	6.0	3.5	-97.6	87.5	4.56	5.79	7.29	5.5	-99.9	8.0
50	NOV00348	3.5	3.8	4.0	2.9	-105.2	32.1	3.07	3.38	3.72	5.8	-105.3	7.6
51	NOV00352	4.4	4.9	5.4	5.3	-82.3	41.4	3.98	4.32	4.73	3.1	-80.3	8.1
52	NOV00355	1.3	1.5	1.6	2.0	-97.4	17.7	3.63	4.16	4.78	7.8	-87.6	9.3
53	NOV00364	4.9	5.4	6.1	6.8	-78.1	73.2	1.38	1.77	2.69	9.1	-77.4	22.5
54	NOV00370	1.4	1.4	1.5	2.5	-107.7	78.7	2.92	3.53	4.35	11.6	-98.9	5.6
55	NOV00393	7.0	8.6	10.5	10.5	-98.4	66.9	7.46	9.30	11.12	10.1	-100.3	9.1
56	NOV00395	1.1	1.3	1.5	8.2	-92.0	27.5	3.54	4.68	6.53	8.2	-82.7	3.2
57	NOV00398	4.2	4.5	4.9	4.2	-83.9	23.8	4.32	5.15	6.46	7.0	-80.7	1.1
58	NOV00406	0.6	0.6	0.7	3.7	-82.6	91.7	0.13	0.15	0.18	6.4	-83.3	7.5
59	NOV00408	1.2	1.3	1.4	5.4	-99.5	47.9	1.01	2.06	3.05	12.9	-102.1	-2.6
60	NOV00413	3.9	4.2	4.6	7.1	-101.6	45.7	2.67	3.24	3.90	5.6	-98.9	3.3
61	NOV00419	3.3	3.6	4.0	7.5	-102.2	38.8	8.88	9.93	11.00	5.6	-99.9	8.6
62	NOV00423	5.2	5.8	6.7	6.4	-88.9	53.1	3.70	4.91	6.87	7.3	-77.6	5.1
63	NOV00427	4.3	4.5	4.8	3.4	-99.9	53.8	7.32	9.35	11.64	7.3	-82.9	-0.2
64	NOV00430	1.2	1.3	1.4	8.0	-103.1	44.4	0.91	1.06	1.23	6.8	-98.3	0.6
65	NOV00431	0.5	0.7	0.9	9.7	-98.6	35.3	1.01	1.13	1.27	6.4	-104.0	-0.1
66	NOV00432	0.4	0.4	0.4	7.2	-106.4	40.0	0.57	0.74	0.92	8.9	-106.6	3.4
67	NOV00434	5.9	7.3	11.5	5.9	-63.6	44.5	3.55	4.11	4.82	4.7	-68.9	-2.1
68	NOV00435	3.5	3.8	4.2	5.9	-103.7	38.1	3.13	3.88	5.01	11.3	-93.7	17.1
69	NOV00437	0.1	0.1	0.1	5.8	-101.7	25.6	0.19	0.22	0.26	2.4	-101.9	2.1
70	NOV00440	4.3	4.6	5.0	6.8	-98.3	58.1	3.98	5.01	6.47	8.1	-102.0	-2.9
71	NOV00444	1.3	1.4	1.5	4.3	-98.9	39.0	3.42	3.81	4.25	5.5	-102.2	-1.4
72	NOV00445	0.2	0.3	0.4	15.9	-106.1	60.6	0.35	0.40	0.46	6.4	-102.8	4.0
73	NOV00453	4.0	4.2	4.5	4.4	-102.6	35.9	1.96	2.65	3.42	10.5	-93.6	3.4
74	NOV00470	1.4	1.5	1.7	5.3	-95.2	45.7	1.34	1.67	2.16	7.0	-92.3	-1.1
75	NOV00484	0.4	0.4	0.4	4.2	-107.1	55.2	0.44	0.49	0.55	3.8	-101.8	2.2
76	NOV00486	4.1	4.5	5.0	6.2	-87.4	33.8	3.57	4.00	4.52	5.2	-99.8	4.1
77	NOV00501	5.4	5.8	6.4	3.4	-82.8	76.6	1.30	1.77	3.25	10.0	-96.9	-2.9
78	NOV00503	1.7	2.1	2.6	4.6	-80.4	37.3	1.54	1.87	2.45	5.8	-80.1	3.1
79	NOV00504	4.3	4.6	4.8	5.0	-108.2	87.5	1.96	2.44	2.94	5.0	-102.7	5.8
80	NOV00505	5.2	5.5	6.0	6.6	-78.8	91.2	1.30	1.46	1.67	4.3	-78.6	7.8
81	NOV00507	1.3	1.5	1.6	5.4	-95.3	46.3	5.09	6.14	7.49	5.6	-95.1	2.8
82	NOV00512	3.8	4.1	4.3	6.0	-108.1	43.4	7.57	8.88	10.16	7.0	-104.4	7.6
83	NOV00514	4.2	4.4	4.6	3.7	-102.7	51.9	6.18	8.32	10.24	9.3	-104.9	2.9
84	NOV00517	1.1	1.1	1.2	4.8	-101.3	45.0	1.03	1.09	1.16	3.4	-105.6	3.3
85	NOV00521	0.5	0.6	0.8	4.7	-99.6	11.6	0.14	0.16	0.19	3.3	-100.0	7.0
86	NOV00522	0.8	0.9	1.1	7.9	-100.4	59.3	0.89	0.97	1.04	3.7	-105.1	6.5
87	NOV00525	3.3	3.5	3.7	2.5	-102.5	47.3	0.15	0.17	0.20	5.7	-98.6	3.1
88	NOV00526	2.8	3.2	3.6	7.4	-101.2	41.1	0.10	0.11	0.12	5.2	-98.8	-5.2
89	NOV00528	4.5	5.4	6.7	8.6	-97.9	24.4	0.48	0.66	0.91	9.1	-100.7	2.7
90	NOV00535	1.6	1.9	2.2	3.3	-98.1	48.2	0.43	0.64	0.93	11.5	-100.7	-2.2
91	NOV00537	3.7	3.9	4.2	3.7	-105.6	26.6	0.96	1.23	1.64	7.2	-101.2	7.4
92	NOV00538	1.2	1.3	1.3	1.9	-98.0	14.7	1.25	1.48	1.77	7.4	-102.6	2.9
93	NOV00576	1.9	2.4	2.9	6.0	-98.6	70.4	3.92	4.84	6.18	9.9	-101.7	11.3
94	NOV00591	4.3	5.0	6.0	10.8	-78.6	71.6	2.37	3.58	5.55	16.9	-84.7	6.1
95	NOV00592	5.0	5.7	7.2	13.4	-78.2	86.2	1.48	2.65	4.91	15.2	-84.3	6.0
96	NOV00593	4.4	4.7	5.1	10.8	-111.5	128.2	1.42	1.89	2.45	5.1	-104.7	-4.4
97	NOV00601	1.9	2.4	2.9	7.8	-97.5	54.6	0.95	1.08	1.23	6.9	-103.8	1.8
98	NOV00609	4.2	4.6	5.2	13.9	-104.4	87.7	3.02	3.37	3.77	7.3	-107.7	0.1
99	NOV00622	5.8	6.6	7.7	9.0	-98.7	116.5	5.80	8.44	10.91	12.8	-100.9	4.7
100	NOV00656	3.9	4.4	5.0	9.9	-98.6	31.4	0.39	0.56	0.79	10.3	-103.0	-8.4

Broj jedinjenja	NOVARTIS kod	alamar Blue®						Optička gustina					
		I95CL vrednost	IC50 vrednost	U95CL vrednost	SQRT(CHISQ/df)	Maksimalni inhibitorski efekat	Minimalni inhibitorski efekat	I95CL vrednost	IC50 vrednost	U95CL vrednost	SQRT(CHISQ/df)	Maksimalni inhibitorski efekat	Minimalni inhibitorski efekat
101	NOV00664	1.0	1.1	1.2	7.0	-102.9	12.8	0.36	0.39	0.42	4.8	-102.8	12.6
102	NOV00684	1.0	1.2	1.4	9.0	-102.8	38.7	1.00	1.29	1.71	12.2	-103.5	3.8
103	NOV00685	3.9	4.3	4.7	8.5	-108.8	59.2	2.70	3.20	3.70	8.0	-108.4	-7.3
104	NOV00688	0.1	0.1	0.2	4.6	-97.4	44.4	0.56	0.64	0.73	3.3	-105.6	0.6
105	NOV00694	2.1	2.5	3.0	8.3	-99.4	42.7	1.20	1.38	1.60	4.7	-103.9	-3.0
106	NOV00701	4.6	5.0	5.5	6.6	-90.8	68.1	2.16	4.54	8.42	11.5	-96.1	-4.6
107	NOV00704	6.8	7.9	8.9	2.5	-97.7	12.0	1.74	3.40	6.33	20.1	-87.9	6.4
108	NOV00722	0.5	0.5	0.6	7.1	-97.7	54.5	0.73	0.98	1.27	8.5	-106.1	-4.5
109	NOV00733	3.7	4.1	4.6	7.9	-100.6	26.8	2.85	3.51	4.45	15.6	-102.0	9.0
110	NOV00745	3.8	4.2	4.6	3.0	-96.7	22.5	2.38	3.06	3.84	10.2	-96.6	-1.7
111	NOV00754	0.3	0.4	0.4	7.3	-103.2	3.4	0.31	0.35	0.39	3.9	-102.9	-2.3
112	NOV00755	3.9	4.3	4.8	8.7	-102.1	46.5	3.92	5.16	6.95	10.0	-100.1	-0.6
113	NOV00763	1.2	1.7	2.5	9.0	-99.2	21.6	1.03	1.22	1.46	7.6	-101.2	-8.2
114	NOV00764	3.8	4.1	4.5	8.2	-107.7	43.0	1.56	2.51	3.39	13.7	-104.6	-2.3
115	NOV00767	3.3	3.9	4.7	17.0	-104.7	60.3	0.66	1.06	1.62	12.7	-103.8	1.7
116	NOV00770	3.6	3.9	4.2	6.0	-103.9	16.6	0.23	0.50	1.48	19.6	-104.6	-5.2
117	NOV00776	0.3	0.4	0.4	3.4	-101.9	7.1	0.37	0.67	1.09	17.8	-99.8	-6.8
118	NOV00779	0.3	0.4	0.4	9.3	-97.2	14.1	0.41	0.54	0.77	12.0	-95.9	6.3
119	NOV00784	1.1	1.2	1.3	3.7	-96.1	4.3	1.12	1.22	1.33	5.4	-97.9	9.2
120	NOV00787	1.0	1.1	1.2	3.9	-99.0	15.9	3.19	3.83	4.61	9.2	-98.9	-3.6
121	NOV00791	3.5	4.2	5.1	16.5	-100.1	29.0	2.77	3.15	3.55	6.9	-100.2	-3.5
122	NOV00794	3.8	4.1	4.4	4.2	-99.1	29.5	1.13	1.43	1.89	12.3	-96.9	-0.1
123	NOV00801	0.9	1.1	1.5	18.7	-102.8	20.1	0.40	0.72	1.46	17.7	-98.7	-2.5
124	NOV00805	3.7	4.1	4.6	8.2	-102.8	30.4	2.86	3.41	4.12	10.2	-98.6	6.8
125	NOV00811	4.0	4.4	5.0	10.4	-99.1	64.4	3.33	4.96	8.92	21.2	-95.6	8.7
126	NOV00812	3.8	4.2	4.6	8.7	-103.7	38.9	3.58	3.93	4.31	6.5	-99.6	14.2
127	NOV00818	3.3	3.6	4.0	4.6	-104.8	21.6	3.36	5.13	8.90	19.2	-96.8	6.2
128	NOV00819	4.4	5.2	6.7	12.0	-86.6	54.7	2.70	4.32	7.79	14.2	-85.6	4.5
129	NOV00821	1.1	1.2	1.4	7.1	-102.5	18.1	1.12	1.41	1.86	13.2	-95.9	7.8
130	NOV00822	3.5	3.9	4.4	5.6	-96.4	11.0	3.64	6.49	14.17	23.8	-92.4	8.3
131	NOV00823	1.2	1.3	1.4	3.3	-103.6	33.6	1.09	1.53	2.41	16.6	-98.9	6.3
132	NOV00825	1.3	2.0	3.6	22.2	-100.9	22.3	1.32	2.34	3.72	18.2	-98.7	-2.3
133	NOV00826	1.4	1.7	2.1	3.7	-100.7	24.3	3.50	5.80	20.00	18.0	-61.7	10.2
134	NOV00827	1.2	1.4	1.6	9.0	-96.3	47.6	1.06	1.88	3.49	21.2	-98.3	17.6
135	NOV00828	2.5	3.3	4.4	18.2	-101.0	32.5	2.25	3.76	6.65	19.4	-94.7	2.8
136	NOV00833	0.4	0.4	0.5	7.2	-98.7	14.8	0.28	0.36	0.48	8.1	-95.7	6.9
137	NOV00835	4.0	4.3	4.6	5.1	-105.0	51.4	1.64	2.61	3.68	16.4	-100.9	5.8
138	NOV00836	1.3	2.4	4.3	24.3	-98.9	16.6	1.13	1.58	2.51	15.8	-97.2	12.9
139	NOV00837	3.7	4.1	4.6	8.7	-103.1	34.3	3.48	3.77	4.09	4.4	-102.9	14.9
140	NOV00839	4.5	5.2	6.2	10.5	-91.5	77.4	3.29	3.67	4.10	8.2	-101.1	7.1
141	NOV00840	0.4	0.4	0.5	10.5	-99.0	32.8	0.16	0.32	0.64	21.3	-97.1	6.3
142	NOV00842	0.1	0.2	0.4	16.9	-97.3	15.2	0.36	0.53	0.84	11.5	-100.1	2.9
143	NOV00843	1.0	1.2	1.3	6.4	-104.3	9.5	0.99	1.36	1.96	13.8	-96.1	5.6
144	NOV00844	1.1	1.2	1.4	5.4	-100.5	31.0	0.84	4.09	9.79	32.6	-52.5	6.7
145	NOV00845	1.0	1.4	2.1	17.4	-99.4	27.9	0.01	0.01	0.01	20.2	-94.8	-2.0
146	NOV00847	1.2	1.3	1.5	5.9	-102.3	37.1	0.92	1.15	1.44	12.1	-97.4	3.5
147	NOV00849	1.1	1.3	1.4	5.8	-99.9	15.0	1.06	1.15	1.25	4.3	-100.1	8.3
148	NOV00850	4.0	4.3	4.5	3.9	-107.5	54.0	1.26	2.48	3.96	19.7	-98.2	-1.0
149	NOV00851	0.1	0.1	0.1	5.8	-98.5	30.1	0.10	0.11	0.13	11.3	-104.0	2.6
150	NOV00853	0.3	0.4	0.5	24.6	-99.7	39.8	0.31	0.35	0.39	5.8	-98.9	-4.9
151	NOV00854	0.3	0.4	0.4	6.7	-102.7	19.1	0.11	0.12	0.14	5.4	-100.1	2.7
152	NOV00858	3.8	4.1	4.5	5.3	-105.7	39.1	2.39	3.50	5.07	11.0	-99.2	-1.4
153	NOV00859	3.7	4.1	4.5	7.6	-105.8	35.9	1.81	2.46	3.04	7.8	-105.5	0.3
154	NOV00862	0.1	0.2	0.3	4.6	-82.8	26.7	0.44	0.70	1.18	14.0	-87.9	3.1

PRILOG 2.

Jedinjenja sa $IC_{50} < 20 \mu M$ u oba eseja. Za svako jedinjenje IC_{50} vrednost je predstavljena zajedno sa donjim i gornjim 95% intervalom poverljivosti (LCL95 i UCL95). Takođe, predstavljen je i maksimalni i minimalni efekat koji pokazuje najjaču i najmanju inhibiciju primećenu u opsegu ispitivanih koncentracija (6.3nM do 20 μM). Sive obojene tabele predstavljaju vrednosti dobijene alamarBlue® esejom, a bele merenjem optičke gustine.

Broj jedinjenja	NOVARTIS kod	alamar Blue®						Optička gustina					
		U95CL vrednost	IC50 vrednost	U95CL vrednost	SQRT(CHISQ/df)	Maksimalni inhibitorski efekat	Minimalni inhibitorski efekat	U95CL vrednost	IC50 vrednost	U95CL vrednost	SQRT(CHISQ/df)	Maksimalni inhibitorski efekat	Minimalni inhibitorski efekat
1	NOV00001	12.4	13.7	15.1	4.4	-89.8	22.9	10.87	11.90	12.97	6.7	-96.9	4.7
2	NOV00002	14.7	15.7	16.8	8.6	-95.9	124.4	7.53	8.96	10.41	7.4	-99.3	0.1
3	NOV00007	6.5	8.6	11.3	8.0	-89.4	31.5	8.42	10.09	11.79	9.8	-97.4	4.5
4	NOV00008	12.3	13.8	15.6	10.6	-95.2	41.6	10.13	11.19	12.33	7.4	-103.6	0.4
5	NOV00009	12.5	13.7	15.1	6.4	-94.5	33.4	10.76	13.02	16.07	5.5	-65.0	-8.9
6	NOV00012	3.9	4.4	5.0	7.1	-87.1	47.1	12.50	14.56	17.16	7.0	-65.4	-0.4
7	NOV00013	13.1	14.3	15.7	8.5	-96.4	53.5	10.19	11.88	13.73	7.7	-79.7	-2.0
8	NOV00015	13.6	14.9	16.4	6.0	-86.3	60.9	8.65	9.36	10.08	3.5	-100.0	-0.3
9	NOV00016	12.4	14.2	16.4	13.6	-91.5	83.1	8.58	12.58	18.63	8.3	-61.7	1.0
10	NOV00018	13.4	14.9	16.5	8.7	-87.1	51.7	9.68	11.27	13.09	8.4	-88.8	38.0
11	NOV00023	10.9	12.1	13.4	5.3	-98.0	13.9	9.90	10.94	12.01	6.7	-103.5	-0.7
12	NOV00025	11.3	12.7	14.4	5.4	-86.3	28.9	7.10	8.68	10.30	8.1	-99.9	3.4
13	NOV00026	15.4	17.2	19.5	6.5	-64.0	57.6	2.20	6.45	10.45	9.5	-78.7	8.7
14	NOV00032	12.2	13.4	14.7	3.9	-88.3	44.5	4.99	8.37	12.05	18.0	-97.4	9.9
15	NOV00035	11.9	13.1	14.4	5.1	-92.1	16.9	12.64	15.36	19.40	8.3	-62.3	3.9
16	NOV00039	14.5	15.6	16.8	9.7	-88.4	104.2	10.73	11.80	12.97	7.4	-99.9	4.7
17	NOV00040	8.1	9.9	11.8	7.2	-88.0	50.6	8.68	10.07	11.48	8.3	-98.7	3.8
18	NOV00041	13.4	14.5	15.7	6.7	-86.4	38.1	3.96	7.07	10.78	16.5	-51.0	6.4
19	NOV00044	13.0	14.0	15.1	4.2	-84.7	37.6	13.62	16.08	19.77	9.4	-62.4	4.6
20	NOV00047	9.1	11.6	14.3	17.1	-97.6	20.0	10.17	11.24	12.34	6.8	-96.4	6.9
21	NOV00048	10.1	11.5	13.0	7.4	-96.6	22.1	12.01	14.76	18.72	8.6	-63.2	-0.3
22	NOV00052	15.3	16.9	18.9	6.2	-64.5	47.6	13.73	14.53	15.40	3.3	-73.5	11.9
23	NOV00054	13.5	14.4	15.3	3.6	-90.8	42.0	10.34	11.70	13.16	7.9	-89.7	37.5
24	NOV00059	11.8	13.0	14.2	3.3	-85.9	37.1	3.59	6.76	10.90	18.8	-97.6	20.3
25	NOV00060	15.4	17.6	20.0	10.2	-61.9	49.0	7.29	10.72	14.39	17.8	-89.5	3.6
26	NOV00061	14.1	14.9	15.7	4.5	-93.8	85.8	10.34	14.41	20.00	11.0	-63.3	-1.9
27	NOV00062	13.7	15.1	16.8	5.3	-73.2	31.6	7.36	10.01	12.76	10.9	-83.5	1.0
28	NOV00069	13.2	13.8	14.6	3.7	-96.6	40.9	7.30	9.48	11.50	9.5	-97.6	-6.0
29	NOV00075	14.9	15.8	16.7	3.2	-75.7	47.9	11.09	13.36	16.16	9.0	-71.8	4.0
30	NOV00076	13.6	17.1	20.0	5.2	-55.4	28.7	10.02	11.32	12.73	8.0	-99.0	7.8
31	NOV00077	17.5	18.7	20.0	5.1	-57.5	81.4	14.94	19.93	20.00	10.7	-50.1	2.0
32	NOV00078	10.8	11.7	12.6	3.0	-95.5	24.5	11.76	12.55	13.37	5.1	-98.0	14.6
33	NOV00079	13.1	13.9	14.7	4.4	-94.1	40.1	10.63	13.85	18.50	8.5	-63.5	-1.1
34	NOV00080	9.7	11.1	12.7	7.1	-91.5	32.2	6.93	9.03	11.17	10.5	-95.9	14.0
35	NOV00087	12.5	13.7	14.9	8.7	-97.5	39.0	10.26	14.05	20.00	13.4	-66.6	-4.4
36	NOV00090	12.6	13.6	14.5	5.5	-98.0	35.0	9.98	11.47	13.15	10.2	-102.3	4.9
37	NOV00091	13.0	14.2	15.4	7.1	-89.4	73.4	10.67	12.39	14.45	11.5	-95.1	10.4
38	NOV00094	14.7	16.3	18.3	10.8	-74.1	59.4	8.81	11.71	15.06	13.7	-81.9	-7.2
39	NOV00096	11.9	12.8	13.8	3.5	-95.3	22.1	10.44	11.80	13.25	9.3	-98.5	7.8
40	NOV00097	11.8	13.0	14.3	6.3	-91.3	48.1	10.67	11.83	13.08	7.5	-97.7	7.2

Broj jedinjenja	NOVARTIS kod	alaran Blue®						Optička gustina					
		I95CL vrednost	IC50 vrednost	U95CL vrednost	SQRT(CHISQ/df)	Maksimalni inhibitory efekat	Minimalni inhibitory efekat	I95CL vrednost	IC50 vrednost	U95CL vrednost	SQRT(CHISQ/df)	Maksimalni inhibitory efekat	Minimalni inhibitory efekat
41	NOV00100	14.1	15.8	17.9	7.1	-69.9	27.0	8.88	10.81	13.04	12.7	-101.6	2.4
42	NOV00102	12.3	13.7	15.3	9.3	-90.6	35.1	6.91	11.26	16.61	23.4	-87.6	-1.2
43	NOV00103	13.1	14.1	15.3	6.4	-90.8	35.6	5.73	7.34	9.02	7.9	-99.6	2.9
44	NOV00105	13.1	14.1	15.2	7.4	-96.2	49.6	3.58	5.17	7.67	13.0	-103.9	-8.5
45	NOV00106	13.5	14.4	15.3	4.4	-93.1	48.1	9.42	10.65	11.93	6.4	-92.4	-6.1
46	NOV00108	13.3	14.4	15.6	9.1	-95.1	53.7	8.36	10.12	11.88	9.1	-93.5	-5.4
47	NOV00110	11.4	12.6	13.9	7.6	-97.2	13.6	8.16	9.45	10.83	7.4	-102.5	0.0
48	NOV00114	13.4	14.2	15.1	4.8	-96.2	51.0	7.37	9.13	10.96	10.2	-105.3	-2.7
49	NOV00115	12.7	13.6	14.6	5.2	-97.5	34.1	8.54	10.13	11.88	10.1	-103.1	-0.3
50	NOV00117	10.8	12.8	15.3	12.4	-91.2	38.5	9.46	12.12	15.29	8.0	-69.3	-7.9
51	NOV00119	12.1	13.2	14.5	7.2	-97.1	44.2	3.28	4.93	7.14	9.7	-102.4	-7.6
52	NOV00120	14.2	17.5	20.0	13.4	-59.0	20.4	9.98	12.10	14.78	6.5	-71.7	-1.4
53	NOV00122	12.1	13.4	14.8	5.5	-84.1	26.5	12.72	13.79	14.97	4.2	-74.7	7.5
54	NOV00136	11.2	12.2	13.4	6.8	-90.5	49.0	9.22	10.44	11.68	7.5	-98.7	-0.4
55	NOV00138	14.0	14.8	15.7	7.5	-91.5	66.0	3.57	3.83	4.13	4.1	-93.4	3.4
56	NOV00142	9.5	10.3	11.1	4.3	-97.8	6.6	3.26	3.55	3.86	4.9	-102.8	4.0
57	NOV00144	11.4	12.3	13.2	5.4	-90.2	33.1	0.56	1.94	20.00	27.4	-64.0	2.3
58	NOV00147	14.1	14.6	15.2	5.3	-97.9	77.6	11.51	12.17	12.83	4.2	-98.8	7.1
59	NOV00148	3.8	4.0	4.2	5.0	-107.5	32.3	12.64	15.13	19.07	8.2	-64.5	-0.1
60	NOV00153	13.6	14.2	14.9	6.5	-99.8	76.4	12.16	17.66	20.00	13.0	-54.2	6.6
61	NOV00160	7.9	9.0	10.2	6.8	-97.1	63.8	10.20	10.85	11.50	3.5	-101.4	1.6
62	NOV00163	1.0	1.1	1.2	5.5	-92.2	41.6	11.95	13.98	16.26	11.1	-78.9	5.5
63	NOV00165	14.0	14.6	15.3	5.3	-94.3	60.7	14.50	15.48	16.57	1.5	-64.4	5.5
64	NOV00169	4.1	4.3	4.5	3.9	-107.2	60.1	13.32	14.17	15.08	2.3	-73.8	4.5
65	NOV00173	12.5	13.3	14.2	7.0	-98.4	34.7	12.59	16.32	20.00	9.8	-58.7	9.5
66	NOV00193	12.0	13.1	14.3	8.5	-98.4	28.5	9.57	11.63	13.71	13.2	-101.3	14.0
67	NOV00195	11.2	12.8	14.6	13.0	-97.7	29.5	0.68	0.92	1.20	7.1	-96.4	10.4
68	NOV00196	4.7	5.4	6.7	9.7	-68.8	62.1	11.52	14.19	17.82	12.2	-72.3	8.9
69	NOV00199	14.5	15.4	16.4	8.7	-92.2	93.0	4.13	5.22	7.18	8.8	-82.1	12.6
70	NOV00200	14.6	16.8	19.7	10.0	-64.4	72.0	12.16	18.05	20.00	15.2	-54.0	14.2
71	NOV00205	7.9	10.2	13.0	6.0	-73.1	32.6	11.05	15.61	20.00	17.4	-62.8	18.2
72	NOV00206	10.0	11.1	12.2	5.0	-98.3	4.4	12.50	15.18	19.12	12.8	-68.7	13.0
73	NOV00210	12.4	13.4	14.5	7.1	-95.5	35.1	10.07	11.61	13.25	11.9	-102.6	14.3
74	NOV00211	15.8	17.0	18.6	12.7	-78.4	126.5	10.19	12.23	14.55	7.6	-74.9	6.2
75	NOV00213	9.9	11.4	13.0	9.3	-100.0	59.2	9.92	12.28	14.68	16.3	-98.5	16.9
76	NOV00214	7.4	9.5	11.7	8.3	-86.5	36.2	10.02	13.93	19.17	16.9	-73.2	24.4
77	NOV00215	5.8	8.2	10.8	10.6	-91.7	22.9	9.23	11.85	14.51	14.1	-90.6	29.9
78	NOV00218	11.9	12.8	13.7	5.8	-99.1	54.9	8.84	11.49	14.84	18.1	-99.9	14.0
79	NOV00219	5.3	6.0	7.1	8.0	-99.7	58.6	10.64	13.82	18.33	18.8	-79.7	18.2
80	NOV00221	14.8	18.4	20.0	6.9	-53.1	85.5	10.57	12.70	15.21	7.1	-77.0	4.5
81	NOV00222	4.4	4.6	4.9	8.2	-108.4	98.9	10.20	12.20	14.42	12.9	-94.5	15.6
82	NOV00224	11.6	12.5	13.4	6.1	-98.3	31.1	10.88	13.06	15.64	17.6	-96.4	23.0
83	NOV00226	12.0	13.0	14.3	7.8	-97.5	48.7	7.28	9.53	11.84	12.2	-102.7	10.7
84	NOV00229	11.3	12.0	12.8	3.4	-95.8	46.5	10.39	11.63	12.93	6.4	-104.4	7.5
85	NOV00233	7.6	9.4	11.4	9.0	-99.1	38.5	10.67	13.14	15.89	13.7	-86.5	19.0
86	NOV00234	10.6	12.8	15.4	6.9	-69.7	32.3	11.09	12.67	14.52	9.5	-95.7	14.4
87	NOV00235	4.6	4.9	5.2	7.7	-102.5	114.6	11.40	12.94	14.67	6.4	-84.9	10.7
88	NOV00238	10.7	12.7	14.9	7.8	-78.6	66.7	10.86	12.60	14.72	14.1	-101.2	19.8
89	NOV00239	12.6	16.5	20.0	9.0	-57.7	28.0	14.46	18.54	20.00	14.2	-54.4	15.0
90	NOV00241	3.3	3.6	3.9	3.9	-99.6	27.4	10.86	12.20	13.64	9.7	-96.7	15.4
91	NOV00242	16.0	18.5	20.0	7.6	-55.6	58.7	8.54	11.98	15.53	10.9	-74.4	9.6
92	NOV00245	4.2	4.5	4.9	6.2	-100.2	64.4	10.28	11.40	12.57	8.5	-105.2	9.7
93	NOV00246	11.7	12.8	14.0	5.8	-95.2	25.2	4.01	5.02	6.56	9.5	-97.1	14.3
94	NOV00249	3.4	3.9	4.3	6.5	-92.2	52.5	10.80	12.56	14.39	9.8	-88.3	14.0
95	NOV00254	10.3	11.7	13.3	6.3	-89.4	68.4	9.94	11.87	14.20	14.8	-102.3	16.2
96	NOV00255	12.1	13.4	14.9	9.5	-96.0	64.3	11.43	12.66	13.99	8.4	-92.4	7.9
97	NOV00256	11.6	12.8	14.1	5.8	-91.5	42.8	10.54	11.98	13.53	7.4	-91.8	11.2
98	NOV00257	10.2	11.6	13.2	7.0	-94.0	41.8	14.75	17.52	20.00	8.0	-56.9	7.9
99	NOV00259	8.5	11.7	15.8	10.3	-73.0	46.0	11.42	15.05	20.00	12.7	-65.1	14.7
100	NOV00260	13.5	14.6	15.7	6.1	-88.4	61.2	11.31	12.21	13.16	6.5	-100.3	14.7

Broj jedinjenja	NOVA RTIS kod	alamar Blue®						Optička gustina					
		U95CL vrednost	IC50 vrednost	U95CL vrednost	SQRT(CHISQ/df)	Maksimalni inhibitorsni efekat	Minimalni inhibitorsni efekat	U95CL vrednost	IC50 vrednost	U95CL vrednost	SQRT(CHISQ/df)	Maksimalni inhibitorsni efekat	Minimalni inhibitorsni efekat
101	NOV00262	12.4	14.3	16.6	5.3	-66.4	25.4	11.43	12.68	14.12	7.3	-90.5	11.1
102	NOV00264	10.0	11.0	12.2	3.2	-86.4	22.5	10.99	15.54	20.00	12.4	-59.5	13.2
103	NOV00267	14.1	14.9	15.8	7.8	-97.9	79.1	10.59	11.50	12.44	5.5	-99.8	6.7
104	NOV00269	13.6	14.8	16.1	8.9	-86.4	125.2	11.57	13.76	16.48	12.2	-78.0	7.2
105	NOV00273	11.3	12.2	13.2	5.1	-95.7	73.8	11.29	12.12	13.00	4.9	-96.2	6.9
106	NOV00278	3.4	3.8	4.4	6.8	-94.0	43.2	9.07	10.76	12.66	9.5	-95.2	13.8
107	NOV00280	16.1	17.2	18.5	4.1	-66.6	64.4	12.90	15.51	19.72	8.6	-64.4	31.1
108	NOV00281	14.5	15.3	16.1	3.5	-88.8	68.2	10.51	11.64	12.84	6.7	-95.3	8.8
109	NOV00287	14.5	15.3	16.2	5.4	-89.8	70.8	12.96	18.81	20.00	18.3	-52.9	8.4
110	NOV00289	14.2	16.0	18.2	11.4	-74.4	51.0	10.41	11.33	12.30	5.2	-101.8	2.1
111	NOV00290	14.8	16.1	17.8	11.2	-80.4	78.4	13.69	17.58	20.00	5.5	-53.6	-2.1
112	NOV00294	14.5	15.3	16.0	3.8	-90.8	78.9	13.27	14.55	16.01	2.1	-67.2	1.2
113	NOV00295	14.8	15.6	16.4	7.0	-97.1	125.3	3.15	3.50	3.89	5.7	-99.7	0.2
114	NOV00297	12.7	14.3	16.1	9.5	-86.8	66.9	7.94	9.56	11.22	6.7	-90.0	4.8
115	NOV00298	15.5	16.5	17.6	5.8	-76.8	75.9	12.68	14.95	17.97	8.9	-67.2	21.9
116	NOV00299	14.8	15.5	16.3	4.9	-95.0	102.9	10.91	12.85	15.13	5.9	-70.5	-5.5
117	NOV00300	14.6	15.3	16.0	4.0	-93.9	86.7	13.24	15.68	19.02	4.6	-59.0	-1.5
118	NOV00301	4.7	5.1	5.7	6.9	-81.2	63.4	11.36	12.53	13.77	4.3	-81.8	0.8
119	NOV00302	13.3	14.4	15.5	5.7	-90.0	56.8	10.95	11.89	12.88	5.8	-98.4	4.4
120	NOV00304	4.4	4.7	5.0	4.0	-99.4	73.7	11.23	13.71	16.92	4.5	-59.9	0.9
121	NOV00308	12.4	13.4	14.5	3.8	-88.8	22.9	10.75	12.62	14.96	8.6	-79.0	15.2
122	NOV00311	13.3	14.1	15.0	5.2	-97.6	56.8	16.56	19.15	20.00	4.7	-51.7	7.1
123	NOV00314	12.8	13.7	14.6	5.0	-97.8	40.9	2.99	3.37	3.82	7.0	-100.0	5.1
124	NOV00326	15.1	16.5	18.1	7.2	-71.3	54.2	3.10	3.56	4.12	7.1	-99.5	3.4
125	NOV00334	15.0	19.4	20.0	5.4	-50.9	30.0	7.73	9.62	11.68	10.7	-99.2	-0.1
126	NOV00340	1.2	1.2	1.3	4.2	-107.8	26.4	11.02	12.28	13.64	5.3	-83.3	1.8
127	NOV00341	5.5	7.9	10.0	5.5	-87.8	17.8	8.97	11.43	14.17	13.3	-86.3	15.3
128	NOV00345	11.7	12.8	14.0	5.2	-92.7	31.7	9.09	11.17	13.43	10.7	-88.6	13.9
129	NOV00346	4.4	5.0	5.8	7.8	-77.6	34.7	8.92	11.53	14.78	5.0	-66.7	9.9
130	NOV00347	13.5	14.7	16.0	4.5	-79.2	30.5	12.59	15.42	19.72	9.3	-63.3	14.0
131	NOV00350	11.0	12.3	13.6	6.3	-93.1	31.1	11.14	12.54	14.00	8.0	-92.8	11.3
132	NOV00351	15.3	17.3	19.9	8.8	-63.4	45.2	12.28	14.56	17.32	5.7	-65.1	6.1
133	NOV00353	16.8	17.6	18.6	5.0	-71.2	121.4	3.87	4.32	4.87	4.2	-79.2	4.8
134	NOV00357	10.6	12.1	13.8	5.2	-83.9	18.5	13.21	15.00	17.09	8.3	-73.0	17.9
135	NOV00358	13.7	15.5	17.8	6.5	-68.4	35.8	16.44	19.36	20.00	4.6	-51.4	10.1
136	NOV00362	13.6	14.3	15.1	3.2	-97.9	58.9	6.69	8.70	10.80	9.8	-101.3	-1.8
137	NOV00368	13.3	14.1	15.1	5.9	-90.8	36.1	7.37	9.61	11.93	10.3	-88.9	6.9
138	NOV00369	13.1	14.1	15.2	6.3	-86.3	26.7	9.58	10.95	12.40	5.2	-81.0	11.7
139	NOV00371	8.4	10.6	12.9	11.5	-92.3	22.5	3.57	4.12	4.79	6.2	-99.1	15.5
140	NOV00375	9.8	11.2	12.5	5.9	-92.0	25.9	11.45	12.70	14.06	9.2	-94.0	14.7
141	NOV00376	13.8	14.4	15.0	3.3	-97.4	57.8	8.58	14.36	20.00	16.3	-61.9	2.6
142	NOV00377	10.9	11.8	12.6	2.5	-89.7	25.1	12.09	14.96	19.27	11.1	-65.6	4.9
143	NOV00378	13.6	14.1	14.7	2.8	-95.7	49.9	9.26	10.84	12.51	8.9	-92.0	6.0
144	NOV00379	10.1	11.2	12.3	5.4	-96.2	30.6	9.84	10.84	11.91	5.4	-96.8	32.6
145	NOV00380	12.3	13.0	13.7	3.5	-99.0	28.7	9.30	10.78	12.32	10.3	-102.4	7.3
146	NOV00381	12.7	13.3	14.0	1.9	-95.4	29.9	10.16	11.46	12.82	9.7	-102.3	1.3
147	NOV00385	14.0	18.7	20.0	19.9	-54.5	28.1	10.49	11.91	13.43	10.0	-95.9	4.1
148	NOV00388	11.3	12.0	12.7	3.3	-100.3	8.5	11.11	12.64	14.34	7.9	-81.4	3.4
149	NOV00391	14.0	14.7	15.4	5.3	-95.4	65.2	8.34	10.12	11.92	10.8	-99.3	0.2
150	NOV00394	11.5	13.1	14.9	5.9	-73.3	12.1	10.59	13.18	16.43	15.7	-81.9	5.6
151	NOV00397	10.1	11.0	12.0	4.6	-94.5	11.7	8.74	11.87	15.60	15.6	-81.7	-6.1
152	NOV00399	11.5	13.3	15.5	7.7	-74.1	55.2	13.83	16.26	19.90	9.9	-62.9	10.5
153	NOV00400	13.3	14.8	16.7	7.0	-74.3	45.2	10.94	12.07	13.26	6.2	-88.2	7.8
154	NOV00402	10.9	11.8	12.8	3.3	-84.7	13.0	11.73	12.55	13.40	6.0	-98.8	15.1
155	NOV00410	13.6	16.3	20.0	6.9	-59.0	43.5	12.69	14.70	17.25	10.1	-71.9	7.8
156	NOV00412	14.4	14.9	15.4	3.7	-97.9	80.4	5.55	8.17	10.89	11.2	-94.0	12.0
157	NOV00414	11.1	12.1	13.2	4.3	-90.4	35.8	10.27	12.39	14.79	8.9	-76.3	7.6
158	NOV00416	11.7	12.9	14.1	6.7	-89.6	41.6	12.33	13.08	13.87	3.3	-86.0	6.6
159	NOV00417	12.6	13.5	14.5	4.7	-88.4	17.2	3.25	3.50	3.76	4.5	-104.0	0.2
160	NOV00418	11.5	12.9	14.5	4.8	-77.3	23.8	14.90	18.71	20.00	6.4	-52.1	5.8

Broj jedinjenja	NOVARTIS kod	alamar Blue®						Optička gustina					
		L95CL vrednost	IC50 vrednost	U95CL vrednost	SQRT(CHISO/df)	Maksimalni inhibitory efekat	Minimalni inhibitory efekat	L95CL vrednost	IC50 vrednost	U95CL vrednost	SQRT(CHISO/df)	Maksimalni inhibitory efekat	Minimalni inhibitory efekat
161	NOV00420	12.4	13.4	14.4	4.7	-88.0	16.5	11.22	12.01	12.85	5.2	-99.3	6.9
162	NOV00421	13.7	15.1	16.6	2.5	-67.1	15.7	11.27	13.08	15.17	11.3	-84.7	6.8
163	NOV00422	12.6	14.8	17.6	3.5	-61.5	3.6	12.79	18.90	20.00	16.1	-52.3	0.1
164	NOV00425	13.8	14.6	15.5	4.9	-88.6	67.3	7.37	10.01	12.73	9.8	-81.7	7.9
165	NOV00426	12.2	13.1	14.2	4.6	-88.7	23.2	11.89	14.96	19.17	11.7	-66.9	4.9
166	NOV00428	11.3	12.4	13.5	4.2	-87.8	10.5	11.58	12.85	14.24	5.1	-77.5	7.7
167	NOV00433	14.1	15.1	16.2	5.6	-86.4	57.8	9.79	12.49	16.29	11.5	-76.9	-2.0
168	NOV00436	11.2	12.4	13.7	7.2	-93.5	21.0	11.63	13.17	14.92	7.3	-78.8	42.0
169	NOV00442	13.7	14.7	15.9	10.3	-97.5	73.0	8.09	9.73	11.28	7.5	-100.1	-7.7
170	NOV00447	12.4	13.7	15.3	5.4	-79.1	29.0	9.97	10.96	12.03	4.9	-96.3	6.9
171	NOV00448	11.0	11.8	12.6	2.8	-99.0	17.0	10.62	11.74	12.92	7.1	-96.7	12.0
172	NOV00449	14.4	15.6	17.1	8.4	-83.1	65.7	13.84	18.85	20.00	6.8	-51.6	-0.6
173	NOV00450	3.9	4.2	4.5	6.4	-103.1	38.7	9.60	12.98	16.89	10.7	-70.6	3.5
174	NOV00451	10.2	11.3	12.5	4.6	-92.4	24.6	10.58	12.09	13.85	9.1	-92.7	26.5
175	NOV00454	10.7	11.7	12.7	4.0	-95.0	15.7	12.32	14.42	17.09	11.1	-74.3	23.3
176	NOV00455	12.9	13.9	15.0	8.4	-97.4	81.7	3.34	3.66	4.03	6.5	-102.8	5.5
177	NOV00456	12.9	13.9	14.9	7.7	-97.9	45.5	7.73	9.40	11.09	9.5	-101.6	-0.1
178	NOV00459	14.5	15.3	16.1	5.6	-94.0	85.4	11.09	12.47	13.97	7.4	-90.5	11.2
179	NOV00472	13.7	14.5	15.4	6.3	-97.4	66.9	7.14	9.17	11.42	10.6	-96.9	0.2
180	NOV00473	11.4	12.3	13.3	4.5	-98.8	11.1	3.26	3.58	3.93	6.4	-107.3	1.9
181	NOV00474	14.5	15.3	16.2	6.0	-90.8	94.8	3.04	3.70	4.61	9.6	-95.1	11.0
182	NOV00475	12.4	13.3	14.3	5.1	-94.1	25.8	10.31	11.60	12.96	9.1	-98.8	13.7
183	NOV00477	13.5	14.3	15.2	4.9	-92.3	46.5	7.56	9.33	11.20	6.8	-84.0	1.1
184	NOV00478	11.8	12.7	13.7	3.9	-94.9	13.1	11.90	13.22	14.62	5.9	-79.3	6.1
185	NOV00479	12.9	13.8	14.7	6.1	-99.4	53.2	9.73	10.78	11.85	6.7	-101.7	3.8
186	NOV00480	14.7	16.0	17.4	4.4	-70.6	34.9	10.59	12.07	13.63	4.2	-74.0	-1.5
187	NOV00487	7.9	9.9	12.1	12.0	-97.5	51.2	12.61	15.20	18.97	8.8	-63.4	9.1
188	NOV00488	11.6	12.8	14.1	8.4	-98.4	26.7	3.14	3.58	4.08	8.5	-105.1	6.9
189	NOV00493	13.3	15.2	17.5	8.3	-71.0	63.6	11.81	14.20	17.55	4.8	-61.8	6.9
190	NOV00494	12.1	13.2	14.3	5.3	-89.5	58.3	3.37	4.25	5.47	7.8	-90.9	7.0
191	NOV00497	15.0	17.0	19.5	6.6	-62.0	51.8	12.86	16.75	20.00	8.0	-55.6	2.9
192	NOV00498	12.8	14.4	16.2	5.9	-72.7	8.0	13.79	15.79	18.40	5.2	-60.6	8.9
193	NOV00502	12.4	13.3	14.3	5.2	-97.8	33.7	16.34	18.95	20.00	5.6	-52.4	5.9
194	NOV00506	12.6	13.8	15.1	7.2	-82.2	47.1	11.49	12.61	13.81	5.7	-84.4	2.8
195	NOV00511	10.1	10.9	11.9	4.3	-92.5	27.0	11.81	12.82	13.94	7.4	-99.5	21.9
196	NOV00513	13.4	14.0	14.6	4.1	-95.3	45.0	11.81	13.48	15.53	6.8	-75.2	6.8
197	NOV00515	10.1	10.9	11.6	3.9	-100.0	5.4	11.34	13.45	16.01	10.7	-76.6	1.5
198	NOV00516	12.6	13.7	14.8	7.0	-86.7	59.1	13.95	15.74	17.98	4.9	-62.0	4.6
199	NOV00518	12.4	13.8	15.4	4.5	-71.1	37.9	15.88	18.62	20.00	5.0	-53.1	4.2
200	NOV00520	12.1	13.8	15.8	7.8	-74.0	28.3	13.09	16.62	20.00	10.2	-58.0	-0.4
201	NOV00529	15.1	17.7	20.0	6.3	-55.6	21.9	4.82	7.04	15.36	7.3	-61.1	3.0
202	NOV00533	13.1	13.6	14.2	3.1	-97.1	36.2	3.58	4.48	5.94	10.1	-96.9	9.8
203	NOV00541	13.2	15.1	17.3	6.2	-68.9	50.5	16.62	18.96	20.00	4.6	-52.6	7.1
204	NOV00548	13.0	14.6	16.4	4.7	-71.2	68.3	14.54	18.14	20.00	11.4	-55.0	11.9
205	NOV00550	10.5	11.8	13.2	3.1	-83.1	26.4	14.43	15.78	17.42	4.0	-64.3	5.5
206	NOV00556	11.5	12.3	13.1	5.4	-97.0	40.3	10.98	12.14	13.39	6.5	-97.4	33.3
207	NOV00557	13.0	13.6	14.1	4.1	-98.6	49.6	10.98	12.16	13.47	7.3	-102.0	16.7
208	NOV00559	12.4	13.2	13.9	5.8	-98.9	29.8	11.64	13.14	14.82	7.7	-85.5	9.0
209	NOV00561	13.4	14.3	15.4	3.8	-79.1	27.2	12.18	14.05	16.31	8.0	-70.6	3.5
210	NOV00562	12.6	13.3	14.1	4.3	-91.9	66.4	0.57	0.83	1.09	13.5	-103.3	-1.5
211	NOV00565	17.0	19.4	20.0	10.5	-52.8	57.5	9.74	11.03	12.44	6.5	-105.1	1.0
212	NOV00571	13.7	14.7	15.9	9.4	-96.5	76.2	12.40	13.87	15.65	7.2	-77.8	8.6
213	NOV00574	3.7	4.1	4.6	6.2	-94.9	68.0	8.61	10.40	12.20	11.7	-101.2	13.2
214	NOV00575	4.2	4.5	4.8	3.7	-98.6	58.1	10.47	12.52	14.85	12.1	-84.6	4.7
215	NOV00578	12.4	13.8	15.3	8.0	-83.9	79.2	12.88	14.00	15.24	4.6	-73.4	7.3
216	NOV00579	12.6	13.7	14.8	4.2	-79.8	22.5	15.15	16.74	18.76	4.7	-59.7	5.7
217	NOV00588	12.7	14.0	15.6	10.8	-95.7	61.7	7.91	9.90	12.18	4.4	-82.9	-6.0
218	NOV00589	13.3	14.2	15.2	7.1	-93.6	48.6	10.23	11.72	13.33	7.4	-95.6	1.9
219	NOV00590	12.6	13.5	14.5	6.6	-94.8	30.2	14.70	19.68	20.00	7.5	-50.6	2.7
220	NOV00594	14.0	15.1	16.4	12.2	-96.2	83.3	8.82	10.41	12.08	7.2	-98.8	7.2

Broj jedinjenja	NOVARTIS kod	alamar Blue®						Optička gustina					
		L95CL vrednost	IC50 vrednost	U95CL vrednost	SORT(CHISO/df)	Maksimalni inhibitory efekat	Minimalni inhibitory efekat	L95CL vrednost	IC50 vrednost	U95CL vrednost	SORT(CHISO/df)	Maksimalni inhibitory efekat	Minimalni inhibitory efekat
221	NOV00595	14.1	14.9	15.7	7.2	-98.3	90.6	8.25	10.73	13.24	13.8	-98.2	5.5
222	NOV00597	11.1	11.9	12.7	2.7	-91.0	46.2	3.39	5.92	9.69	16.7	-101.9	-1.2
223	NOV00598	11.4	12.9	14.5	7.9	-84.2	32.2	12.10	15.62	20.00	18.1	-68.3	15.6
224	NOV00602	12.1	13.4	14.8	9.5	-94.2	54.9	9.59	15.30	20.00	16.8	-60.4	6.5
225	NOV00603	12.7	13.7	14.8	7.6	-97.4	45.8	7.06	8.57	10.01	6.0	-103.9	-0.4
226	NOV00605	13.3	14.6	16.2	9.4	-89.6	64.6	10.83	13.49	16.53	9.4	-71.4	-2.3
227	NOV00606	12.6	13.7	14.9	8.8	-97.5	48.3	8.09	9.98	11.76	8.8	-98.8	-6.1
228	NOV00614	15.0	17.7	20.0	8.3	-57.2	37.1	11.48	13.06	14.97	7.4	-81.1	10.8
229	NOV00616	10.1	11.3	12.5	6.7	-99.5	22.6	10.52	11.68	12.97	7.6	-100.6	3.9
230	NOV00617	15.2	16.4	17.9	7.1	-74.8	76.6	13.21	16.19	20.00	8.4	-60.1	3.1
231	NOV00618	13.3	14.9	16.8	11.0	-81.3	81.9	11.31	13.94	17.05	12.6	-75.8	2.7
232	NOV00621	12.3	13.6	15.1	6.3	-80.2	54.3	10.37	12.13	14.08	10.5	-88.7	-0.6
233	NOV00624	10.3	12.2	14.5	12.8	-95.5	87.9	10.30	11.96	13.67	7.1	-84.5	-2.8
234	NOV00627	16.1	18.1	20.0	13.2	-62.9	90.0	10.65	11.90	13.23	8.6	-98.0	4.0
235	NOV00628	10.1	12.5	15.4	16.9	-90.8	73.3	11.16	12.41	13.75	7.9	-92.0	6.1
236	NOV00629	13.7	14.7	15.8	7.2	-87.8	60.1	7.80	10.54	13.49	14.7	-91.2	0.5
237	NOV00630	10.4	11.8	13.3	8.8	-95.6	63.5	11.21	12.59	14.09	9.5	-93.3	9.1
238	NOV00632	14.2	15.1	16.0	4.9	-82.8	45.9	4.36	7.19	11.31	12.8	-84.5	2.7
239	NOV00637	11.5	12.6	13.8	4.6	-89.3	74.5	12.53	15.29	19.56	15.3	-70.3	13.7
240	NOV00643	9.5	10.2	10.9	2.5	-99.8	12.6	3.32	4.08	4.98	12.3	-100.8	8.7
241	NOV00644	11.6	12.6	13.8	6.7	-91.3	61.2	0.01	0.01	0.01	3.3	-91.9	4.6
242	NOV00650	13.9	14.9	16.0	5.9	-82.2	39.7	11.66	13.29	15.15	7.9	-82.1	4.7
243	NOV00652	11.3	12.2	13.0	5.0	-99.8	41.6	8.60	10.13	11.71	8.6	-103.4	-1.3
244	NOV00653	8.4	10.0	11.8	4.8	-81.3	35.5	8.48	13.25	19.67	17.1	-72.7	6.6
245	NOV00654	11.7	12.6	13.5	5.1	-99.1	36.1	2.96	7.83	14.51	22.4	-92.7	-0.8
246	NOV00657	13.6	14.2	14.9	2.7	-91.0	59.3	2.96	3.75	4.64	12.2	-96.5	0.5
247	NOV00660	12.3	14.0	15.9	6.8	-73.6	58.9	11.99	13.21	14.55	3.9	-82.4	3.5
248	NOV00661	11.7	12.8	13.9	7.0	-93.8	61.4	12.37	15.43	20.00	9.2	-62.8	6.7
249	NOV00662	13.4	15.0	16.9	5.7	-68.6	44.7	11.37	13.30	15.71	6.9	-76.2	0.9
250	NOV00663	9.8	11.1	12.6	5.3	-85.9	47.9	9.52	11.53	13.74	8.8	-80.5	0.4
251	NOV00665	15.2	16.1	17.1	5.7	-78.1	73.1	0.32	8.63	13.80	24.5	-97.9	3.9
252	NOV00666	13.6	14.3	15.1	5.4	-97.3	72.6	10.36	12.99	16.61	7.7	-70.8	2.2
253	NOV00668	12.4	14.7	17.8	17.7	-90.8	112.4	12.17	13.09	14.08	3.5	-96.8	23.1
254	NOV00671	10.6	12.6	14.9	13.9	-95.0	48.7	4.10	7.65	10.08	6.4	-90.0	1.3
255	NOV00674	12.8	13.9	15.2	7.2	-97.0	54.5	9.19	11.42	13.88	9.9	-86.1	0.1
256	NOV00675	4.1	4.6	5.2	9.2	-96.8	37.8	9.97	12.02	14.37	6.8	-79.0	-5.2
257	NOV00676	14.3	15.6	17.2	11.1	-86.8	85.3	8.47	10.27	12.16	9.2	-98.7	3.3
258	NOV00678	10.4	12.5	14.9	12.1	-88.5	69.4	9.28	11.36	13.62	11.1	-92.3	1.7
259	NOV00680	11.3	15.0	20.0	13.4	-64.6	29.3	10.49	12.10	13.85	10.6	-92.0	6.9
260	NOV00683	11.7	13.7	16.2	12.2	-83.9	53.9	12.42	14.35	16.72	10.8	-79.2	16.4
261	NOV00687	13.9	15.6	17.7	17.1	-88.3	135.5	8.52	9.58	10.64	5.7	-99.0	2.8
262	NOV00690	12.9	14.5	16.5	10.5	-81.2	60.6	11.97	14.01	16.76	7.1	-68.7	1.2
263	NOV00691	14.6	17.6	20.0	8.4	-57.4	36.0	12.26	16.90	20.00	8.0	-54.6	-2.1
264	NOV00692	13.7	14.8	16.0	7.3	-86.3	48.7	14.23	16.15	18.75	8.0	-63.8	8.9
265	NOV00696	11.0	11.9	12.7	3.0	-97.4	22.3	4.65	6.22	8.11	9.1	-101.6	-1.6
266	NOV00697	13.1	14.6	16.2	11.2	-88.5	62.6	12.74	14.55	16.76	7.5	-68.8	1.5
267	NOV00698	12.8	13.8	14.9	6.5	-89.9	42.2	11.01	12.60	14.34	9.3	-84.7	3.9
268	NOV00700	13.0	14.0	15.1	8.2	-96.6	49.4	10.06	11.25	12.46	8.8	-103.3	-0.2
269	NOV00703	12.5	13.3	14.2	5.8	-98.2	35.0	1.28	1.66	2.14	6.5	-105.0	3.0
270	NOV00705	11.5	12.4	13.4	4.4	-90.9	61.4	11.18	12.15	13.17	5.9	-100.5	9.4
271	NOV00709	12.4	18.6	20.0	9.4	-51.9	23.0	11.69	16.39	20.00	11.0	-56.5	0.7
272	NOV00710	11.4	12.4	13.4	3.2	-88.1	13.9	12.23	12.97	13.75	4.5	-89.4	7.8
273	NOV00711	14.1	15.4	16.9	5.6	-72.0	33.9	12.69	14.76	17.42	8.7	-68.0	-0.3
274	NOV00715	12.7	13.8	15.1	5.6	-81.5	36.6	1.95	2.94	4.04	17.1	-98.6	1.1
275	NOV00720	13.4	14.5	15.8	3.6	-80.4	44.3	10.91	12.24	13.75	8.6	-94.1	4.8
276	NOV00723	11.2	12.3	13.5	6.7	-94.6	34.3	11.12	12.06	13.07	5.7	-94.4	0.4
277	NOV00724	12.7	14.0	15.5	6.6	-80.0	20.4	0.20	12.97	20.00	35.9	-53.6	4.6
278	NOV00730	15.3	17.7	20.0	6.2	-60.0	37.0	9.29	11.22	13.46	13.0	-100.0	1.5
279	NOV00731	12.0	13.2	14.6	3.9	-94.3	24.6	12.66	15.65	20.00	8.8	-60.6	-0.1
280	NOV00732	13.5	13.9	13.2	33.1	-90.0	55.4	7.11	10.56	14.33	20.6	-95.2	2.3

No:	Compound	Alamar Blue®						Optička gustina					
		U95CL Value	IC50 Value	U95CL Value	SQRT(CHISQ/df)	Maksimalni inhibitorski efekat	Minimalni inhibitorski efekat	U95CL Value	IC50 Value	U95CL Value	SQRT(CHISQ/df)	Maksimalni inhibitorski efekat	Minimalni inhibitorski efekat
281	NOV00741	9.7	10.4	11.2	1.9	-100.5	12.1	9.63	10.49	11.35	5.3	-99.6	2.4
282	NOV00746	13.4	16.0	20.0	13.3	-68.4	27.1	11.00	12.10	13.27	7.6	-96.6	19.3
283	NOV00748	13.1	18.8	20.0	9.1	-52.2	54.6	0.75	2.15	2.84	9.8	-99.7	-9.5
284	NOV00750	14.3	15.5	16.9	7.6	-85.6	69.1	8.95	10.62	12.50	9.4	-95.3	7.1
285	NOV00752	12.1	13.5	15.0	4.6	-88.4	24.2	9.67	11.98	14.97	11.5	-83.5	12.7
286	NOV00753	13.9	17.0	20.0	9.6	-59.9	24.4	15.10	17.89	20.00	7.2	-55.2	4.4
287	NOV00756	12.4	13.8	15.3	11.0	-98.0	39.5	4.12	9.54	18.31	22.0	-79.0	-7.9
288	NOV00759	12.5	13.8	15.3	3.4	-85.9	20.1	10.13	11.45	12.74	7.4	-97.3	-1.6
289	NOV00762	11.2	12.8	14.7	7.4	-87.3	10.8	11.11	12.04	13.02	6.4	-98.6	8.8
290	NOV00765	12.7	13.9	15.3	6.5	-90.7	36.9	11.96	12.76	13.58	4.6	-93.7	12.9
291	NOV00766	12.5	14.3	16.5	16.8	-95.9	63.4	2.08	3.37	5.18	17.7	-81.3	-2.4
292	NOV00768	12.4	13.4	14.6	5.5	-90.0	23.9	2.38	2.95	3.58	9.3	-95.6	-5.8
293	NOV00775	11.4	12.5	13.8	5.9	-92.2	19.0	3.97	5.56	7.94	10.7	-98.0	1.2
294	NOV00778	8.9	10.8	12.9	10.0	-92.6	14.7	6.23	7.69	9.19	5.8	-94.1	2.2
295	NOV00781	11.4	12.7	14.2	7.2	-93.4	14.0	3.45	7.28	8.64	23.6	-50.3	2.8
296	NOV00799	13.9	19.2	20.0	7.4	-51.3	17.3	0.01	0.01	0.01	22.9	-96.7	10.1
297	NOV00803	4.4	5.1	6.2	10.5	-91.8	80.0	9.16	11.16	13.33	9.8	-88.0	5.9
298	NOV00804	8.6	10.5	12.7	9.5	-94.4	38.4	9.42	10.80	12.19	5.9	-95.8	1.5
299	NOV00806	12.2	13.6	15.2	8.7	-91.3	30.2	0.01	0.01	0.01	21.3	-91.3	12.4
300	NOV00807	5.5	9.5	14.8	24.8	-96.0	50.1	3.61	10.17	20.00	25.1	-68.0	9.8
301	NOV00810	9.5	10.9	12.4	5.8	-98.7	19.0	4.95	7.93	11.22	15.9	-103.8	1.8
302	NOV00813	10.0	11.7	13.6	8.9	-93.1	18.6	3.35	4.55	6.82	15.1	-92.4	6.7
303	NOV00814	12.1	13.4	14.8	6.6	-92.3	28.3	3.21	4.00	5.11	12.9	-88.6	11.8
304	NOV00815	12.0	13.6	15.5	13.1	-96.8	44.5	6.54	17.04	20.00	17.4	-54.2	3.0
305	NOV00820	11.0	12.6	14.4	8.4	-90.5	29.6	11.28	12.84	14.58	10.1	-90.7	11.9
306	NOV00824	3.5	3.9	4.4	6.6	-102.8	34.1	3.24	11.20	20.00	26.5	-66.3	0.2
307	NOV00831	12.2	13.7	15.6	11.9	-94.2	37.9	8.56	11.04	13.72	11.6	-86.2	-2.7
308	NOV00832	9.9	12.6	16.4	21.1	-98.9	27.5	1.24	2.57	4.74	24.1	-95.1	-3.2
309	NOV00838	12.6	14.1	15.8	11.6	-93.6	46.4	3.27	4.66	7.47	15.0	-91.2	4.2
310	NOV00841	10.4	12.3	14.4	10.7	-91.8	23.4	10.94	12.69	14.80	12.8	-96.4	15.5
311	NOV00852	12.6	13.9	15.3	9.8	-97.2	43.7	13.35	16.11	20.00	10.2	-62.2	2.7
312	NOV00857	13.1	14.3	15.6	7.9	-96.6	62.4	3.58	5.44	7.71	8.8	-100.1	9.1
313	NOV00860	10.9	12.3	13.9	4.7	-87.6	13.4	0.01	0.01	0.01	4.1	-93.8	11.8
314	NOV00861	4.1	4.7	5.4	6.2	-80.6	44.9	9.42	11.67	14.17	11.7	-85.2	0.7
315	NOV00865	12.9	15.5	19.0	6.1	-63.6	15.7	10.25	11.80	13.46	11.4	-99.6	7.8
316	NOV00867	11.6	16.4	20.0	11.3	-57.8	10.3	0.01	0.0064	0.01	19.3	-57.0	14.9

PRILOG 3.

Jedinjenja sa $IC_{50} < 20 \mu M$ dobijenih u jednom od eseja. Za svako jedinjenje IC_{50} vrednost je predstavljena zajedno sa donjim i gornjim 95% intervalom poverljivosti (LCL95 i UCL95). Takođe, predstavljen je i maksimalni i minimalni efekat koji pokazuje najjaču i najmanju inhibiciju primećenu u opsegu ispitivanih koncentracija (6.3nM do 20 μM). Sive obojene table predstavljaju vrednosti dobijene alamarBlue® esejom, a bele merenjem optičke gustine.

No:	Compound	alamar Blue®						Optička gustina					
		L95CL vrednost	IC50 vrednost	U95CL vrednost	SQRT(CHISO/df)	Maksimalni inhibitorski efekat	Minimalni inhibitorski efekat	L95CL vrednost	IC50 vrednost	U95CL vrednost	SQRT(CHISO/df)	Maksimalni inhibitorski efekat	Minimalni inhibitorski efekat
1	NOV00003	2.5	5.5	17.3	3.5	-61.8	16.0	>20	>20	>20	6.9	-24.6	-2.0
2	NOV00004	>20	>20	>20	3.5	-17.3	26.5	12.59	17.41	20.00	15.0	-56.4	11.4
3	NOV00005	>20	>20	>20	10.7	47.6	82.5	11.64	15.60	20.00	18.5	-67.2	6.8
4	NOV00006	15.0	16.9	19.3	7.0	-66.4	44.7	16.39	>20	>20	10.2	-46.6	3.2
5	NOV00010	0.5	3.0	11.8	7.0	-64.1	37.7	>20	>20	>20	8.8	-37.4	34.8
6	NOV00011	15.5	18.9	20.0	6.0	-53.3	16.4	>20	>20	>20	10.8	-13.2	32.8
7	NOV00014	>20	>20	>20	10.5	9.5	26.8	12.93	17.54	20.00	7.0	-53.4	-7.1
8	NOV00017	>20	>20	>20	9.2	17.0	32.3	10.80	11.57	12.39	5.1	-101.6	6.7
9	NOV00019	>20	>20	>20	7.8	-15.8	31.8	11.61	12.73	13.93	7.1	-87.9	40.5
10	NOV00020	>20	>20	>20	13.0	41.5	74.5	10.69	12.39	14.30	7.6	-77.1	1.4
11	NOV00021	>20	>20	>20	6.8	-18.2	120.8	11.89	13.16	14.51	4.8	-78.2	7.9
12	NOV00022	6.3	7.7	9.4	4.7	-97.8	22.0	>20	>20	>20	5.6	-16.3	2.3
13	NOV00027	>20	>20	>20	9.5	-5.3	78.3	10.73	12.25	13.91	9.6	-98.7	10.1
14	NOV00028	8.5	18.2	20.0	1.8	-51.0	66.8	>20	>20	>20	7.6	-11.1	8.7
15	NOV00029	>20	>20	>20	8.4	-3.1	38.5	10.75	12.90	15.41	16.8	-93.7	15.6
16	NOV00030	>20	>20	>20	9.9	-19.1	23.8	12.08	14.00	16.16	9.6	-77.2	7.1
17	NOV00031	>20	>20	>20	5.9	11.5	67.1	15.60	17.95	20.00	6.1	-56.4	14.3
18	NOV00034	>20	>20	>20	8.5	-11.8	25.6	12.17	14.19	16.69	8.2	-70.3	3.0
19	NOV00037	>20	>20	>20	7.0	-9.6	25.4	11.96	12.86	13.81	6.5	-97.9	20.1
20	NOV00042	12.6	14.0	15.6	8.3	-89.4	51.7	>20	>20	>20	9.2	-15.4	8.7
21	NOV00045	>20	>20	>20	6.3	-11.8	34.7	12.29	13.71	15.33	7.8	-78.3	12.9
22	NOV00046	13.4	14.3	15.3	7.2	-96.4	60.0	>20	>20	>20	9.6	-30.6	11.0
23	NOV00049	>20	>20	>20	3.9	-19.4	22.0	13.87	15.41	17.29	5.9	-65.5	7.2
24	NOV00050	>20	>20	>20	14.5	-19.1	41.8	14.76	17.26	20.00	9.4	-58.8	11.2
25	NOV00051	7.2	10.2	14.3	4.6	-65.8	19.6	1.32	>20	>20	26.4	-42.8	9.5
26	NOV00053	>20	>20	>20	6.9	-14.8	33.5	12.16	15.46	20.00	13.2	-64.1	21.4
27	NOV00055	4.0	5.2	7.5	2.9	-65.4	18.4	>20	>20	>20	8.7	-26.7	25.5
28	NOV00056	>20	>20	>20	6.3	32.7	63.2	13.44	18.87	20	14.3	-52.3	-0.4
29	NOV00057	>20	>20	>20	12.7	-26.2	56.7	15.70	18.66	20.00	7.2	-53.6	40.9
30	NOV00063	>20	>20	>20	4.9	0.0	37.5	16.27	19.62	20.00	5.0	-50.6	5.7
31	NOV00064	>20	>20	>20	5.9	-13.1	41.3	13.77	18.04	20.00	12.8	-54.8	39.5
32	NOV00066	4.4	6.4	20.0	3.6	-53.5	33.8	>20	>20	>20	7.7	-18.7	1.9
33	NOV00070	>20	>20	>20	7.8	-16.9	44.8	13.02	16.90	20.00	7.7	-55.8	-0.3
34	NOV00072	>20	>20	>20	4.4	11.0	39.1	9.15	11.03	13.05	13.0	-99.8	12.0
35	NOV00073	4.4	5.2	6.6	7.8	-67.9	45.8	16.70	>20	>20	16.8	-36.8	3.9
36	NOV00081	>20	>20	>20	5.2	-18.7	23.3	11.45	12.68	14.01	6.2	-89.5	10.6
37	NOV00083	>20	>20	>20	25.1	-16.7	22.2	8.51	19.73	20.00	17.1	-50.3	-2.6
38	NOV00084	14.6	18.4	20.0	12.0	-55.0	42.5	>20	>20	>20	7.4	-32.5	1.6
39	NOV00085	>20	>20	>20	7.0	-18.4	40.5	9.71	11.70	13.87	13.7	-96.6	10.1
40	NOV00093	>20	>20	>20	8.7	-19.7	83.4	11.15	14.28	18.86	6.9	-61.5	-4.1

No:	Compound	alaran Blue®						Optička gustina					
		U95CL vrednost	IC50 vrednost	U95CL vrednost	SQRT(ChiSQ/df)	Maksimalni inhibitorski efekat	Minimalni inhibitorski efekat	U95CL vrednost	IC50 vrednost	U95CL vrednost	SQRT(ChiSQ/df)	Maksimalni inhibitorski efekat	Minimalni inhibitorski efekat
41	NOV00095	14.0	14.9	15.9	3.4	-84.2	44.4	>20	>20	>20	10.8	-24.1	-3.8
42	NOV00098	>20	>20	>20	6.0	-14.5	34.0	9.89	13.05	17.26	12.0	-71.4	0.1
43	NOV00104	>20	>20	>20	9.2	38.7	73.5	11.65	14.99	20.00	8.6	-61.4	-1.2
44	NOV00107	>20	>20	>20	9.8	4.5	79.2	13.30	16.72	20.00	8.5	-56.9	-4.8
45	NOV00109	>20	>20	>20	9.9	21.5	81.4	7.14	9.23	11.40	8.0	-84.3	-7.6
46	NOV00111	13.0	14.3	15.6	6.4	-84.1	63.7	>20	>20	>20	10.4	-21.0	-1.8
47	NOV00113	0.4	>20	>20	14.5	-44.2	45.1	8.06	11.03	14.56	6.5	-66.2	-7.1
48	NOV00116	>20	>20	>20	9.9	-5.9	51.6	11.36	13.95	17.39	12.9	-73.5	-2.4
49	NOV00118	10.8	11.9	13.2	4.8	-92.8	26.6	19.04	>20	>20	11.8	-36.7	2.1
50	NOV00121	>20	>20	>20	7.5	-4.8	48.7	13.80	16.38	20.00	7.0	-58.9	0.0
51	NOV00125	>20	>20	>20	6.6	4.8	47.3	9.83	11.13	12.48	8.6	-99.4	-2.9
52	NOV00126	>20	>20	>20	8.4	-6.2	30.1	0.18	4.39	20.00	30.5	-66.0	-3.3
53	NOV00127	>20	>20	>20	7.0	-11.7	42.5	10.09	12.49	15.31	11.8	-79.1	8.1
54	NOV00128	>20	>20	>20	7.3	-16.6	30.5	9.73	11.09	12.52	8.7	-97.0	7.1
55	NOV00129	>20	>20	>20	10.9	-7.8	51.2	5.69	9.47	14.29	16.7	-82.3	8.4
56	NOV00130	9.8	11.0	12.4	5.7	-82.7	66.4	>20	>20	>20	5.3	-14.9	-2.1
57	NOV00131	16.1	>20	>20	6.9	-49.6	14.7	3.30	3.64	4.01	3.9	-106.6	0.5
58	NOV00132	0.2	0.2	0.2	5.3	-98.0	29.6	>20	>20	>20	11.1	-28.8	11.4
59	NOV00133	13.3	13.9	14.6	3.4	-87.2	32.1	>20	>20	>20	7.3	-25.4	-0.9
60	NOV00134	>20	>20	>20	6.6	-24.1	34.5	0.35	0.38	0.41	4.5	-96.3	8.9
61	NOV00135	>20	>20	>20	7.4	13.0	84.3	4.15	4.87	5.82	4.3	-95.5	-5.3
62	NOV00137	3.9	4.1	4.4	4.9	-99.6	25.9	>20	>20	>20	3.1	-9.9	-0.8
63	NOV00139	3.5	3.7	4.0	6.4	-103.6	53.9	>20	>20	>20	3.1	-24.8	5.9
64	NOV00140	14.5	17.1	20.0	12.5	-61.6	47.7	>20	>20	>20	7.4	-14.4	2.7
65	NOV00141	>20	>20	>20	7.9	-28.1	36.3	10.95	11.98	13.12	6.3	-94.0	2.1
66	NOV00143	4.4	4.5	4.8	5.5	-105.8	77.8	>20	>20	>20	2.9	-17.0	7.3
67	NOV00145	10.7	12.1	13.6	8.2	-87.3	33.0	>20	>20	>20	5.0	-10.5	0.8
68	NOV00146	16.5	19.4	20.0	6.7	-51.4	43.8	>20	>20	>20	8.3	-12.8	5.4
69	NOV00149	>20	>20	>20	9.4	-35.2	49.0	3.23	3.58	4.00	5.6	-93.6	7.1
70	NOV00150	9.6	12.3	16.1	15.3	-85.0	43.4	>20	>20	>20	4.7	-6.2	1.3
71	NOV00152	>20	>20	>20	6.7	-19.3	31.2	10.01	11.74	13.75	10.3	-91.5	3.7
72	NOV00154	>20	>20	>20	10.3	-11.5	28.4	1.26	1.63	2.22	11.1	-105.3	2.5
73	NOV00155	10.8	11.7	12.6	6.1	-97.9	15.6	>20	>20	>20	5.0	-9.8	3.5
74	NOV00156	>20	>20	>20	4.9	-27.4	13.7	4.21	5.17	6.53	5.9	-100.6	6.4
75	NOV00157	12.0	13.1	14.3	7.4	-87.3	52.6	>20	>20	>20	6.3	-35.2	1.4
76	NOV00158	10.1	11.4	12.7	7.6	-92.1	44.3	>20	>20	>20	4.6	-7.4	2.1
77	NOV00159	14.5	19.5	20.0	7.3	-50.6	29.3	>20	>20	>20	4.0	-37.9	9.4
78	NOV00161	6.0	7.1	8.5	5.3	-89.8	68.5	>20	>20	>20	14.8	-15.7	4.4
79	NOV00162	>20	>20	>20	4.9	-10.2	44.6	11.65	12.26	12.90	3.4	-99.2	9.6
80	NOV00164	3.9	4.2	4.5	6.4	-100.7	33.7	>20	>20	>20	4.7	-11.6	1.6
81	NOV00166	>20	>20	>20	3.7	-4.9	31.6	10.67	11.60	12.59	6.0	-100.8	0.0
82	NOV00167	>20	>20	>20	1.9	-14.1	19.0	12.68	13.83	15.16	4.1	-73.9	1.5
83	NOV00168	1.1	1.4	1.7	2.6	-100.0	4.7	3.81	>20	>20	23.9	-41.8	2.0
84	NOV00170	>20	>20	>20	5.5	-3.1	33.2	3.13	3.43	3.76	4.4	-101.0	0.3
85	NOV00171	0.9	1.1	1.2	5.5	-94.1	42.7	>20	>20	>20	5.5	-12.6	7.1
86	NOV00172	13.0	14.6	16.3	4.0	-65.4	23.1	16.67	>20	>20	17.4	-37.7	8.5
87	NOV00174	11.6	12.5	13.4	5.9	-96.6	30.2	>20	>20	>20	10.4	-20.8	2.8
88	NOV00175	>20	>20	>20	3.1	-14.3	39.3	13.31	14.44	15.75	4.6	-74.2	8.7
89	NOV00176	1.3	1.4	1.4	2.5	-106.6	56.1	12.65	>20	>20	19.2	-46.9	2.9
90	NOV00177	9.8	10.5	11.4	3.9	-98.5	18.6	>20	>20	>20	5.1	-12.6	0.7
91	NOV00178	3.5	3.7	3.9	3.2	-105.9	11.9	>20	>20	>20	4.1	-8.3	1.0
92	NOV00179	3.6	3.9	4.1	5.0	-100.5	53.4	7.78	>20	>20	20.2	-27.0	1.9
93	NOV00180	10.9	11.9	12.9	5.2	-90.6	43.3	>20	>20	>20	5.5	-11.6	1.2
94	NOV00181	16.4	18.8	20.0	5.9	-53.2	10.6	>20	>20	>20	3.5	-8.1	8.5
95	NOV00182	>20	>20	>20	8.1	-20.1	19.1	10.72	11.35	12.00	3.6	-103.4	2.4
96	NOV00183	>20	>20	>20	3.8	-18.1	13.6	10.99	11.73	12.50	4.1	-97.7	2.0
97	NOV00184	>20	>20	>20	4.1	7.3	78.5	11.14	11.82	12.53	3.9	-100.0	5.0
98	NOV00185	2.4	2.9	3.4	8.8	-102.6	17.6	8.63	>20	>20	16.0	-35.7	1.1
99	NOV00187	>20	>20	>20	4.0	-3.6	48.9	11.61	12.19	12.79	3.3	-101.6	11.9
100	NOV00188	>20	>20	>20	3.1	-13.2	31.8	12.43	13.86	15.57	6.4	-76.4	4.2

No.	Compound	alamar Blue®						Optička gustina					
		L95CL vrednost	IC50 vrednost	U95CL vrednost	SQRT(CHISQ/df)	Maksimalni inhibitorski efekat	Minimalni inhibitorski efekat	L95CL vrednost	IC50 vrednost	U95CL vrednost	SQRT(CHISQ/df)	Maksimalni inhibitorski efekat	Minimalni inhibitorski efekat
101	NOV00190	>20	>20	>20	8.6	-17.1	18.6	10.16	12.54	15.66	15.2	-91.2	16.5
102	NOV00191	2.1	12.6	20.0	11.0	-55.3	59.3	>20	>20	>20	10.1	-30.0	11.1
103	NOV00192	12.0	13.7	15.7	9.9	-81.9	24.8	16.17	>20	>20	12.5	-41.6	19.2
104	NOV00194	>20	>20	>20	5.4	-18.8	5.8	12.92	16.00	20.00	13.5	-66.5	23.7
105	NOV00201	>20	>20	>20	7.9	-20.0	5.8	10.67	13.08	16.07	9.7	-72.7	33.0
106	NOV00203	9.9	11.4	13.0	6.2	-90.3	51.8	>20	>20	>20	19.2	-9.6	15.4
107	NOV00207	14.2	15.6	17.3	8.4	-75.1	43.2	>20	>20	>20	12.0	-7.6	16.1
108	NOV00208	>20	>20	>20	9.9	-9.4	60.3	11.46	14.39	18.60	13.0	-69.8	14.5
109	NOV00209	>20	>20	>20	9.8	-19.3	38.2	12.46	13.71	15.12	9.9	-91.3	26.7
110	NOV00212	>20	>20	>20	9.4	7.7	56.7	10.16	12.42	15.38	13.9	-89.0	15.6
111	NOV00216	>20	>20	>20	12.4	42.4	109.0	9.60	11.15	12.90	10.5	-101.9	8.8
112	NOV00217	10.2	11.5	12.9	7.2	-90.2	35.1	>20	>20	>20	11.3	-19.6	17.9
113	NOV00220	13.2	14.1	15.1	7.8	-96.0	48.8	15.54	>20	>20	14.6	-45.2	19.3
114	NOV00225	11.6	17.2	20.0	9.4	-54.1	111.8	>20	>20	>20	6.4	-11.1	13.4
115	NOV00227	12.7	13.7	14.8	6.8	-87.8	29.6	>20	>20	>20	11.8	-11.0	14.8
116	NOV00230	9.0	10.7	12.4	7.8	-92.9	44.6	16.81	>20	>20	17.5	-36.1	17.3
117	NOV00231	>20	>20	>20	13.5	10.6	78.3	12.10	19.68	20.00	16.8	-50.6	10.2
118	NOV00232	>20	>20	>20	10.1	0.3	62.2	12.23	17.47	20.00	13.4	-56.0	12.1
119	NOV00236	>20	>20	>20	9.2	-37.4	29.3	11.89	14.70	19.08	9.6	-68.9	18.0
120	NOV00237	>20	>20	>20	11.6	22.1	102.2	11.88	12.94	14.08	8.6	-98.3	22.1
121	NOV00240	>20	>20	>20	9.5	-5.6	63.3	10.68	12.51	14.41	12.3	-95.6	13.5
122	NOV00244	11.1	13.3	15.9	6.5	-71.7	51.0	15.81	>20	>20	16.9	-39.6	15.0
123	NOV00250	12.0	13.3	14.7	6.8	-91.5	47.4	>20	>20	>20	10.8	-32.0	10.4
124	NOV00251	10.3	11.6	12.9	7.2	-98.7	35.7	>20	>20	>20	10.6	-11.5	14.3
125	NOV00252	0.3	0.4	0.4	6.2	-99.0	28.1	14.50	>20	>20	16.6	-47.5	16.0
126	NOV00253	10.3	11.7	13.2	6.7	-91.4	27.2	>20	>20	>20	14.7	-15.0	14.7
127	NOV00263	>20	>20	>20	5.7	30.2	63.4	9.56	14.13	20.00	19.2	-68.6	-2.9
128	NOV00265	>20	>20	>20	8.2	26.8	53.8	12.40	16.73	20.00	8.0	-55.6	3.3
129	NOV00266	14.0	15.1	16.4	9.5	-88.3	64.0	18.00	>20	>20	12.3	-37.0	12.8
130	NOV00268	14.3	15.3	16.4	8.1	-85.3	65.3	>20	>20	>20	10.8	-16.1	12.4
131	NOV00270	>20	>20	>20	30.1	4.2	48.4	10.27	11.11	11.99	4.2	-96.9	-2.3
132	NOV00272	>20	>20	>20	8.3	5.7	19.2	10.95	15.53	20.00	18.8	-63.9	2.0
133	NOV00275	13.3	14.2	15.3	7.1	-95.7	55.3	>20	>20	>20	3.2	-10.8	0.0
134	NOV00276	>20	>20	>20	7.1	17.2	90.8	13.28	14.43	15.75	2.9	-70.4	5.4
135	NOV00277	>20	>20	>20	6.9	-14.1	10.8	9.56	11.02	12.66	7.8	-92.9	5.9
136	NOV00279	>20	>20	>20	6.4	34.2	87.1	9.86	14.38	20.00	19.6	-68.4	-0.8
137	NOV00282	>20	>20	>20	8.8	-24.6	29.1	9.73	10.94	12.22	5.6	-90.5	3.4
138	NOV00283	>20	>20	>20	4.0	37.6	107.7	13.77	17.55	20.00	7.4	-54.5	3.7
139	NOV00284	>20	>20	>20	4.9	35.4	56.4	9.87	11.11	12.41	5.9	-90.4	-2.0
140	NOV00285	>20	>20	>20	5.1	-23.9	23.0	11.99	14.08	16.69	9.4	-72.5	16.8
141	NOV00292	15.0	16.6	18.5	4.1	-63.8	48.5	16.41	>20	>20	8.3	-46.5	11.6
142	NOV00293	>20	>20	>20	3.8	-29.3	40.5	12.08	18.23	20.00	18.6	-54.1	8.6
143	NOV00305	18.8	>20	>20	7.7	-41.4	18.7	10.65	11.13	11.62	3.0	-104.2	4.3
144	NOV00307	>20	>20	>20	3.8	15.4	50.5	11.21	11.69	12.19	2.9	-103.4	8.5
145	NOV00309	>20	>20	>20	4.9	19.4	38.5	12.88	15.06	17.96	8.5	-65.7	2.1
146	NOV00310	>20	>20	>20	6.4	-6.2	4.7	10.08	11.23	12.50	4.0	-78.4	1.2
147	NOV00312	>20	>20	>20	7.4	-23.8	38.3	16.69	19.05	20.00	4.8	-52.0	9.6
148	NOV00313	>20	>20	>20	5.6	-27.9	22.7	12.35	15.98	20.00	15.7	-63.4	21.1
149	NOV00316	>20	>20	>20	5.1	-4.1	36.7	15.41	17.00	19.06	4.9	-58.8	9.2
150	NOV00317	>20	>20	>20	7.3	-11.4	57.3	10.24	15.76	20.00	6.1	-54.0	11.8
151	NOV00319	>20	>20	>20	3.5	-15.6	15.5	12.61	14.02	15.72	4.0	-67.0	2.7
152	NOV00321	15.3	17.1	19.5	3.8	-59.6	15.6	18.93	>20	>20	13.2	-35.8	3.7
153	NOV00323	>20	>20	>20	5.9	3.2	39.7	3.80	5.39	8.18	15.1	-102.8	3.2
154	NOV00324	2.4	2.8	3.3	6.6	-100.1	17.1	>20	>20	>20	2.3	-6.1	5.6
155	NOV00325	>20	>20	>20	7.5	-28.7	22.6	4.65	5.22	5.96	4.6	-87.9	5.1
156	NOV00328	>20	>20	>20	5.7	-17.0	25.4	9.07	11.13	13.56	10.6	-87.8	17.9
157	NOV00329	14.6	15.9	17.5	4.8	-69.5	25.3	17.78	>20	>20	17.2	-33.8	15.2
158	NOV00330	>20	>20	>20	7.9	-32.6	7.7	0.29	0.42	0.62	7.3	-92.7	18.1
159	NOV00331	>20	>20	>20	5.0	-4.7	27.4	3.96	4.26	4.61	3.6	-104.2	5.2
160	NOV00332	11.9	14.7	18.5	6.9	-63.5	33.7	>20	>20	>20	9.2	-37.6	11.9

No:	Compound	alamar Blue®						Optička gustina					
		I95CL vrednost	IC50 vrednost	U95CL vrednost	SQRT(CHISQ/df)	Maksimalni inhibitorski efekat	Minimalni inhibitorski efekat	I95CL vrednost	IC50 vrednost	U95CL vrednost	SQRT(CHISQ/df)	Maksimalni inhibitorski efekat	Minimalni inhibitorski efekat
161	NOV00333	>20	>20	>20	6.9	-28.9	26.0	3.41	3.57	3.75	3.0	-106.7	9.8
162	NOV00335	>20	>20	>20	3.6	-29.5	4.7	12.08	12.53	12.99	1.9	-97.2	16.8
163	NOV00336	14.6	17.5	20.0	11.2	-58.9	27.8	>20	>20	>20	5.8	-35.8	4.3
164	NOV00337	11.3	12.4	13.6	6.4	-96.1	20.9	>20	>20	>20	6.0	-11.8	8.2
165	NOV00338	>20	>20	>20	6.2	-1.2	32.3	11.49	12.21	12.98	3.0	-86.4	2.6
166	NOV00339	13.4	15.7	18.8	7.3	-64.2	3.0	>20	>20	>20	4.6	-4.9	6.5
167	NOV00342	>20	>20	>20	6.5	23.9	68.1	10.31	11.16	12.03	4.7	-101.4	8.6
168	NOV00344	>20	>20	>20	3.9	9.1	27.0	12.63	16.68	20.00	13.7	-59.2	5.2
169	NOV00349	>20	>20	>20	4.7	6.6	26.0	10.51	11.63	12.77	5.7	-98.1	3.7
170	NOV00354	12.5	13.4	14.3	4.6	-98.4	37.1	>20	>20	>20	7.4	-29.0	2.7
171	NOV00356	8.7	>20	>20	6.2	-49.2	54.8	3.85	4.82	6.73	11.3	-72.9	13.9
172	NOV00359	13.2	14.1	15.1	5.0	-97.0	54.7	12.26	>20	>20	20.8	-39.4	9.0
173	NOV00360	0.4	0.4	0.6	9.1	-72.8	38.1	16.89	>20	>20	6.3	-44.8	13.2
174	NOV00361	>20	>20	>20	4.0	-36.9	32.3	12.93	15.24	18.36	9.3	-67.2	18.7
175	NOV00363	17.5	19.3	20.0	4.3	-53.0	46.9	14.53	>20	>20	6.3	-47.6	2.1
176	NOV00365	>20	>20	>20	5.1	-25.9	27.2	14.51	16.34	18.68	5.9	-63.2	14.5
177	NOV00366	12.9	13.8	14.9	4.6	-90.1	30.6	>20	>20	>20	7.6	-20.4	0.9
178	NOV00367	>20	>20	>20	4.4	-29.7	3.6	7.93	15.95	20.00	7.1	-53.0	-2.5
179	NOV00372	>20	>20	>20	2.8	-23.0	18.2	14.98	17.75	20.00	6.9	-56.2	11.6
180	NOV00373	12.9	13.6	14.3	4.3	-97.8	39.2	>20	>20	>20	10.3	-20.3	6.6
181	NOV00374	10.2	11.3	12.5	5.2	-90.4	32.7	18.61	>20	>20	16.7	-32.0	20.3
182	NOV00382	11.4	12.3	13.2	2.6	-86.1	2.8	19.26	>20	>20	6.9	-40.4	0.0
183	NOV00383	>20	>20	>20	6.0	-26.4	23.7	12.39	13.90	15.64	6.0	-71.5	11.9
184	NOV00384	>20	>20	>20	2.6	26.0	59.3	9.01	10.97	13.04	12.8	-97.3	1.2
185	NOV00386	19.5	>20	>20	5.0	-44.1	54.6	9.75	11.15	12.64	5.2	-79.1	3.7
186	NOV00387	12.5	13.0	13.6	1.6	-97.8	26.5	>20	>20	>20	6.6	-8.2	1.2
187	NOV00389	>20	>20	>20	7.1	-26.4	21.4	12.19	13.28	14.46	4.9	-78.3	27.6
188	NOV00390	>20	>20	>20	3.1	-26.0	20.8	14.04	15.69	17.76	5.7	-63.9	20.2
189	NOV00392	4.3	4.7	5.2	3.5	-76.0	35.0	>20	>20	>20	7.7	-14.6	18.2
190	NOV00396	15.5	16.5	17.7	3.0	-64.4	26.3	18.09	>20	>20	13.5	-36.5	2.8
191	NOV00401	18.1	>20	>20	5.1	-49.4	43.2	7.95	9.93	12.17	6.0	-74.6	6.5
192	NOV00403	>20	>20	>20	7.4	-11.8	23.1	10.46	14.99	20.00	13.1	-62.6	4.7
193	NOV00404	>20	>20	>20	11.5	-3.8	40.7	11.33	12.36	13.46	7.9	-99.0	11.3
194	NOV00405	>20	>20	>20	5.0	-41.4	34.4	10.84	12.82	15.12	9.5	-77.9	1.1
195	NOV00407	9.7	10.9	12.1	4.9	-87.3	25.4	>20	>20	>20	11.2	-27.7	1.7
196	NOV00409	11.8	12.4	13.0	3.3	-98.4	16.0	>20	>20	>20	9.7	-18.0	4.5
197	NOV00411	>20	>20	>20	5.5	-22.1	34.5	14.90	16.65	18.93	5.9	-60.9	9.9
198	NOV00415	10.4	11.7	13.1	6.8	-93.8	56.9	>20	>20	>20	6.8	-14.1	5.8
199	NOV00424	>20	>20	>20	3.5	-11.0	45.8	12.07	13.23	14.49	4.6	-77.2	0.2
200	NOV00429	14.6	19.3	20.0	7.3	-51.2	58.4	16.80	>20	20	11.0	-44.0	4.0
201	NOV00438	>20	>20	>20	3.5	-26.9	26.0	11.35	12.73	14.33	7.1	-85.6	5.4
202	NOV00439	>20	>20	>20	9.1	-20.6	60.1	10.02	10.77	11.55	4.0	-103.7	-2.4
203	NOV00441	>20	>20	>20	9.7	-21.0	56.0	10.60	12.04	13.68	9.0	-95.2	26.8
204	NOV00443	>20	>20	>20	8.2	-20.3	40.6	14.49	18.39	20.00	7.2	-53.2	0.7
205	NOV00446	0.7	>20	>20	16.2	-25.3	33.7	11.03	12.55	14.22	11.6	-96.5	28.8
206	NOV00452	>20	>20	>20	6.6	-6.5	4.3	5.78	9.05	12.99	20.3	-103.5	12.6
207	NOV00457	12.8	13.7	14.6	6.2	-96.9	44.8	>20	>20	>20	9.5	-27.1	2.9
208	NOV00458	11.0	12.0	13.1	4.5	-92.1	3.3	>20	>20	>20	11.7	-16.5	3.1
209	NOV00460	>20	>20	>20	5.7	-28.1	35.6	11.36	12.39	13.47	5.9	-88.8	2.4
210	NOV00461	>20	>20	>20	3.3	-20.6	29.8	11.82	14.73	18.49	10.9	-67.4	14.8
211	NOV00462	>20	>20	>20	7.8	-22.8	21.4	10.86	11.57	12.31	4.0	-97.9	1.8
212	NOV00463	>20	>20	>20	6.0	-8.2	40.7	10.65	11.51	12.40	5.0	-96.7	3.8
213	NOV00464	>20	>20	>20	4.5	3.3	34.3	8.52	9.70	10.94	6.9	-103.8	2.0
214	NOV00465	>20	>20	>20	8.5	-16.0	19.3	9.82	10.88	12.02	6.8	-103.4	1.0
215	NOV00466	>20	>20	>20	5.4	-18.4	29.4	12.96	14.77	17.00	7.5	-68.6	3.4
216	NOV00467	>20	>20	>20	4.3	-20.7	18.7	11.96	12.64	13.35	3.6	-91.6	10.9
217	NOV00468	>20	>20	>20	15.3	-28.8	37.6	10.54	11.16	11.79	2.9	-103.7	6.4
218	NOV00469	16.4	17.6	19.0	5.3	-64.7	71.3	>20	>20	>20	7.1	-31.2	1.8
219	NOV00471	>20	>20	>20	8.9	-0.8	22.2	11.98	12.79	13.67	2.2	-79.1	0.2
220	NOV00476	>20	>20	>20	6.2	-26.2	27.9	8.38	9.99	11.74	8.5	-95.6	-1.1

No:	Compound	alamar Blue®						Optička gustina					
		U95CL vrednost	IC50 vrednost	U95CL vrednost	SQRT(CHISQ/df)	Maksimalni inhibitorski efekat	Minimalni inhibitorski efekat	U95CL vrednost	IC50 vrednost	U95CL vrednost	SQRT(CHISQ/df)	Maksimalni inhibitorski efekat	Minimalni inhibitorski efekat
221	NOV00481	15.7	18.1	20.0	4.9	-55.5	10.2	9.67	>20	>20	25.2	-48.5	5.3
222	NOV00482	2.5	3.3	4.5	6.5	-86.9	73.5	9.91	>20	>20	10.3	-41.4	-3.8
223	NOV00483	>20	>20	>20	7.5	8.4	91.9	15.31	17.15	19.62	5.0	-58.2	4.3
224	NOV00485	11.2	12.3	13.4	4.7	-89.9	43.5	>20	>20	>20	8.6	-29.6	10.7
225	NOV00489	11.8	13.5	15.5	3.7	-71.1	42.8	18.45	>20	>20	4.8	-46.9	7.9
226	NOV00490	13.3	14.8	16.5	6.1	-73.7	37.6	>20	>20	>20	6.5	-9.1	7.1
227	NOV00491	17.5	>20	>20	5.3	-45.9	14.5	10.41	12.87	15.88	10.8	-74.8	3.7
228	NOV00492	11.2	12.3	13.3	6.0	-98.3	12.8	>20	>20	>20	8.2	-37.3	2.9
229	NOV00495	>20	>20	>20	4.0	-7.0	27.7	12.06	12.98	13.95	6.6	-94.2	19.2
230	NOV00496	10.8	11.8	12.8	5.4	-100.1	32.0	14.95	>20	>20	22.5	-36.0	5.4
231	NOV00499	>20	>20	>20	7.5	-31.9	43.4	11.23	12.13	13.08	6.0	-96.9	6.4
232	NOV00500	18.6	>20	>20	4.5	-45.4	22.8	10.86	12.48	14.28	9.1	-84.4	3.4
233	NOV00508	>20	>20	>20	7.5	-3.1	27.5	11.04	12.96	15.17	11.2	-83.0	14.9
234	NOV00509	>20	>20	>20	4.4	-27.5	21.3	10.34	11.73	13.30	8.0	-92.6	1.5
235	NOV00510	>20	>20	>20	6.7	-31.4	49.9	11.63	12.63	13.69	6.5	-92.3	9.8
236	NOV00519	12.8	15.2	18.5	10.3	-67.1	29.0	>20	>20	>20	8.2	-16.3	2.6
237	NOV00523	>20	>20	>20	4.4	-30.8	37.6	5.93	7.89	10.42	5.2	-73.9	3.0
238	NOV00524	>20	>20	>20	8.3	-2.9	49.7	4.17	7.02	12.55	9.1	-51.1	5.0
239	NOV00527	>20	>20	>20	8.8	-6.0	43.7	7.87	9.72	11.52	9.3	-95.9	9.3
240	NOV00530	>20	>20	>20	3.8	2.1	49.7	12.88	15.17	18.25	6.4	-64.0	-0.7
241	NOV00531	>20	>20	>20	3.0	-9.0	46.4	11.86	12.69	13.58	5.4	-93.0	8.5
242	NOV00532	>20	>20	>20	2.2	-6.0	34.8	11.43	12.18	12.98	5.0	-101.6	13.1
243	NOV00534	>20	>20	>20	4.0	-0.3	84.9	4.44	7.23	9.64	9.0	-91.5	-1.6
244	NOV00536	11.0	11.9	12.8	4.4	-91.9	36.0	15.50	>20	>20	18.2	-35.7	-1.8
245	NOV00539	>20	>20	>20	2.9	-26.0	46.9	15.03	18.77	20	9.1	-53.1	5.5
246	NOV00540	>20	>20	>20	7.5	-5.5	28.3	4.65	8.78	14.61	17.5	-80.3	2.9
247	NOV00542	13.5	15.1	16.8	3.9	-69.2	41.6	>20	>20	>20	5.8	-15.4	1.6
248	NOV00543	12.7	14.2	15.8	9.8	-84.6	53.2	>20	>20	>20	4.6	-17.2	4.0
249	NOV00544	4.4	5.0	5.9	4.3	-80.6	30.1	>20	>20	>20	10.3	-15.3	5.4
250	NOV00545	13.0	14.0	15.2	5.5	-83.0	52.7	>20	>20	>20	5.7	-27.1	3.4
251	NOV00546	13.2	14.5	15.9	6.0	-76.4	85.1	>20	>20	>20	3.9	-10.4	7.5
252	NOV00547	12.9	14.1	15.5	4.9	-77.7	58.2	>20	>20	>20	3.6	-7.5	5.5
253	NOV00549	13.5	15.2	17.1	5.6	-70.4	76.3	>20	>20	>20	6.6	-11.2	7.8
254	NOV00551	>20	>20	>20	10.2	16.7	39.8	10.28	16.22	20.00	17.9	-58.5	-3.9
255	NOV00552	>20	>20	>20	16.0	-10.5	68.8	14.29	18.32	20	7.5	-53.3	3.1
256	NOV00553	11.9	13.0	14.1	4.7	-88.3	74.4	>20	>20	>20	6.9	-3.9	7.5
257	NOV00554	12.4	13.3	14.3	3.9	-89.3	82.5	>20	>20	>20	5.1	-9.6	5.6
258	NOV00555	11.5	12.5	13.6	5.0	-97.8	34.5	>20	>20	>20	8.4	-15.9	6.2
259	NOV00558	12.1	12.9	13.8	5.4	-96.6	61.2	>20	>20	>20	11.8	-6.0	7.9
260	NOV00560	>20	>20	>20	3.6	-28.9	20.5	8.45	10.84	13.67	16.1	-101.4	1.0
261	NOV00563	11.4	12.1	12.9	3.8	-98.7	20.7	0.01	>20	>20	41.7	-32.2	-13.1
262	NOV00564	>20	>20	>20	5.3	-20.3	48.3	11.56	12.42	13.32	4.0	-91.1	3.0
263	NOV00566	12.5	14.5	16.7	3.8	-66.9	41.4	>20	>20	>20	4.6	-4.2	11.7
264	NOV00567	14.0	15.8	17.9	4.7	-65.6	45.6	>20	>20	>20	2.0	-19.2	6.2
265	NOV00568	13.9	15.7	17.9	5.3	-65.7	24.4	>20	>20	>20	8.1	-15.7	5.6
266	NOV00569	12.2	14.1	16.4	3.6	-68.6	46.9	17.18	>20	>20	8.6	-45.7	16.4
267	NOV00570	11.4	12.5	13.6	4.4	-95.0	31.0	>20	>20	>20	9.8	-11.9	15.3
268	NOV00572	10.3	12.8	16.0	6.2	-69.1	27.8	>20	>20	>20	7.7	-29.6	14.9
269	NOV00573	11.7	12.7	13.8	4.9	-96.5	50.7	>20	>20	>20	11.9	-14.1	7.0
270	NOV00577	13.1	13.7	14.4	3.6	-87.7	54.4	>20	>20	>20	17.4	-15.9	23.5
271	NOV00580	12.7	13.9	15.2	6.1	-85.9	40.9	>20	>20	>20	5.1	-25.4	7.1
272	NOV00581	12.8	14.5	16.6	7.7	-73.1	36.4	>20	>20	>20	5.3	-35.4	7.3
273	NOV00582	14.3	16.2	18.6	6.0	-62.9	70.0	>20	>20	>20	4.8	-11.8	8.1
274	NOV00583	>20	>20	>20	5.0	-10.1	26.5	15.03	16.16	17.50	3.2	-64.1	13.8
275	NOV00584	>20	>20	>20	3.0	-5.9	39.5	11.81	12.43	13.09	3.5	-98.3	12.5
276	NOV00585	>20	>20	>20	7.9	-24.5	25.4	9.54	11.36	13.48	13.5	-103.5	4.8
277	NOV00586	>20	>20	>20	3.9	-22.4	22.6	12.64	16.51	20.00	17.0	-62.8	14.5
278	NOV00587	>20	>20	>20	9.6	29.1	53.5	9.86	15.02	20.00	9.0	-58.6	-0.4
279	NOV00596	>20	>20	>20	3.8	-0.7	47.7	10.68	11.98	13.43	10.1	-104.1	9.6
280	NOV00599	>20	>20	>20	15.6	29.6	127.8	13.62	17.37	20.00	9.7	-56.2	1.7

No:	Compound	alamar Blue®						Optička gustina					
		U95CL vrednost	IC50 vrednost	U95CL vrednost	SQRT(CHISQ/df)	Maksimalni inhibitorski efekat	Minimalni inhibitorski efekat	U95CL vrednost	IC50 vrednost	U95CL vrednost	SQRT(CHISQ/df)	Maksimalni inhibitorski efekat	Minimalni inhibitorski efekat
281	NOV00600	9.8	>20	>20	17.1	-33.1	71.1	11.16	12.61	14.21	8.6	-87.8	2.4
282	NOV00604	13.1	15.6	19.2	14.3	-71.0	73.6	>20	>20	>20	11.6	-16.3	0.5
283	NOV00607	>20	>20	>20	9.3	-25.3	22.7	10.91	11.84	12.80	6.5	-103.7	7.9
284	NOV00608	>20	>20	>20	10.6	15.7	82.2	11.93	13.16	14.47	7.7	-91.0	16.6
285	NOV00610	>20	>20	>20	10.4	-17.2	62.1	12.05	16.56	20.00	11.9	-57.2	-3.0
286	NOV00611	0.4	0.5	0.6	2.3	-61.3	13.5	>20	>20	>20	10.3	-5.7	12.0
287	NOV00612	5.0	7.3	20.0	2.8	-52.4	44.6	>20	>20	>20	13.3	-6.3	9.3
288	NOV00613	2.5	5.3	11.1	4.2	-60.0	53.6	>20	>20	>20	13.0	-1.4	14.6
289	NOV00615	>20	>20	>20	17.8	-14.0	31.0	12.60	17.75	20.00	14.0	-54.8	-3.4
290	NOV00619	>20	>20	>20	7.7	-10.6	45.3	10.95	12.96	15.30	9.8	-84.0	2.5
291	NOV00620	5.4	7.8	20.0	9.5	-59.6	84.8	>20	>20	>20	8.2	-11.6	1.8
292	NOV00623	>20	>20	>20	11.1	0.1	57.4	8.99	12.42	16.83	13.2	-73.3	-3.6
293	NOV00625	8.3	9.7	11.3	6.5	-97.9	33.0	>20	>20	>20	7.4	-13.1	1.6
294	NOV00626	11.5	13.9	17.0	10.3	-71.7	31.6	17.40	>20	>20	11.2	-41.5	1.3
295	NOV00631	>20	>20	>20	7.4	-19.6	49.0	11.45	12.53	13.69	5.7	-95.5	12.6
296	NOV00633	12.2	13.4	14.8	6.2	-80.7	30.4	>20	>20	>20	9.4	-22.0	3.0
297	NOV00634	12.2	12.9	13.7	3.2	-87.9	28.8	>20	>20	>20	7.4	-11.8	3.5
298	NOV00635	>20	>20	>20	4.3	0.3	60.5	11.96	14.92	20.00	10.5	-67.2	0.5
299	NOV00636	10.7	11.8	13.0	3.7	-90.5	52.7	>20	>20	>20	7.4	-39.4	12.8
300	NOV00638	11.1	12.0	13.0	4.3	-99.3	42.3	>20	>20	>20	11.9	-16.2	9.6
301	NOV00639	10.9	11.8	12.7	2.6	-96.6	34.6	>20	>20	>20	8.5	-22.1	8.0
302	NOV00640	>20	>20	>20	5.4	-9.7	36.4	11.49	12.37	13.32	5.9	-98.0	14.4
303	NOV00641	>20	>20	>20	7.0	13.1	74.9	12.72	14.16	15.83	7.7	-76.1	5.9
304	NOV00642	>20	>20	>20	3.5	-21.8	23.5	10.53	11.97	13.63	10.6	-100.6	9.9
305	NOV00645	>20	>20	>20	10.3	-8.8	27.9	10.15	11.56	13.13	9.1	-103.4	3.6
306	NOV00646	14.9	17.0	19.8	6.7	-60.2	78.3	>20	>20	>20	5.2	-12.8	7.8
307	NOV00647	>20	>20	>20	4.4	-28.2	34.4	13.32	16.29	20.00	7.6	-59.7	-3.1
308	NOV00648	>20	>20	>20	8.5	-8.6	74.1	13.11	15.07	17.52	5.9	-67.3	3.0
309	NOV00649	>20	>20	>20	3.3	9.5	63.7	11.03	12.12	13.32	6.6	-94.9	6.0
310	NOV00651	14.3	14.9	15.6	5.4	-96.7	80.0	>20	>20	>20	8.3	-36.5	-4.6
311	NOV00655	5.9	8.6	14.4	2.7	-61.7	24.2	>20	>20	>20	4.8	-2.8	9.9
312	NOV00658	7.1	9.8	14.1	4.6	-63.2	18.1	>20	>20	>20	7.1	-9.4	5.1
313	NOV00659	>20	>20	>20	10.1	12.1	78.3	12.82	15.20	18.42	7.9	-65.9	1.0
314	NOV00667	>20	>20	>20	7.1	-17.6	26.7	12.92	15.03	17.69	5.5	-66.9	4.9
315	NOV00669	13.7	19.0	20.0	14.8	-52.4	51.2	16.62	>20	>20	6.1	-47.7	6.8
316	NOV00670	17.5	>20	>20	9.4	-42.2	52.6	10.44	12.92	15.98	5.5	-69.3	-1.1
317	NOV00672	8.5	18.9	20.0	21.5	-51.7	21.9	>20	>20	>20	7.1	-21.1	4.6
318	NOV00673	>20	>20	>20	12.8	-12.3	54.2	14.02	16.57	20.00	5.7	-60.1	3.9
319	NOV00677	15.0	17.2	20.0	11.7	-64.9	64.3	15.69	>20	>20	12.3	-41.5	14.2
320	NOV00679	>20	>20	>20	12.4	-0.9	61.9	12.77	19.14	20.00	19.3	-52.1	7.7
321	NOV00681	12.4	13.9	15.4	11.6	-97.5	42.2	19.96	>20	>20	10.3	-35.3	3.2
322	NOV00682	>20	>20	>20	10.5	-15.4	30.3	10.29	11.94	13.76	8.0	-90.0	7.2
323	NOV00686	16.6	>20	>20	7.1	-44.1	17.4	9.73	13.44	19.02	11.4	-67.6	5.9
324	NOV00689	1.0	1.9	3.0	5.1	-66.2	26.2	16.38	>20	>20	6.0	-49.1	2.6
325	NOV00693	>20	>20	>20	5.8	-17.2	38.2	14.60	18.07	20.00	10.1	-54.8	2.6
326	NOV00695	>20	>20	>20	7.4	-4.1	46.7	10.12	16.88	20.00	16.3	-55.5	-5.6
327	NOV00699	>20	>20	>20	8.4	-12.0	29.8	9.35	11.28	13.35	10.6	-88.1	5.6
328	NOV00702	15.6	17.2	19.2	4.2	-60.7	26.0	16.41	>20	>20	11.4	-41.5	2.4
329	NOV00706	>20	>20	>20	5.5	1.0	48.5	10.90	11.96	13.12	7.5	-102.2	8.1
330	NOV00707	>20	>20	>20	8.5	-1.1	65.6	8.71	12.15	16.70	8.2	-65.8	-2.6
331	NOV00708	>20	>20	>20	6.8	-12.5	39.0	11.46	12.26	13.13	5.8	-101.6	13.2
332	NOV00712	>20	>20	>20	11.9	10.4	62.1	12.17	13.01	13.90	5.4	-89.3	11.6
333	NOV00713	18.6	>20	>20	7.2	-42.5	51.0	13.91	19.00	20.00	16.0	-52.5	6.7
334	NOV00714	>20	>20	>20	5.5	-9.3	38.0	11.75	12.37	13.01	4.4	-100.0	12.4
335	NOV00716	>20	>20	>20	12.9	35.8	81.7	2.28	3.38	5.29	10.7	-91.4	-2.4
336	NOV00717	14.5	16.5	19.3	10.6	-69.2	45.1	5.47	>20	>20	15.7	-42.6	-2.1
337	NOV00718	19.5	>20	>20	25.2	-18.8	19.5	3.68	6.20	12.23	20.2	-84.8	3.6
338	NOV00719	>20	>20	>20	10.3	-1.6	10.6	3.76	6.35	13.84	14.5	-72.2	-2.0
339	NOV00721	13.9	14.9	16.0	9.0	-94.0	83.0	>20	>20	>20	7.1	-17.5	1.9
340	NOV00725	>20	>20	>20	11.0	-3.1	48.7	15.87	19.66	20.00	8.7	-50.8	4.2

No:	Compound	alamar Blue®						Optička gustina					
		U95CL vrednost	IC50 vrednost	U95CL vrednost	SCRT(CHISQ/df)	Maksimalni inhibitorni efekat	Minimalni inhibitorni efekat	U95CL vrednost	IC50 vrednost	U95CL vrednost	SCRT(CHISQ/df)	Maksimalni inhibitorni efekat	Minimalni inhibitorni efekat
341	NOV00726	>20	>20	>20	16.3	30.1	67.3	9.81	11.87	14.15	7.9	-75.3	0.4
342	NOV00727	>20	>20	>20	10.3	21.5	102.6	13.45	18.35	20.00	13.8	-53.7	20.7
343	NOV00728	>20	>20	>20	6.8	-15.4	33.4	11.07	12.49	14.04	6.4	-85.5	5.1
344	NOV00729	>20	>20	>20	17.2	6.3	39.7	9.66	12.84	17.03	11.5	-70.3	-1.4
345	NOV00734	15.4	16.4	17.5	8.4	-86.7	115.9	>20	>20	>20	6.5	-22.4	9.8
346	NOV00735	15.5	16.6	17.8	9.9	-80.4	99.4	>20	>20	>20	5.0	-20.7	2.8
347	NOV00736	14.1	15.2	16.5	8.6	-84.5	56.1	>20	>20	>20	10.3	-15.8	1.9
348	NOV00737	15.7	16.9	18.2	10.4	-77.9	107.9	>20	>20	>20	8.3	-17.5	-4.1
349	NOV00738	>20	>20	>20	9.5	-7.7	44.1	11.08	11.82	12.56	4.5	-97.3	29.3
350	NOV00739	>20	>20	>20	7.1	-27.3	48.0	10.35	11.24	12.18	5.8	-100.4	-1.4
351	NOV00740	>20	>20	>20	7.8	22.8	47.1	10.09	11.43	12.84	7.9	-99.0	1.6
352	NOV00742	>20	>20	>20	6.9	41.5	83.1	13.15	16.83	20.00	10.9	-57.3	-5.9
353	NOV00743	>20	>20	>20	6.9	35.1	79.5	10.88	12.02	13.22	7.7	-93.3	4.9
354	NOV00744	>20	>20	>20	8.2	-1.5	69.8	10.19	12.03	14.22	11.5	-92.5	27.0
355	NOV00747	>20	>20	>20	12.0	-3.9	16.5	10.94	16.59	20.00	20.2	-59.1	2.9
356	NOV00749	>20	>20	>20	14.7	-4.2	23.8	13.74	15.95	19.03	8.7	-63.9	8.2
357	NOV00751	19.5	>20	>20	8.1	-36.9	19.8	10.16	13.10	16.91	13.9	-75.6	3.0
358	NOV00757	>20	>20	>20	4.7	24.0	45.4	10.01	13.33	17.97	15.9	-74.7	6.2
359	NOV00758	>20	>20	>20	5.3	-19.5	39.4	9.10	11.11	13.23	13.4	-98.1	-3.2
360	NOV00760	>20	>20	>20	8.8	-1.1	13.5	3.21	3.50	3.84	6.5	-92.4	2.2
361	NOV00761	15.5	>20	>20	19.0	-37.2	19.2	8.28	12.09	17.33	11.3	-68.2	-5.9
362	NOV00769	>20	>20	>20	7.1	-15.5	13.9	9.20	10.16	11.14	4.2	-95.7	6.2
363	NOV00771	>20	>20	>20	14.1	23.2	53.4	10.61	13.74	19.00	9.7	-66.8	0.7
364	NOV00772	>20	>20	>20	6.4	-12.8	6.6	5.73	12.45	20.00	14.5	-60.6	-0.2
365	NOV00773	>20	>20	>20	8.4	9.2	50.7	8.68	10.69	12.87	7.4	-79.0	-1.1
366	NOV00774	>20	>20	>20	7.6	-14.6	17.2	12.21	15.02	19.21	9.2	-63.5	2.4
367	NOV00777	>20	>20	>20	9.6	0.8	53.5	4.62	8.49	14.31	21.2	-93.1	5.6
368	NOV00780	>20	>20	>20	5.6	-9.7	47.8	0.46	2.61	4.52	14.7	-74.6	-11.6
369	NOV00782	>20	>20	>20	11.6	0.0	35.7	3.51	4.75	7.02	11.4	-86.0	1.7
370	NOV00783	>20	>20	>20	6.7	-29.5	19.2	3.80	5.38	20.00	10.6	-64.2	2.0
371	NOV00785	11.5	12.9	14.4	10.6	-98.4	19.8	7.53	>20	>20	22.4	-46.0	0.7
372	NOV00786	>20	>20	>20	10.2	-0.4	34.4	3.41	3.66	3.92	3.5	-103.5	0.9
373	NOV00788	>20	>20	>20	8.0	-8.1	39.9	13.88	16.91	20.00	9.4	-58.2	-1.4
374	NOV00789	17.3	>20	>20	15.2	-36.2	13.0	8.06	12.07	17.80	11.1	-67.1	2.4
375	NOV00790	>20	>20	>20	6.6	9.9	34.3	7.64	15.84	20.00	19.2	-57.0	-5.4
376	NOV00792	>20	>20	>20	6.7	-3.5	21.3	3.28	3.67	4.14	6.6	-90.7	-1.5
377	NOV00793	>20	>20	>20	9.2	-20.0	-2.6	0.37	1.22	3.80	30.4	-60.7	2.3
378	NOV00795	>20	>20	>20	9.1	-17.7	12.8	10.61	11.49	12.39	4.9	-97.3	4.3
379	NOV00796	>20	>20	>20	15.9	30.5	96.5	10.99	12.83	14.90	3.9	-71.1	8.3
380	NOV00797	>20	>20	>20	20.7	-8.4	40.8	11.57	12.64	13.79	5.5	-91.9	9.0
381	NOV00798	13.7	>20	>20	18.2	-46.0	20.9	10.40	11.86	13.37	6.6	-90.1	9.0
382	NOV00800	>20	>20	>20	10.5	-6.4	25.5	10.51	12.21	14.09	8.8	-86.4	7.6
383	NOV00802	10.6	11.8	13.2	5.3	-97.5	20.2	>20	>20	>20	9.6	-14.1	7.9
384	NOV00808	11.9	13.1	14.4	7.3	-97.7	33.4	9.77	>20	>20	17.7	-49.1	-4.6
385	NOV00809	>20	>20	>20	9.4	-11.0	24.8	11.96	17.44	20	20.4	-57.2	5.0
386	NOV00816	3.8	4.1	4.5	6.5	-107.2	38.9	1.48	>20	>20	30.8	-34.1	0.2
387	NOV00817	3.4	3.8	4.2	5.9	-105.0	21.8	2.46	>20	>20	28.9	-38.5	-5.2
388	NOV00829	>20	>20	>20	6.4	-17.6	19.8	12.30	15.00	18.82	9.5	-65.7	9.0
389	NOV00830	>20	>20	>20	12.2	30.9	69.2	10.75	13.02	15.75	8.2	-73.1	6.8
390	NOV00834	3.4	3.7	4.1	4.3	-106.3	18.4	9.84	>20	>20	21.0	-30.3	9.9
391	NOV00846	>20	>20	>20	9.1	23.9	62.2	1.84	11.26	20.00	18.3	-57.4	7.6
392	NOV00848	10.8	12.2	13.7	6.2	-92.5	15.1	>20	>20	>20	7.0	-26.4	17.8
393	NOV00855	11.1	12.6	14.3	7.8	-90.3	18.3	>20	>20	>20	9.4	-22.5	9.1
394	NOV00856	15.2	>20	>20	6.7	-46.3	13.4	15.46	18.32	20.00	6.1	-54.3	9.2
395	NOV00863	10.9	13.1	15.8	7.2	-74.8	17.4	11.33	>20	>20	22.5	-30.8	0.8
396	NOV00864	>20	>20	>20	8.0	-14.4	5.9	4.13	6.39	9.58	13.7	-98.5	1.2
397	NOV00866	13.6	>20	>20	16.9	-47.7	14.2	12.17	14.09	16.62	8.4	-74.3	7.6
398	NOV00868	10.6	11.7	12.9	3.1	-98.0	20.8	>20	>20	>20	5.6	-13.8	3.5

PRILOG 4.

Jedinjenja sa maksimalnom inhibitornom koncentracijom iznad - 50% u oba eseja

Broj jedinjenja	NOVARTIS kod	Maksimalni inhibitorni efekat (alamarBlue®)	Maksimalni inhibitorni efekat (Optička gustina)	Broj jedinjenja	NOVARTIS kod	Maksimalni inhibitorni efekat (alamarBlue®)	Maksimalni inhibitorni efekat (Optička gustina)	Broj jedinjenja	NOVARTIS kod	Maksimalni inhibitorni efekat (alamarBlue®)	Maksimalni inhibitorni efekat (Optička gustina)
1	NOV00869	10	-15	61	NOV00929	-7	-15	121	NOV00989	1	-15
2	NOV00870	3	-7	62	NOV00930	11	-16	122	NOV00990	-13	-5
3	NOV00871	-8	-10	63	NOV00931	21	-13	123	NOV00991	-1	-25
4	NOV00872	6	-13	64	NOV00932	44	-18	124	NOV00992	-12	-22
5	NOV00873	30	-20	65	NOV00933	-12	-4	125	NOV00993	20	-21
6	NOV00874	-27	-9	66	NOV00934	38	-19	126	NOV00994	-5	-12
7	NOV00875	3	-29	67	NOV00935	34	-19	127	NOV00995	-18	-15
8	NOV00876	17	-25	68	NOV00936	22	-12	128	NOV00996	2	-13
9	NOV00877	40	-17	69	NOV00937	-14	-4	129	NOV00997	-18	-7
10	NOV00878	-16	-10	70	NOV00938	-17	-8	130	NOV00998	-7	-12
11	NOV00879	-3	-21	71	NOV00939	-12	-25	131	NOV00999	3	-19
12	NOV00880	17	-21	72	NOV00940	-16	-4	132	NOV01000	-6	-12
13	NOV00881	-20	-20	73	NOV00941	-17	-9	133	NOV01001	-13	-25
14	NOV00882	8	-20	74	NOV00942	-9	-4	134	NOV01002	-14	-16
15	NOV00883	-10	-19	75	NOV00943	14	-9	135	NOV01003	-9	-7
16	NOV00884	-2	-14	76	NOV00944	-10	-21	136	NOV01004	4	-13
17	NOV00885	-16	-20	77	NOV00945	4	-7	137	NOV01005	-10	-11
18	NOV00886	46	-21	78	NOV00946	-12	-3	138	NOV01006	-8	-10
19	NOV00887	-11	-15	79	NOV00947	-13	-15	139	NOV01007	-2	-9
20	NOV00888	3	-17	80	NOV00948	-13	-9	140	NOV01008	52	-12
21	NOV00889	16	-19	81	NOV00949	5	-16	141	NOV01009	-12	-16
22	NOV00890	-24	-26	82	NOV00950	-20	-11	142	NOV01010	3	-11
23	NOV00891	-18	-6	83	NOV00951	14	-4	143	NOV01011	41	-7
24	NOV00892	-10	-15	84	NOV00952	-16	-5	144	NOV01012	-11	-18
25	NOV00893	-10	-14	85	NOV00953	12	-23	145	NOV01013	-13	-3
26	NOV00894	-1	-30	86	NOV00954	-1	-1	146	NOV01014	-7	-14
27	NOV00895	-18	-18	87	NOV00955	2	-12	147	NOV01015	1	-21
28	NOV00896	-3	-21	88	NOV00956	-14	-8	148	NOV01016	-2	-10
29	NOV00897	6	-21	89	NOV00957	-8	-9	149	NOV01017	6	-10
30	NOV00898	-5	-3	90	NOV00958	-14	-8	150	NOV01018	-11	-10
31	NOV00899	10	-4	91	NOV00959	-11	-8	151	NOV01019	-5	-9
32	NOV00900	16	-16	92	NOV00960	1	-7	152	NOV01020	9	-8
33	NOV00901	6	-15	93	NOV00961	-4	-7	153	NOV01021	-18	-13
34	NOV00902	-11	-9	94	NOV00962	-9	-11	154	NOV01022	-8	-18
35	NOV00903	-19	-17	95	NOV00963	-13	-15	155	NOV01023	-7	-26
36	NOV00904	-17	-9	96	NOV00964	44	-16	156	NOV01024	-5	-10
37	NOV00905	-14	-13	97	NOV00965	11	-10	157	NOV01025	-26	-11
38	NOV00906	0	-14	98	NOV00966	28	-10	158	NOV01026	-14	-16
39	NOV00907	55	-15	99	NOV00967	15	-13	159	NOV01027	33	-20
40	NOV00908	-5	-11	100	NOV00968	-4	-12	160	NOV01028	-15	-18
41	NOV00909	-16	-20	101	NOV00969	34	-19	161	NOV01029	11	-22
42	NOV00910	-10	-11	102	NOV00970	-24	-28	162	NOV01030	31	-18
43	NOV00911	59	-25	103	NOV00971	-20	-7	163	NOV01031	23	-14
44	NOV00912	-11	-18	104	NOV00972	-7	-26	164	NOV01032	43	-17
45	NOV00913	-24	0	105	NOV00973	37	-13	165	NOV01033	-14	-9
46	NOV00914	11	-13	106	NOV00974	1	-17	166	NOV01034	4	-12
47	NOV00915	0	-3	107	NOV00975	-22	-13	167	NOV01035	-19	-7
48	NOV00916	-2	-13	108	NOV00976	-5	-20	168	NOV01036	48	-17
49	NOV00917	-21	-11	109	NOV00977	8	-17	169	NOV01037	-3	-4
50	NOV00918	35	-18	110	NOV00978	-10	-8	170	NOV01038	-9	-7
51	NOV00919	-5	-14	111	NOV00979	32	-15	171	NOV01039	-5	-8
52	NOV00920	30	-11	112	NOV00980	-22	-15	172	NOV01040	-14	-12
53	NOV00921	-7	-11	113	NOV00981	-20	-15	173	NOV01041	-5	-14
54	NOV00922	-23	-10	114	NOV00982	25	-14	174	NOV01042	7	-19
55	NOV00923	-10	-10	115	NOV00983	15	-13	175	NOV01043	-2	-18
56	NOV00924	8	-17	116	NOV00984	-5	-26	176	NOV01044	-7	-3
57	NOV00925	-5	-11	117	NOV00985	20	-18	177	NOV01045	-23	-4
58	NOV00926	6	-15	118	NOV00986	-11	-9	178	NOV01046	8	-13
59	NOV00927	-5	-5	119	NOV00987	14	-18	179	NOV01047	-4	-6
60	NOV00928	-6	-9	120	NOV00988	8	-12	180	NOV01048	-16	-6

Broj jedinjenja	NOVARTIS kod	Maksimalni inhibitorni efekat (alamarBlue®)	Maksimalni inhibitorni efekat (Optička gustina)	Broj jedinjenja	NOVARTIS kod	Maksimalni inhibitorni efekat (alamarBlue®)	Maksimalni inhibitorni efekat (Optička gustina)	Broj jedinjenja	NOVARTIS kod	Maksimalni inhibitorni efekat (alamarBlue®)	Maksimalni inhibitorni efekat (Optička gustina)
151	NOV01019	-5	-9	221	NOV01089	-7	-29	271	NOV01139	2	-20
152	NOV01020	9	-8	222	NOV01090	-16	-17	272	NOV01140	6	-5
153	NOV01021	-18	-13	223	NOV01091	-5	-22	273	NOV01141	11	-16
154	NOV01022	-8	-18	224	NOV01092	-11	-10	274	NOV01142	-4	-16
155	NOV01023	-7	-26	225	NOV01093	-5	-11	275	NOV01143	11	-7
156	NOV01024	-5	-10	226	NOV01094	-1	-23	276	NOV01144	15	-14
157	NOV01025	-26	-11	227	NOV01095	21	-15	277	NOV01145	-9	-3
158	NOV01026	-14	-16	228	NOV01096	30	-15	278	NOV01146	40	-16
159	NOV01027	33	-20	229	NOV01097	-6	-14	279	NOV01147	-4	-5
160	NOV01028	-15	-18	230	NOV01098	-7	-14	280	NOV01148	-12	-4
161	NOV01029	11	-22	211	NOV01079	-20	-13	271	NOV01139	2	-20
162	NOV01030	31	-18	212	NOV01080	-13	-6	272	NOV01140	6	-5
163	NOV01031	23	-14	213	NOV01081	-6	-12	273	NOV01141	11	-16
164	NOV01032	43	-17	214	NOV01082	13	-11	274	NOV01142	-4	-16
165	NOV01033	-14	-9	215	NOV01083	27	-13	275	NOV01143	11	-7
166	NOV01034	4	-12	216	NOV01084	6	-10	276	NOV01144	15	-14
167	NOV01035	-19	-7	217	NOV01085	7	-20	277	NOV01145	-9	-3
168	NOV01036	48	-17	218	NOV01086	5	-3	278	NOV01146	40	-16
169	NOV01037	-3	-4	219	NOV01087	8	-11	279	NOV01147	-4	-5
170	NOV01038	-9	-7	220	NOV01088	18	-6	280	NOV01148	-12	-4
171	NOV01039	-5	-8	221	NOV01089	-7	-29	281	NOV01149	9	-18
172	NOV01040	-14	-12	222	NOV01090	-16	-17	282	NOV01150	0	-15
173	NOV01041	-5	-14	223	NOV01091	-5	-22	283	NOV01151	32	-13
174	NOV01042	7	-19	224	NOV01092	-11	-10	284	NOV01152	28	-15
175	NOV01043	-2	-18	225	NOV01093	-5	-11	285	NOV01153	17	-13
176	NOV01044	-7	-3	226	NOV01094	-1	-23	286	NOV01154	8	-13
177	NOV01045	-23	-4	227	NOV01095	21	-15	287	NOV01155	1	-22
178	NOV01046	8	-13	228	NOV01096	30	-15	288	NOV01156	2	-6
179	NOV01047	-4	-6	229	NOV01097	-6	-14	289	NOV01157	2	-2
180	NOV01048	-16	-6	230	NOV01098	-7	-14	290	NOV01158	8	-21
181	NOV01049	-11	-16	231	NOV01099	12	-29	291	NOV01159	7	-8
182	NOV01050	-4	-9	232	NOV01100	38	-28	292	NOV01160	-14	-17
183	NOV01051	-25	-10	233	NOV01101	-25	-16	293	NOV01161	-23	-9
184	NOV01052	-2	-22	234	NOV01102	-10	-12	294	NOV01162	22	-8
185	NOV01053	-9	-7	235	NOV01103	40	-27	295	NOV01163	13	-18
186	NOV01054	-1	-15	236	NOV01104	-13	-10	296	NOV01164	4	-6
187	NOV01055	5	-9	237	NOV01105	-15	-15	297	NOV01165	-15	-14
188	NOV01056	16	-5	238	NOV01106	7	-15	298	NOV01166	-16	-17
189	NOV01057	-23	-11	239	NOV01107	13	-24	299	NOV01167	13	-9
190	NOV01058	2	-14	240	NOV01108	-19	-12	300	NOV01168	12	-18
191	NOV01059	-9	-26	241	NOV01109	-17	-17	301	NOV01169	-12	-12
192	NOV01060	4	-12	242	NOV01110	3	-14	302	NOV01170	1	-18
193	NOV01061	7	-5	243	NOV01111	21	-6	303	NOV01171	-17	-6
194	NOV01062	-10	-6	244	NOV01112	2	-20	304	NOV01172	26	-17
195	NOV01063	11	-6	245	NOV01113	-20	-12	305	NOV01173	-22	-9
196	NOV01064	-3	-20	246	NOV01114	-20	-6	306	NOV01174	40	-21
197	NOV01065	3	-20	247	NOV01115	5	-13	307	NOV01175	-25	-12
198	NOV01066	-17	-7	248	NOV01116	-3	-13	308	NOV01176	-14	-14
199	NOV01067	-5	-18	249	NOV01117	-7	-3	309	NOV01177	20	-21
200	NOV01068	12	-23	250	NOV01118	39	-20	310	NOV01178	1	-13
201	NOV01069	-1	-7	251	NOV01119	32	-14	311	NOV01179	-2	-10
202	NOV01070	-21	-12	252	NOV01120	-21	-4	312	NOV01180	-12	-12
203	NOV01071	-20	-11	253	NOV01121	17	-16	313	NOV01181	27	-18
204	NOV01072	-4	-22	254	NOV01122	0	-9	314	NOV01182	5	-15
205	NOV01073	-3	-11	255	NOV01123	3	-14	315	NOV01183	4	-6
206	NOV01074	9	-13	256	NOV01124	-16	-14	316	NOV01184	9	-3
207	NOV01075	-18	-18	257	NOV01125	11	-21	317	NOV01185	4	-18
208	NOV01076	0	-16	258	NOV01126	-1	-21	318	NOV01186	30	-13
209	NOV01077	-16	-6	259	NOV01127	-5	-12	319	NOV01187	-19	-3
210	NOV01078	-24	-4	260	NOV01128	4	-13	320	NOV01188	8	-19
211	NOV01079	-20	-13	261	NOV01129	-16	-12	321	NOV01189	-25	-1
212	NOV01080	-13	-6	262	NOV01130	-3	-6	322	NOV01190	-10	-17
213	NOV01081	-6	-12	263	NOV01131	-4	-7	323	NOV01191	-23	-20
214	NOV01082	13	-11	264	NOV01132	5	-7	324	NOV01192	-1	-7
215	NOV01083	27	-13	265	NOV01133	16	-21	325	NOV01193	-18	-9
216	NOV01084	6	-10	266	NOV01134	12	-14	326	NOV01194	27	-15
217	NOV01085	7	-20	267	NOV01135	-13	-15	327	NOV01195	-23	-19
218	NOV01086	5	-3	268	NOV01136	-6	-4	328	NOV01196	19	-11
219	NOV01087	8	-11	269	NOV01137	-18	-12	329	NOV01197	-2	-16
220	NOV01088	18	-6	270	NOV01138	3	-2	330	NOV01198	23	-12

Broj jedinjenja	NOVARTIS kod	Maksimalni inhibitorski efekat (alamarBlue®)	Maksimalni inhibitorski efekat (Optička gustina)	Broj jedinjenja	NOVARTIS kod	Maksimalni inhibitorski efekat (alamarBlue®)	Maksimalni inhibitorski efekat (Optička gustina)	Broj jedinjenja	NOVARTIS kod	Maksimalni inhibitorski efekat (alamarBlue®)	Maksimalni inhibitorski efekat (Optička gustina)
331	NOV01199	36	-24	401	NOV01269	-15	-22	471	NOV01339	-18	-15
332	NOV01200	-2	-2	402	NOV01270	-22	-11	472	NOV01340	16	-14
333	NOV01201	5	-17	403	NOV01271	-3	-6	473	NOV01341	23	-19
334	NOV01202	-14	-27	404	NOV01272	-20	-10	474	NOV01342	-20	-8
335	NOV01203	-19	-26	405	NOV01273	-11	-8	475	NOV01343	-24	-13
336	NOV01204	-8	-5	406	NOV01274	-26	-8	476	NOV01344	-6	-13
337	NOV01205	-16	-5	407	NOV01275	-29	-19	477	NOV01345	-19	-7
338	NOV01206	8	-7	408	NOV01276	-18	-8	478	NOV01346	8	-10
339	NOV01207	-16	-15	409	NOV01277	-28	-11	479	NOV01347	16	-16
340	NOV01208	0	-5	410	NOV01278	-19	-12	480	NOV01348	-23	-17
341	NOV01209	-1	-21	411	NOV01279	-13	-12	481	NOV01349	-29	-7
342	NOV01210	-10	-21	412	NOV01280	-8	-5	482	NOV01350	-26	-7
343	NOV01211	1	-5	413	NOV01281	-13	-6	483	NOV01351	-13	-6
344	NOV01212	4	-7	414	NOV01282	-8	-10	484	NOV01352	7	-8
345	NOV01213	-23	-9	415	NOV01283	4	-4	485	NOV01353	32	-23
346	NOV01214	-6	-2	416	NOV01284	-26	-7	486	NOV01354	-30	-9
347	NOV01215	10	-2	417	NOV01285	-12	-20	487	NOV01355	-27	-16
348	NOV01216	1	-16	418	NOV01286	-3	-15	488	NOV01356	-14	-7
349	NOV01217	-20	-14	419	NOV01287	6	-5	489	NOV01357	-1	-17
350	NOV01218	-8	-6	420	NOV01288	-9	-4	490	NOV01358	8	-17
351	NOV01219	-11	-10	421	NOV01289	-24	-15	491	NOV01359	-9	-16
352	NOV01220	0	-18	422	NOV01290	-23	-16	492	NOV01360	15	-13
353	NOV01221	-1	-17	423	NOV01291	-13	-12	493	NOV01361	38	-12
354	NOV01222	-8	-13	424	NOV01292	-13	-14	494	NOV01362	1	-23
355	NOV01223	-3	-5	425	NOV01293	-5	-11	495	NOV01363	9	-19
356	NOV01224	-22	-27	426	NOV01294	0	-19	496	NOV01364	4	-16
357	NOV01225	-21	-21	427	NOV01295	-29	-9	497	NOV01365	-7	-1
358	NOV01226	-6	-11	428	NOV01296	-29	-11	498	NOV01366	-13	-5
359	NOV01227	-12	-17	429	NOV01297	-2	-10	499	NOV01367	-22	-3
360	NOV01228	-11	-9	430	NOV01298	-19	-6	500	NOV01368	9	-14
361	NOV01229	-6	-16	431	NOV01299	-13	-9	501	NOV01369	14	-15
362	NOV01230	-9	-9	432	NOV01300	5	-7	502	NOV01370	31	-14
363	NOV01231	-14	-13	433	NOV01301	-25	-13	503	NOV01371	-18	-6
364	NOV01232	-15	-6	434	NOV01302	-15	-11	504	NOV01372	21	-14
365	NOV01233	-6	-6	435	NOV01303	-8	-13	505	NOV01373	-6	-6
366	NOV01234	-22	-10	436	NOV01304	-13	-5	506	NOV01374	-15	-9
367	NOV01235	-9	-17	437	NOV01305	-20	-14	507	NOV01375	-17	-7
368	NOV01236	-2	-15	438	NOV01306	13	-16	508	NOV01376	13	-12
369	NOV01237	15	-22	439	NOV01307	-24	-16	509	NOV01377	-25	-6
370	NOV01238	-24	-7	440	NOV01308	-22	-12	510	NOV01378	7	-10
371	NOV01239	-18	-8	441	NOV01309	-1	-14	511	NOV01379	30	-16
372	NOV01240	-10	-11	442	NOV01310	-23	-7	512	NOV01380	-23	-24
373	NOV01241	0	-3	443	NOV01311	-21	-10	513	NOV01381	-25	-19
374	NOV01242	-3	-20	444	NOV01312	-4	-12	514	NOV01382	14	-17
375	NOV01243	1	-7	445	NOV01313	-9	-13	515	NOV01383	7	-14
376	NOV01244	-22	-8	446	NOV01314	-3	-15	516	NOV01384	-21	-2
377	NOV01245	-13	-16	447	NOV01315	-22	-20	517	NOV01385	-18	-6
378	NOV01246	-23	-9	448	NOV01316	15	-11	518	NOV01386	-13	-15
379	NOV01247	-26	-11	449	NOV01317	19	-13	519	NOV01387	2	-14
380	NOV01248	-23	-30	450	NOV01318	-24	-14	520	NOV01388	13	-14
381	NOV01249	4	-10	451	NOV01319	-25	0	521	NOV01389	-25	-2
382	NOV01250	15	-20	452	NOV01320	-2	-14	522	NOV01390	2	-16
383	NOV01251	-21	-15	453	NOV01321	24	-18	523	NOV01391	5	-12
384	NOV01252	-24	-27	454	NOV01322	-24	3	524	NOV01392	-16	-1
385	NOV01253	18	-24	455	NOV01323	10	-8	525	NOV01393	-5	-5
386	NOV01254	-27	-12	456	NOV01324	16	-13	526	NOV01394	-22	-5
387	NOV01255	-27	-18	457	NOV01325	-25	-6	527	NOV01395	-4	-16
388	NOV01256	-21	-24	458	NOV01326	18	-13	528	NOV01396	-8	-2
389	NOV01257	-22	-11	459	NOV01327	-19	-3	529	NOV01397	6	-3
390	NOV01258	-25	-14	460	NOV01328	-7	-8	530	NOV01398	-17	-24
391	NOV01259	26	-20	461	NOV01329	-22	-10	531	NOV01399	-5	-1
392	NOV01260	-22	-13	462	NOV01330	0	-14	532	NOV01400	-5	-4
393	NOV01261	-1	-11	463	NOV01331	16	-12	533	NOV01401	-25	-18
394	NOV01262	27	-15	464	NOV01332	-21	-15	534	NOV01402	-10	-15
395	NOV01263	-23	-15	465	NOV01333	-7	-7	535	NOV01403	1	-16
396	NOV01264	-22	-6	466	NOV01334	14	-10	536	NOV01404	-1	-24
397	NOV01265	0	-12	467	NOV01335	-5	-12	537	NOV01405	-9	-16
398	NOV01266	30	-18	468	NOV01336	5	-19	538	NOV01406	9	-17
399	NOV01267	2	-27	469	NOV01337	-29	-30	539	NOV01407	-6	0
400	NOV01268	-29	-16	470	NOV01338	-5	-7	540	NOV01408	8	-7

Broj jedinjenja	NOVARTIS kod	Maksimalni inhibitorni efekat (alamarBlue®)	Maksimalni inhibitorni efekat (Optička gustina)	Broj jedinjenja	NOVARTIS kod	Maksimalni inhibitorni efekat (alamarBlue®)	Maksimalni inhibitorni efekat (Optička gustina)	Broj jedinjenja	NOVARTIS kod	Maksimalni inhibitorni efekat (alamarBlue®)	Maksimalni inhibitorni efekat (Optička gustina)
541	NOV01409	11	-3	611	NOV01479	-25	-18	681	NOV01549	-24	-11
542	NOV01410	9	-19	612	NOV01480	-9	-9	682	NOV01550	-22	-17
543	NOV01411	-2	-3	613	NOV01481	-26	-6	683	NOV01551	-14	-13
544	NOV01412	5	-2	614	NOV01482	-5	-9	684	NOV01552	-13	-20
545	NOV01413	8	-8	615	NOV01483	-10	-9	685	NOV01553	6	-13
546	NOV01414	23	-26	616	NOV01484	13	-15	686	NOV01554	25	-12
547	NOV01415	1	-2	617	NOV01485	-25	-15	687	NOV01555	-17	-14
548	NOV01416	-14	-1	618	NOV01486	-6	-12	688	NOV01556	7	-13
549	NOV01417	-2	-12	619	NOV01487	-3	-6	689	NOV01557	18	-10
550	NOV01418	30	-12	620	NOV01488	-13	-9	690	NOV01558	-4	-12
551	NOV01419	-15	-1	621	NOV01489	-11	-12	691	NOV01559	-20	-6
552	NOV01420	-2	-13	622	NOV01490	43	-21	692	NOV01560	42	-18
553	NOV01421	19	-6	623	NOV01491	-14	-19	693	NOV01561	-9	-7
554	NOV01422	31	-17	624	NOV01492	18	-24	694	NOV01562	2	-7
555	NOV01423	-18	-7	625	NOV01493	19	-21	695	NOV01563	-6	-7
556	NOV01424	-28	4	626	NOV01494	-18	-14	696	NOV01564	-1	-15
557	NOV01425	-30	-5	627	NOV01495	-10	-18	697	NOV01565	-3	-9
558	NOV01426	-2	-2	628	NOV01496	-20	-14	698	NOV01566	-16	-27
559	NOV01427	20	-12	629	NOV01497	9	-18	699	NOV01567	-1	-14
560	NOV01428	29	-16	630	NOV01498	-14	-16	700	NOV01568	4	-19
561	NOV01429	-23	3	631	NOV01499	21	-23	701	NOV01569	-19	-6
562	NOV01430	3	-21	632	NOV01500	36	-19	702	NOV01570	-7	-14
563	NOV01431	4	-5	633	NOV01501	-14	-28	703	NOV01571	11	-7
564	NOV01432	32	-16	634	NOV01502	-26	-12	704	NOV01572	-12	-15
565	NOV01433	-16	2	635	NOV01503	-16	-18	705	NOV01573	-6	-19
566	NOV01434	-22	-2	636	NOV01504	54	-19	706	NOV01574	-2	-15
567	NOV01435	8	-5	637	NOV01505	-16	-12	707	NOV01575	-12	-7
568	NOV01436	17	-6	638	NOV01506	-19	-12	708	NOV01576	-4	-17
569	NOV01437	-24	-2	639	NOV01507	-13	-16	709	NOV01577	-1	-4
570	NOV01438	-18	2	640	NOV01508	15	-17	710	NOV01578	-22	-14
571	NOV01439	-1	-9	641	NOV01509	58	-13	711	NOV01579	-5	-9
572	NOV01440	-21	2	642	NOV01510	15	-14	712	NOV01580	39	-21
573	NOV01441	-23	2	643	NOV01511	-6	-19	713	NOV01581	-14	-8
574	NOV01442	-2	-10	644	NOV01512	20	-18	714	NOV01582	-11	-5
575	NOV01443	9	-13	645	NOV01513	-18	-24	715	NOV01583	8	-3
576	NOV01444	23	-18	646	NOV01514	23	-17	716	NOV01584	-14	-15
577	NOV01445	51	-24	647	NOV01515	32	-19	717	NOV01585	-4	-29
578	NOV01446	-17	-1	648	NOV01516	-16	-9	718	NOV01586	3	-12
579	NOV01447	-25	11	649	NOV01517	9	-12	719	NOV01587	-16	-8
580	NOV01448	-14	4	650	NOV01518	21	-25	720	NOV01588	-5	-6
581	NOV01449	-5	0	651	NOV01519	33	-14	721	NOV01589	-17	-14
582	NOV01450	29	-5	652	NOV01520	-16	-28	722	NOV01590	2	-18
583	NOV01451	-23	2	653	NOV01521	-17	-11	723	NOV01591	-15	-6
584	NOV01452	-19	2	654	NOV01522	-3	-21	724	NOV01592	-10	-11
585	NOV01453	-15	-2	655	NOV01523	8	-17	725	NOV01593	-12	-16
586	NOV01454	5	-6	656	NOV01524	14	-17	726	NOV01594	-19	-16
587	NOV01455	20	-10	657	NOV01525	-16	-11	727	NOV01595	-4	-5
588	NOV01456	31	-19	658	NOV01526	8	-19	728	NOV01596	-3	-17
589	NOV01457	-23	-3	659	NOV01527	-21	-9	729	NOV01597	-25	-9
590	NOV01458	-9	-1	660	NOV01528	-16	-7	730	NOV01598	-1	-7
591	NOV01459	20	1	661	NOV01529	-17	-10	731	NOV01599	-3	-6
592	NOV01460	28	-11	662	NOV01530	4	-16	732	NOV01600	4	-17
593	NOV01461	-21	9	663	NOV01531	23	-16	733	NOV01601	20	-14
594	NOV01462	-20	-9	664	NOV01532	-15	-10	734	NOV01602	-18	-8
595	NOV01463	-9	-5	665	NOV01533	-18	-9	735	NOV01603	-17	-9
596	NOV01464	11	-8	666	NOV01534	-17	-8	736	NOV01604	-4	-18
597	NOV01465	18	-5	667	NOV01535	19	-15	737	NOV01605	20	-14
598	NOV01466	31	-10	668	NOV01536	-14	-14	738	NOV01606	-23	-11
599	NOV01467	-17	-2	669	NOV01537	-12	-8	739	NOV01607	-17	-13
600	NOV01468	11	-15	670	NOV01538	-17	-6	740	NOV01608	-16	-7
601	NOV01469	0	-14	671	NOV01539	-15	-28	741	NOV01609	-11	-17
602	NOV01470	-18	-28	672	NOV01540	-1	-12	742	NOV01610	2	-12
603	NOV01471	-14	-25	673	NOV01541	14	-17	743	NOV01611	9	-25
604	NOV01472	-14	-11	674	NOV01542	23	-16	744	NOV01612	-19	-10
605	NOV01473	-5	-26	675	NOV01543	43	-18	745	NOV01613	-7	-12
606	NOV01474	-13	-7	676	NOV01544	-11	-14	746	NOV01614	23	-16
607	NOV01475	-9	-15	677	NOV01545	-17	-11	747	NOV01615	-19	-19
608	NOV01476	-13	-20	678	NOV01546	-17	-12	748	NOV01616	-3	-13
609	NOV01477	-3	-10	679	NOV01547	4	-8	749	NOV01617	-6	-16
610	NOV01478	0	-7	680	NOV01548	21	-16	750	NOV01618	25	-15

Broj jedinjenja	NOVARTIS kod	Maksimalni inhibitorni efekat (alamarBlue®)	Maksimalni inhibitorni efekat (Optička gustina)	Broj jedinjenja	NOVARTIS kod	Maksimalni inhibitorni efekat (alamarBlue®)	Maksimalni inhibitorni efekat (Optička gustina)	Broj jedinjenja	NOVARTIS kod	Maksimalni inhibitorni efekat (alamarBlue®)	Maksimalni inhibitorni efekat (Optička gustina)
751	NOV01619	-18	-4	821	NOV01689	-18	-49	891	NOV01759	-15	-25
752	NOV01620	-13	-11	822	NOV01690	1	-15	892	NOV01760	-2	-22
753	NOV01621	13	-5	823	NOV01691	-26	-42	893	NOV01761	-25	-32
754	NOV01622	-12	-10	824	NOV01692	-40	-15	894	NOV01762	-20	-34
755	NOV01623	4	-10	825	NOV01693	-17	-38	895	NOV01763	-13	-40
756	NOV01624	13	-13	826	NOV01694	7	-15	896	NOV01764	-36	-25
757	NOV01625	12	-12	827	NOV01695	-24	-45	897	NOV01765	3	-44
758	NOV01626	-17	-8	828	NOV01696	19	-44	898	NOV01766	-19	-34
759	NOV01627	-14	-12	829	NOV01697	-25	-12	899	NOV01767	-15	-32
760	NOV01628	-20	-13	830	NOV01698	-12	-16	900	NOV01768	-28	-36
761	NOV01629	8	-22	831	NOV01699	-35	-30	901	NOV01769	-38	-38
762	NOV01630	17	-14	832	NOV01700	-18	-23	902	NOV01770	-33	-16
763	NOV01631	18	-9	833	NOV01701	-30	-8	903	NOV01771	-23	-19
764	NOV01632	-25	-8	834	NOV01702	6	-10	904	NOV01772	19	-24
765	NOV01633	-20	-32	835	NOV01703	-24	-9	905	NOV01773	-33	-45
766	NOV01634	-19	-42	836	NOV01704	-5	-9	906	NOV01774	1	-39
767	NOV01635	-17	-8	837	NOV01705	-23	-32	907	NOV01775	-28	-18
768	NOV01636	23	-43	838	NOV01706	-8	-13	908	NOV01776	-36	-17
769	NOV01637	-21	-11	839	NOV01707	-10	-8	909	NOV01777	9	-32
770	NOV01638	-14	-15	840	NOV01708	-45	-39	910	NOV01778	-25	-47
771	NOV01639	-13	-39	841	NOV01709	-10	-43	911	NOV01779	-36	-36
772	NOV01640	-11	-31	842	NOV01710	-16	-26	912	NOV01780	-26	-36
773	NOV01641	-10	-47	843	NOV01711	-33	-20	913	NOV01781	-15	-20
774	NOV01642	-20	-50	844	NOV01712	-1	-43	914	NOV01782	-43	-11
775	NOV01643	4	-32	845	NOV01713	-4	-27	915	NOV01783	-20	-36
776	NOV01644	0	-38	846	NOV01714	-1	-2	916	NOV01784	-8	-17
777	NOV01645	-23	-38	847	NOV01715	-18	-44	917	NOV01785	-1	-30
778	NOV01646	0	-41	848	NOV01716	-9	-34	918	NOV01786	-20	-18
779	NOV01647	-17	-17	849	NOV01717	-1	-21	919	NOV01787	-6	-47
780	NOV01648	4	-33	850	NOV01718	-4	-40	920	NOV01788	-44	-14
781	NOV01649	3	-29	851	NOV01719	-38	-11	921	NOV01789	-25	-13
782	NOV01650	-15	-2	852	NOV01720	12	-27	922	NOV01790	-16	-6
783	NOV01651	-13	-14	853	NOV01721	-2	-12	923	NOV01791	-23	-3
784	NOV01652	-19	-48	854	NOV01722	-39	-7	924	NOV01792	-18	-3
785	NOV01653	24	-18	855	NOV01723	-32	-26	925	NOV01793	-12	-9
786	NOV01654	-9	-42	856	NOV01724	-45	-14	926	NOV01794	-38	-18
787	NOV01655	-17	-13	857	NOV01725	-47	-9	927	NOV01795	-50	-44
788	NOV01656	-14	-7	858	NOV01726	-5	-41	928	NOV01796	-22	-44
789	NOV01657	-16	-11	859	NOV01727	-16	-44	929	NOV01797	-43	-27
790	NOV01658	-39	-12	860	NOV01728	-1	-36	930	NOV01798	-28	-12
791	NOV01659	-17	-22	861	NOV01729	20	-18	931	NOV01799	16	-23
792	NOV01660	41	-39	862	NOV01730	19	-43	932	NOV01800	-27	-49
793	NOV01661	-20	-23	863	NOV01731	-17	-13	933	NOV01801	-23	-34
794	NOV01662	-14	-14	864	NOV01732	-14	-48	934	NOV01802	-6	-32
795	NOV01663	8	-39	865	NOV01733	2	-45	935	NOV01803	-26	-38
796	NOV01664	-7	-33	866	NOV01734	-6	-10	936	NOV01804	-16	-13
797	NOV01665	5	-13	867	NOV01735	-11	-3	937	NOV01805	-23	-28
798	NOV01666	-32	-7	868	NOV01736	-24	-40	938	NOV01806	2	-25
799	NOV01667	-42	-4	869	NOV01737	-36	-49	939	NOV01807	-2	-10
800	NOV01668	-37	-6	870	NOV01738	-9	-24	940	NOV01808	-15	-33
801	NOV01669	-48	-7	871	NOV01739	-36	-22	941	NOV01809	-9	-18
802	NOV01670	5	-32	872	NOV01740	-34	-26	942	NOV01810	-30	-36
803	NOV01671	-45	-49	873	NOV01741	-47	-11	943	NOV01811	-24	-9
804	NOV01672	-28	-19	874	NOV01742	-27	-2	944	NOV01812	2	-31
805	NOV01673	21	-44	875	NOV01743	-30	-32	945	NOV01813	-28	-14
806	NOV01674	-10	-25	876	NOV01744	-1	-6	946	NOV01814	-34	-14
807	NOV01675	11	-30	877	NOV01745	-37	-3	947	NOV01815	-25	-10
808	NOV01676	30	-41	878	NOV01746	-8	-5	948	NOV01816	3	-46
809	NOV01677	5	-37	879	NOV01747	-44	-22	949	NOV01817	-19	-45
810	NOV01678	-21	-40	880	NOV01748	-25	-14	950	NOV01818	-28	-44
811	NOV01679	-31	-49	881	NOV01749	1	-44	951	NOV01819	6	-10
812	NOV01680	-19	-11	882	NOV01750	9	-34	952	NOV01820	-32	-12
813	NOV01681	5	-33	883	NOV01751	10	-39	953	NOV01821	-28	-15
814	NOV01682	21	-24	884	NOV01752	-16	-21	954	NOV01822	-31	-12
815	NOV01683	-11	-17	885	NOV01753	-28	-43	955	NOV01823	-18	-25
816	NOV01684	-39	-8	886	NOV01754	-13	-8	956	NOV01824	-38	-15
817	NOV01685	-3	-11	887	NOV01755	-26	-5	957	NOV01825	-28	-44
818	NOV01686	-17	-29	888	NOV01756	-20	-10	958	NOV01826	-22	-40
819	NOV01687	5	-31	889	NOV01757	-25	-45	959	NOV01827	-13	-38
820	NOV01688	-20	-23	890	NOV01758	-9	-25	960	NOV01828	-35	-15

Broj jedinjenja	NOVARTIS kod	Maksimalni inhibitorski efekat (alamarBlue®)	Maksimalni inhibitorski efekat (Optička gustina)
961	NOV01829	10	-12
962	NOV01830	-11	-11
963	NOV01831	-23	-6
964	NOV01832	-14	-9
965	NOV01833	-12	-10
966	NOV01834	46	-32
967	NOV01835	-43	-5
968	NOV01836	20	-14
969	NOV01837	-13	-4
970	NOV01838	-12	-18
971	NOV01839	-25	-5
972	NOV01840	-7	-25
973	NOV01841	32	-36
974	NOV01842	-4	-35
975	NOV01843	-21	-26
976	NOV01844	-34	-7
977	NOV01845	-23	-35
978	NOV01846	-5	-34
979	NOV01847	-9	-16
980	NOV01848	-8	-39
981	NOV01849	-19	-44
982	NOV01850	-23	-50
983	NOV01851	-14	-43
984	NOV01852	-32	-20
985	NOV01853	-5	-23
986	NOV01854	-40	-3
987	NOV01855	-17	-10
988	NOV01856	-6	-6
989	NOV01857	-24	-7
990	NOV01858	2	-29
991	NOV01859	13	-9
992	NOV01860	28	-43
993	NOV01861	30	-46
994	NOV01862	-14	-2
995	NOV01863	45	-42
996	NOV01864	-29	-33
997	NOV01865	-24	-15
998	NOV01866	-24	-37
999	NOV01867	-1	-50
1000	NOV01868	-30	-17
1001	NOV01869	-3	-10
1002	NOV01870	-33	-36
1003	NOV01871	-24	-25
1004	NOV01872	-25	-15
1005	NOV01873	-15	-11
1006	NOV01874	-12	-6
1007	NOV01875	-11	-31
1008	NOV01876	60	-18
1009	NOV01877	-11	-44
1010	NOV01878	-17	-14
1011	NOV01879	-10	-32
1012	NOV01880	25	-30
1013	NOV01881	-20	-32
1014	NOV01882	24	-10
1015	NOV01883	-19	-39
1016	NOV01884	-13	-26
1017	NOV01885	-3	-15
1018	NOV01886	22	-31
1019	NOV01887	24	-31
1020	NOV01888	-6	-47
1021	NOV01889	-35	-41
1022	NOV01890	31	-30
1023	NOV01891	-2	-14
1024	NOV01892	-24	-13
1025	NOV01893	-29	-33
1026	NOV01894	1	-26
1027	NOV01895	21	-15
1028	NOV01896	36	-36
1029	NOV01897	-35	-8
1030	NOV01898	8	-25

Broj jedinjenja	NOVARTIS kod	Maksimalni inhibitorski efekat (alamarBlue®)	Maksimalni inhibitorski efekat (Optička gustina)
1031	NOV01899	25	-16
1032	NOV01900	-14	-37
1033	NOV01901	-13	-45
1034	NOV01902	8	-17
1035	NOV01903	19	-33
1036	NOV01904	-15	-47
1037	NOV01905	23	-14
1038	NOV01906	21	-44
1039	NOV01907	-10	-40
1040	NOV01908	-3	-33
1041	NOV01909	-4	-39
1042	NOV01910	4	-41
1043	NOV01911	4	-3
1044	NOV01912	-12	-12
1045	NOV01913	-6	-22
1046	NOV01914	-9	-9
1047	NOV01915	-4	-9
1048	NOV01916	-24	-23
1049	NOV01917	4	-12
1050	NOV01918	-23	-11
1051	NOV01919	-30	-11
1052	NOV01920	14	-35
1053	NOV01921	-46	-18
1054	NOV01922	-7	-45
1055	NOV01923	9.6	-34.0
1056	NOV01924	1.3	-30.5
1057	NOV01925	-18	-41
1058	NOV01926	29	-40
1059	NOV01927	-20.4	-49.2
1060	NOV01928	-17.8	-14.9
1061	NOV01929	-45.1	-23.2
1062	NOV01930	-17.9	-22.1

BIOGRAFIJA

Katarina Petrović-Bulatović je rođena 2.10.1970. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i III beogradsku gimnaziju. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 1990. godine, a 1996. godine je diplomirala na Katedri za Mikrobiologiju, Instituta za Botaniku sa prosečnom ocenom 8,50 i ocenom 10 na diplomskom ispitu.

Magistarske studije na Biološkom fakultetu, na Katedri za mikrobiologiju, Instituta za Botaniku upisala je 1997. godine kao stipendista ministarstva za Nauku i Tehnologiju, Republike Srbije. Od avgusta iste godine je zaposlena kao asistent pripravnik na Katedri za Mikrobiologiju i Imunologiju, Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu gde je radila kao predavač praktične nastave na istoimenom predmetu i učestvovala u rutinskoj dijagnostici kao i uspostavljanju molekularno bioloških metoda u dijagnostici mikroorganizama. Praktični deo magistarskog rada je uradila na odeljenju za Mikrobiologiju zavoda za preventivnu medicinu Vojno Medicinske Akademije u Beogradu pod naslovom “Molekularna dijagnostika tuberkuloze i analiza mutacija *rpoB* gena *Mycobacterium tuberculosis* kompleksa” koju je uspešno odbranila 2004. godine.

Od 2000. karijeru nastavlja na Institutu za biljnu fiziologiju, Univerzitetu u Bazelu (Institut für pflanzenphysiologie Universität Basel) kao istraživač na projektu “*A new approach to identify downstream effectors involved in cell cycle progression and/or growth control in the yeast Saccharomyces cerevisiae*” i predavač praktične nastave i mentor studentima na tri kursa u okviru predmeta biljne fiziologije.

Od 2001. do 2005. je bila zaposlena u kompaniji “InPheno” pri Institutu za medicinsku Mikrobiologiju Univerziteta u Bazelu (Institut für medizinische Mikrobiologie, Basel, Schweiz) kao Šef laboratorije za fentotipsko testiranje rezistencije kliničkih izolata virusa humane imunodeficijencije (HIV).

Od 2005. je radila kao istraživač u farmaceutskoj kompaniji Novartis (Novartis) na Institutu za biomedicinska istraživanja (NIBR) u ranoj fazi ispitivanja novih lekova upotrebom *S. cerevisiae* kao model organizma, a zatim na kliničkim ispitivanjima onkoloških lekova za ciljanu terapiju: RAD001 (Afinitor) i Ceritinib (Zykadia) na uznapredovalom mikro i makrocelularnom kanceru pluća i jetre.

Doktorske studije na Biološkom fakultetu, Katedra za Mikrobiologiju, Instituta za Botaniku, upisala je 2011. godine.

Od 2015. je zaposlena u firmi PIQR Therapeutics kao senior istraživač na kliničkom ispitivanju delovanja dualnog PI3K/mTOR inhibitora PQR309 (bimiralisib) na HER2 negativan kancer dojke.

Učestvovala je na mnogobrojnim konferencijama u inostranstvu, uglavnom u organizaciji Evropskog društva za medicinsku onkologiju (ESMO) čiji je i član.

Do sada je publikovala 7 radova u naučnim časopisima i 7 na međunarodnim konferencijama.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Катарина Петровић-Булатовић

Број индекса /

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Развој високо аутоматизованих микротитарских тестова на *Saccharomyces cerevisiae* за детекцију једињења са анифунгалним и цитостатским дејством

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

У Београду, 15.12.2017

Потпис аутора

K. Petrol - Bulatovic

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Катарина Петровић-Булатовић

Број индекса /

Студијски програм /

Наслов рада Развој високо аутоматизованих микротитарских тестова на *Saccharomyces cerevisiae* за детекцију једињења са анифунгалним и цитостатским дејством

Ментор Проф. др Бранка Вуковић-Гачић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањења у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 15.12.2017



Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Развој високо аутоматизованих микротитарских тестова на *Saccharomyces cerevisiae* за детекцију једињења са анифунгалним и цитостатским дејством

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 15.12.2017



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.