

Metody badania aktywności leków w warunkach *in vitro*

Materiały dla studentów farmacji

Rok akademicki 2017/2018

Semestr letni

Wersja dokumentu: 1.5

Zasady dotyczące przygotowania prezentacji

- czas prezentacji: od 10 do 15 min (plus dodatkowe 15 min na dyskusję)
- w prezentacji należy przedstawić wyznaczoną technikę badawczą, która może być używana do badania aktywności leków w warunkach *in vitro*; wiele z technik, które będą omawiane na zajęciach można wykorzystać w różnego rodzaju badaniach, ale należy pamiętać, że celem prezentacji jest przedstawienie techniki w kontekście badania leków
- do każdego tematu przypisano dwa typy publikacji: (1) publikacje metodyczne skupiające się na technicznych aspektach danej techniki badawczej (zasada działania, wymagania, protokół badania itp.), (2) publikacje badawcze, w których wykorzystano daną technikę do rozwiązywania problemu badawczego
- na podstawie publikacji metodycznej należy omówić przede wszystkim zasadę działania omawianej techniki badawczej; szczegóły będą się różnić w zależności od techniki, ale w większości przypadków należy omówić:
 - przebieg reakcji chemicznej
 - badane zjawisko fizyczne
 - mierzoną wartość i jej jednostkę
 - kluczowe odczynniki i/lub aparaturę
 - przebieg doświadczenia
 - jak na mierzony parametr wpływa obecność substancji aktywnej/leku
 - kontrolę pozytywną/negatywną
 - konieczność stosowania znaczników (lub jej brak)
 - typ testu (w czasie rzeczywistym/typu end-point)
 - przewagi techniki nad alternatywnymi metodami
 - wady/nietypowe wymagania
 - warianty metody, potencjalne zastosowania
 - możliwość automatyzacji/multipleksowania
- nie należy streszczać publikacji badawczej (publikacji zawierającej przykład zastosowania techniki); należy natomiast nakreślić problem badawczy, z którym zmagali się autorzy pracy oraz wyjaśnić w jaki sposób zastosowanie omawianej techniki badawczej pomogło go rozwiązać; mile widziane będą tu ilustracje z publikacji, które przedstawiają wyniki uzyskane omawianą techniką (wykresy z danymi, zdjęcia mikroskopowe)
- dostęp do niektórych publikacji można uzyskać jedynie z komputerów należących do sieci akademickiej (np.: w bibliotece), za pośrednictwem [zdalnego dostępu](#) lub po utworzeniu bezpłatnego konta na portalu [researchgate.net](#)
- jeżeli pojawią się problemy z dostępem do publikacji (nie działający link) należy jak najszybciej skontaktować się z prowadzącym
- przygotowując prezentację można wykorzystywać inne źródła niż podane publikacje (w niektórych przypadkach może być to wręcz niezbędne)
- integralną częścią prezentacji jest dyskusja; prezentacja, która nie wywołuje dyskusji nie będzie dobrze oceniana
- dobra prezentacja pozostawi u słuchaczy ślad w pamięci w postaci przynajmniej krótkiej *take-home message*
- treści poruszane w trakcie prezentacji będą stanowiły podstawę do stworzenia pytań na test zaliczeniowy

1 Test inkorporacji znakowanej radioaktywnie tymidyny (thymidine incorporation assay) w badaniu proliferacji komórek

1.1 Publikacja metodyczna

Goncharova EA i wsp. [Assays for in vitro monitoring of proliferation of human airway smooth muscle \(ASM\) and human pulmonary arterial vascular smooth muscle \(VSM\) cells](#). Nat Protoc. 2006;1(6):2905-8.

1.2 Publikacja badawcza

Toll L i wsp. [β₂-adrenergic receptor agonists inhibit the proliferation of 1321N1 astrocytoma cells](#). J Pharmacol Exp Ther. 2011 Feb; 336(2): 524–532.

1.3 Dodatkowe wymagania, wskazówki, źródła

- [materiały dodatkowe](#)

2 Testy redukcji soli tetrazolowych: MTT i MTS

2.1 Publikacja metodyczna

Riss TL i wsp. [Cell viability assays. Assay guidance manual](#). Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.

2.2 Publikacja badawcza

Strzemski M i wsp. [In vitro antiproliferative activity of extracts of *Carlina acaulis* subsp. *caulescens* and *Carlina acanthifolia* subsp. *utzka*](#). Front Pharmacol. 2017 Jun 13;8:371. doi: 10.3389/fphar.2017.00371. eCollection 2017.

2.3 Dodatkowe wymagania, wskazówki, źródła

- porównać techniki MTT i MTS

3 Test żywotności w czasie rzeczywistym RealTime-Glo

3.1 Publikacja metodyczna

Riss TL i wsp. [Cell viability assays. Assay guidance manual](#). Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.

3.2 Publikacja badawcza

Duellman SJ i wsp. [Bioluminescent, nonlytic, real-time cell viability assay and use in inhibitor screening](#). Assay Drug Dev Technol. 2015 Oct;13(8):456-65. doi: 10.1089/adt.2015.669. Epub 2015 Sep 18.

3.3 Dodatkowe wymagania, wskazówki, źródła

- omówić przewagi testu RealTime-Glo nad konwencjonalnymi testami takimi jak MTT/MTS
- strona producenta testu zawiera ładne [animacje](#), które można wykorzystać w prezentacji

4 Scratch assay, wound healing assay (test leczenia ran *in vitro*)

4.1 Publikacje metodyczne

Liang CC i wsp. [In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro](#). Nat Protoc. 2007;2(2):329-33.

Jonkman JE i wsp. [An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy](#). Cell Adh Migr. 2014;8(5):440-51. doi: 10.4161/cam.36224.

4.2 Publikacja badawcza

Wnorowski A i wsp. [Activation of \$\beta_2\$ -adrenergic receptor by \(R,R'\)-4'-methoxy-1-naphthylfenoterol inhibits proliferation and motility of melanoma cells](#). Cell Signal. 2015 May;27(5):997-1007. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.02.012. Epub 2015 Feb 20.

[Suplement](#) do powyżej publikacji

4.3 Dodatkowe wymagania, wskazówki, źródła

- podano dwie publikacje metodyczne, głównie ze względu na potencjalnie interesujące ilustracje w nich obecne
- suplement do publikacji badawczej zawiera zdjęcia mikroskopowe, które nie zmieściły się w głównej części pracy

5 Boyden chamber assay/transwell migration assay (badanie migracji/inwazji w komorach Boydena)

5.1 Publikacje metodyczne

Goncharova EA i wsp. [Assays for in vitro monitoring of human airway smooth muscle \(ASM\) and human pulmonary arterial vascular smooth muscle \(VSM\) cell migration](#). Nat Protoc. 2006;1(6):2933-9.

Albini A i wsp. [A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells](#). Cancer Res. 1987 Jun 15;47(12):3239-45.

5.2 Publikacja badawcza

Ogasawara M i wsp. [Screening of natural compounds for inhibitory activity on colon cancer cell migration](#). Biol Pharm Bull. 2001 Jun;24(6):720-3.

5.3 Dodatkowe wymagania, wskazówki, źródła

- ładne [obrazki](#) znajdują się na stronie jednego z producentów komór
- pokazać zdjęcia mikroskopowe
- [oryginalna praca](#) Boydena

6 Badanie migracji i inwazji komórek w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem systemu xCELLigence

6.1 Publikacja metodyczna

Bird C i Kirstein S. [Real-time, label-free monitoring of cellular invasion and migration with the xCELLigence system](#). Nature Methods, August 2009.

6.2 Publikacja badawcza

Wnorowski A i wsp. [Activation of \$\beta_2\$ -adrenergic receptor by \(R,R'\)-4'-methoxy-1-naphthylfenoterol inhibits proliferation and motility of melanoma cells](#). Cell Signal. 2015 May;27(5):997-1007. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.02.012. Epub 2015 Feb 20.

[Suplement](#) do powyżej publikacji

6.3 Dodatkowe wymagania, wskazówki, źródła

- suplement do publikacji badawczej zawiera wykresy, które nie zmieściły się w głównej części pracy
- potencjalnie przydatna [ilustracja](#)
- potencjalnie przydatne materiały [wideo](#)
- jeszcze jeden potencjalnie przydatny materiał [wideo](#)

7 Microscale thermophoresis (MST)

7.1 Publikacja metodyczna

Jerabek-Willemsen M i wsp. [MicroScale Thermophoresis: interaction analysis and beyond](#). Journal of Molecular Structure. Volume 1077, 5 December 2014, Pages 101-113

7.2 Publikacja badawcza

Linke P i wsp. [An automated microscale thermophoresis screening approach for fragment-based lead discovery](#). J Biomol Screen. 2016 Apr;21(4):414-21. doi: 10.1177/1087057115618347. Epub 2015 Dec 2.

7.3 Dodatkowe wymagania, wskazówki, źródła

- co jest źródłem fluorescencji przy pomiarach oddziaływań białko-lek metodą MST?

8 Differential scanning fluorimetry (DSF); inne nazwy: thermofluor assay, thermal shift assay

8.1 Publikacja metodyczna

Niesen FH i wsp. [The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability](#). Nat Protoc. 2007;2(9):2212-21.

8.2 Publikacja badawcza

Breuer S i wsp. [Identification of HIV-1 inhibitors targeting the nucleocapsid protein](#). J Med Chem. 2012 Jun 14;55(11):4968-77. doi: 10.1021/jm201442t. Epub 2012 May 24.

8.3 Dodatkowe wymagania, wskazówki, źródła

- jaki sprzęt jest niezbędny do przeprowadzenia badania techniką DSF?
- jak zmienia się wykres intensywności fluorescencji od czasu dla samego badanego białka (próba kontrola) w stosunku do białka z ligandem (próba badana/pozytywna)?

9 Chromatografia powinowactwa

9.1 Publikacja metodyczna

Moaddel R i wsp. [The preparation and development of cellular membrane affinity chromatography columns](#). Nat Protoc. 2009;4(2):197-205. doi: 10.1038/nprot.2008.225.

9.2 Publikacja badawcza

Ciesla L i wsp. [Development and characterization of the \$\alpha 3\beta 4\alpha 5\$ nicotinic receptor cellular membrane affinity chromatography column and its application for on line screening of plant extracts](#). J Chromatogr A. 2016 Jan 29;1431:138-144. doi: 10.1016/j.chroma.2015.12.065. Epub 2015 Dec 29.

9.3 Dodatkowe wymagania, wskazówki, źródła

- kluczowe ilustracje: Fig. 1a oraz Fig. 3 z publikacji opisującej technikę
- jak zbudowany jest receptor nikotynowy?

10 Western blotting w badaniach kinomu

10.1 Publikacja metodyczna

Kurien B.T. i Scofield R.H. [Western blotting](#). Methods. 2006 Apr;38(4):283-93.

10.2 Publikacja badawcza

Wnorowski i wsp. [Concurrent activation of \$\beta\$ 2-adrenergic receptor and blockage of GPR55 disrupts pro-oncogenic signaling in glioma cells](#). Cell Signal. 2017 Aug;36:176-188. doi: 10.1016/j.cellsig.2017.05.006. Epub 2017 May 8.

10.3 Dodatkowe wymagania, wskazówki, źródła

- zastosowanie western blottingu w badaniu wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnałów oraz kinaz wewnątrzkomórkowych
- jak produkuje się przeciwciała?
- [materiały](#) na stronie jednego z producentów przeciwciał
- przeciwciała rozpoznające motywy; technologia [kinome view](#)

11 PhosphoScan PTMScan (LC-MS/MS w badaniach kinomu)

11.1 Publikacja metodyczna

- Silva J i wsp. [PTMScan Technology - A Proteomics Method for Identifying and Quantifying Changes in Post-translational Modifications](#). PTMScan Proteomics Technology Video Tutorial.

11.2 Publikacja badawcza

- Moritz A i wsp. [Akt-RSK-S6 kinase signaling networks activated by oncogenic receptor tyrosine kinases](#). Sci Signal. 2010 Aug 24;3(136):ra64. doi: 10.1126/scisignal.2000998.

11.3 Dodatkowe wymagania, wskazówki, źródła

- zamiast publikacji metodycznej należy wykorzystać zalinkowane nagranie wideo
- strona producenta zawiera potencjalnie interesujące [schematy](#)

12 Alpha Screen Surefire

12.1 Publikacja metodyczna

Eglen RM i wsp. [The use of AlphaScreen technology in HTS: current status](#). Curr Chem Genomics. 2008 Feb 25;1:2-10. doi: 10.2174/1875397300801010002.

12.2 Publikacja badawcza

Anavi-Goffer S i wsp. [Modulation of L- \$\alpha\$ -lysophosphatidylinositol/GPR55 mitogen-activated protein kinase \(MAPK\) signaling by cannabinoids](#). J Biol Chem. 2012 Jan 2;287(1):91-104. doi: 10.1074/jbc.M111.296020. Epub 2011 Oct 25.

12.3 Dodatkowe wymagania, wskazówki, źródła

- zasada działania techniki Alpha Screen w kontekście pomiaru przekaźników drugorzędowych (np.: cAMP) oraz aktywności kinaz komórkowych
- przekazywanie sygnałów zależne od receptora GPR55: kinazy ERK1/2

13 Radioligand binding assay – badanie powinowactwa liganda do receptora

13.1 Publikacja metodyczna

Flanagan CA. [GPCR-radioligand binding assays](#). Methods Cell Biol, 132, 191-215. 2016.

13.2 Publikacja badawcza

Plazinska i wsp. [Comparative molecular field analysis of fenoterol derivatives interacting with an agonist-stabilized form of the \$\beta\$ 2-adrenergic receptor](#). Bioorg Med Chem. 2014 Jan 1;22(1):234-46. doi: 10.1016/j.bmc.2013.11.030. Epub 2013 Nov 23.

13.3 Dodatkowe wymagania, wskazówki, źródła

- n/d

14 Badanie internalizacji receptorów błonowych przy użyciu fluorescencyjnie znakowanych ligandów

14.1 Publikacja metodyczna

Daly CJ i wsp. [Fluorescent ligand binding reveals heterogeneous distribution of adrenoceptors and 'cannabinoid-like' receptors in small arteries](#). Br J Pharmacol. 2010 Feb;159(4):787-96. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00608.x. Epub 2010 Feb 5.

14.2 Publikacja badawcza

Paul RK i wsp. [\(R,R'\)-4'-methoxy-1-naphthylfenoterol targets GPR55-mediated ligand internalization and impairs cancer cell motility](#). Biochem Pharmacol. 2014 Feb 15;87(4):547-61. doi: 10.1016/j.bcp.2013.11.020. Epub 2013 Dec 16.

14.3 Dodatkowe wymagania, wskazówki, źródła

- mikroskopia konfokalna jako metoda obrazowania receptorów błonowych oraz procesu ich internalizacji
- internalizacja GPCR-ów jako efekt ich aktywacji i przekazywania sygnałów zależnego od β -arrestyny
- T1117 jako ligand/marker fluorescencyjny dla receptora GPR55
- rola receptora GPR55 w organizmie; receptor GPR55 jako cel molekularny dla leków

15 PathHunter β -Arrestin Assay w badaniach receptorów z rodziny GPCR

15.1 Publikacja metodyczna

- Wang T i wsp. [Measurement of \$\beta\$ -Arrestin Recruitment for GPCR Targets](#). Assay Guidance Manual. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.

15.2 Publikacja badawcza

- Yin H i wsp. [Lipid G protein-coupled receptor ligand identification using beta-arrestin PathHunter assay](#). J Biol Chem. 2009 May 1;284(18):12328-38. doi: 10.1074/jbc.M806516200. Epub 2009 Mar 13.

15.3 Dodatkowe wymagania, wskazówki, źródła

- receptory sprzężone z białkiem G (GPCR-y) i przekazywanie sygnałów zależne od β -arrestyny
- badanie aktywności agonistów i antagonistów
- strona producenta zawiera potencjalnie interesujące [materiały](#)

16 Isothermal titration calorimetry (ITC), izotermiczne miareczkowanie kalorymetryczne

16.1 Publikacja metodyczna

Leavitt S i Freire E. [Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry](#). Curr Opin Struct Biol. 2001 Oct;11(5):560-6.

16.2 Publikacja badawcza

Draczkowski P i wsp. [Determination of affinity and efficacy of acetylcholinesterase inhibitors using isothermal titration calorimetry](#). Biochim Biophys Acta. 2016 May;1860(5):967-974. doi: 10.1016/j.bbagen.2015.11.006. Epub 2015 Nov 14.

16.3 Dodatkowe wymagania, wskazówki, źródła

- jakie parametry oddziaływania lek-cel molekularny można wyznaczyć przy pomocy ITC?
- jaki parametr fizyczny mierzymy w eksperymencie ITC?