

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATARINA NEMEC

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



KATARINA NEMEC

**PREUČEVANJA VLOGE
PROSTAGLANDINSKEGA RECEPTORJA EP4
PRI BOLNIKI S KRONIČNO LIMFOCITNO LEVKEMIJO**

**THE ROLE OF THE PROSTAGLANDIN EP4 RECEPTOR
IN PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za klinično biokemijo pod mentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič Raščan, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Alenke Šmid.

ZAHVALA

*Za mentorstvo pri izdelavi magistrske naloge se iskreno zahvaljujem mentorici **prof. dr. Ireni Mlinarič-Raščan**. Hvala za vzpodbudo, ki je oživila moj raziskovalni duh in omogočila izmenjavo na Dunaju.*

*Velika zahvala gre somentorici **asist. dr. Alenki Šmid**, ki mi je s strokovnimi nasveti in dobro voljo pomagala pri delu v laboratoriju ter pri pisanju magistrske naloge.*

*Zahvaljujem se tudi **Tijani Markovič** za njen čas, pomoč in motivacijo pri uvajanju, eksperimentalnem delu ter pisanju magistrske naloge. Hvala za meritve in analizo na pretočnem citometru.*

*Hvala **vsem donorjem** vzorcev za sodelovanje v klinični študiji.*

*Sošolki **Tjaši Štolfa**, predhodnici **Maši Vidmar** in **vsem ostalim iz Katedre za klinično biokemijo** hvala, ker so vedno radi priskočili na pomoč.*

*Nenazadnje hvala tudi **moji čudoviti družini** za vso potrpežljivost tekom študija.*

*Hvala **vsem prijateljem** iz rodnega Prekmurja, študijske Ljubljane, počitniške Baške ter izmenjav v Bonnu, na Dunaju, v Berlinu in v Gradcu, ki so sooblikovali moja študijska leta.*

Hvala podjetju Krka d.d. za podelitev štipendije in vsem ostalim štipendijam, ki so mi omogočile kvaliteten študij.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič-Raščan, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Alenke Šmid.

Katarina Nemeč

Komisija za zagovor

Predsednik komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin / prof. dr. Aleš Obreza

Mentorica: prof. dr. Irena Mlinarič Raščan

Somentorica: asist. dr. Alenka Šmid

Član komisije: doc. dr. Izidor Sosič

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	IV
KAZALO SLIK	VII
KAZALO ENAČB	VI
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
POVZETEK	VIII
ABSTRACT	IX
GRAFIČNI POVZETEK	X
GRAPHICAL ABSTRACT	XI
SEZNAM OKRAJŠAV	XII
1. UVOD	1
1.1. KRONIČNA LIMFOCITNA LEVKEMIJA (KLL).....	1
1.1.1. Genetski dejavniki.....	2
1.1.2. Diagnoza.....	3
1.1.3. Prognoza.....	4
1.1.4. Zdravljenje	5
1.2. PROSTAGLANDINSKI RECEPTOR EP4.....	8
1.2.1. Deregulacija signalnih poti pri KLL	10
1.2.2. Mutacije gena za receptor EP4.....	12
1.2.3. Ekspresija receptorja EP4.....	14
1.3. MODULATORJI RECEPTORJA EP4	15
2. NAMEN DELA	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1. METODE DELA S CELICAMI.....	17
3.1.1. Materiali in oprema	17
3.1.2. Mediji	18
3.1.3. Zbiranje vzorcev.....	18
3.1.4. Izolacija limfocitov B iz polne krvi.....	18
3.1.5. Celični laboratorij.....	20
3.1.6. Štetje celic	20
3.2. DOLOČANJE EC ₅₀ VREDNOSTI	20
3.2.1. Izpostavitve celic PgE ₁ -OH in test metabolne aktivnosti.....	20
3.3. PRETOČNA CITOMETRIJA	22
3.3.1. Materiali in oprema	22
3.3.2. Analiza ekspresije receptorja EP4 po izpostavitvi spojinam.....	23
3.4. GENOTIPIZACIJA	24
3.4.1. Materiali in oprema	24
3.4.2. Izolacija DNA iz limfocitov B	25
3.4.3. Merjenje koncentracije DNA in redčenje DNA	25
3.4.4. Določanje genotipov z analizo talilne krivulje DNA	25

3.5.	ANALIZA IZRAŽANJA GENOV.....	28
3.5.1.	Materiali in oprema	28
3.5.2.	Izolacija RNA iz limfocitov B.....	29
3.5.3.	Obratno prepisovanje	30
3.5.4.	Kvantitativni PCR v realnem času	30
3.5.5.	Standardizacija na referenčni gen.....	32
3.6.	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV.....	33
3.6.1.	Hardy Weinbergovo načelo (HW načelo).....	33
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA	34
4.1.	CELICE KLL SMO IZOLIRALI S POSTOPKOM ROSETTESEP®.....	34
	I. IN VITRO VREDNOTENJE UČINKOVITOSTI PGE₁-OH	35
4.2.	SPOJINA PGE ₁ -OH IMA CITOTOKSIČEN UČINEK NA IZOLIRANE CELICE KLL, KI JE ČASOVNO ODVIŠEN.....	35
4.3.	CITOTOKSIČNI UČINKI PGE ₁ -OH SO KONCENTRACIJSKO ODVISNI.....	36
4.4.	INTER-INDIVIDUALNA VARIABILNOST V ODZIVU NA PGE ₁ -OH	37
4.4.1.	PgE ₁ -OH je bolj citotoksičen pri celicah moških bolnikov s KLL.....	38
4.4.2.	Delovanje PgE ₁ -OH je neodvisno od starosti.....	39
	II. GENOTIPIZACIJA	40
4.5.	ANALIZA POLIMORFIZMOV RS4495224 IN RS7720838.....	40
4.5.1.	Polimorfizma rs4495224 in rs7720838 sta v skladu s HWE.....	43
4.5.2.	Pojavnost polimorfizmov v slovenski skupini bolnikov se ne razlikuje od drugih populacij	43
4.5.3.	Pojavnost določenega genotipa ni povezana z večjo pojavnostjo KLL	45
4.5.4.	Pojavnost polimorfizmov je neodvisna od spola.....	45
4.5.5.	PgE ₁ -OH je bolj citotoksičen pri nosilcih alela A (rs4495224).....	46
	III. VREDNOTENJE IZRAŽANJA RECEPTORJA EP4	48
4.6.	ANALIZA EKSPRESIJE RECEPTORJA NA NIVOJU MRNA	48
4.6.1.	Višja ekspresija gena Ptger4 je značilna za moške bolnike s KLL	49
4.6.2.	Ekspresije gena Ptger4 ni odvisna od starosti	51
4.6.3.	Višja ekspresija gena Ptger4 je značilna za homozigote AA (rs4495224).....	52
4.6.4.	Med povečano ekspresijo gena Ptger4 in nižjim vrednostmi EC ₅₀ PGE ₁ -OH obstaja korelacija.....	54
4.7.	ANALIZA EKSPRESIJE RECEPTORJA S PRETOČNO CITOMETRIJO.....	55
4.7.1.	Receptor EP4 je izražen na celicah KLL in njegova ekspresija je ohranjena po postavitvi spojinam.....	55
5.	SKLEPI.....	56
6.	LITERATURA	I
7.	PRILOGE	VIII

KAZALO SLIK

SLIKA 1: GRAFIČNI PRIKAZ RAZMAZA KRVI ZDRAVIH DAROVALCEV V PRIMERJAVI Z BOLNIKI S KLL.	1
SLIKA 2: SIGNALNE POTI RECEPTORJEV EP1-4.	8
SLIKA 3: SIGNALNE POTI, KI SE LAHKO AKTIVIRAJO PO VEZAVI AGONISTA PGE ₂ NA RECEPTOR EP4.	10
SLIKA 4: PRIKAZ KROMOSOMA 5.	13
SLIKA 5: A) PGE ₂ (DINOPROSTON), B) PGE ₁ -OH IN C) RIVENPROST (ONO-4819).	15
SLIKA 6: PREMREŽENJE ERITROCITOV S TETRAMERNIM KOMPLEKSOM PROTITELES IN NEŽELENI MI CELICAMI.	18
SLIKA 7: LOČITEV NEZAŽELEIH CELIC OD LIMFOCITOV B.	18
SLIKA 8: POSTOPEK IZOLACIJE LIMFOCITOV B.	19
SLIKA 9: HEMOCITOMETER.	20
SLIKA 10: MITOHONDRIJSKE REDUKTAZE SO SPOSOBNE MODER RESAZURIN REDUCIRATI V ROZARDEČ RESORUFIN.	21
SLIKA 11: PRIKAZ RAZLIČNIH GRAFOV HRM ANALIZE V ODVISNOSTI OD TEMPERATURE.	26
SLIKA 12: PRINCIP POMNOŽEVANJA DVEH UPORABLJENIH NAČINOV DETEKCIJE PCR PRODUKTOV – TAQMAN® SONDE TER SYBR® GREEN BARVILO.	31
SLIKA 13: EC ₅₀ VREDNOSTI BOLNIKOVIH CELIC 24 H IN 48 H PO IZPOSTAVITVI PGE ₁ -OH.	36
SLIKA 14: CITOTOKSIČNI UČINEK PGE ₁ -OH JE KONCENTRACIJSKO ODVISEN.	37
SLIKA 15: CITOTOKSIČNI UČINEK PGE ₁ -OH IN VITRO JE IZRAZITEJŠI PRI MOŠKI KOT PRI ŽENSKI POPULACIJI IN VITRO.	38
SLIKA 16: UČINEK AGONISTA PGE ₁ -OH IN VITRO JE NEODVISEN OD STAROSTI.	39
SLIKA 17: NOSILCI ALELA A SO BOLJ OBČUTLJIVI NA SPOJINO PGE ₁ -OH KOT NEMUTIRANIMI HOMOZIGOTI CC.	47
SLIKA 18: EKSPRESIJA GENA PTGER4, KI KODIRA RECEPTOR EP4 JE ZNAČILNO VEČJA PRI CELICAH KLL MOŠKIH DAROVALCEV V PRIMERJAVI Z ŽENSKIMI.	50
SLIKA 19: EKSPRESIJA GENA PTGER4 V ODVISNOSTI OD STAROSTI.	52
SLIKA 20: EKSPRESIJA GENA PTGER4 JE VEČJA PRI MUTIRANIH HOMOZIGOTIH AA KOT PRI NOSILCIH ALELA C.	53
SLIKA 21: EKSPRESIJA GENA PTGER4 GLEDE NA GENOTIP IN SPOL.	53
SLIKA 22: STATISTIČNO ZNAČILNA KORELACIJA MED VIŠJO EKSPRESIJO PTGER4 IN NIŽJIMI EC ₅₀ BI LAHKO NAKAZOVALA NA TO, DA SPOJINA PGE ₁ -OH RES DELUJE PREKO AKTIVACIJE SIGNALNIH POTI RECEPTORJA EP4.	54
SLIKA 23: HISTOGRAMI PRIKAZUJEJO MFI, KI ODRAŽA EKSPRESIJO RECEPTORJA EP4.	55

KAZALO ENAČB

ENAČBA 1: ENAČBA ZA RAČUNANJE KONCENTRACIJE CELIC S HEMOCITOMETROM.	20
ENAČBA 2: IZRAČUN METABOLNE AKTIVNOSTI CELIC.	21
ENAČBA 3-7: ENAČBE ZA IZRAČUN ALELNIH FREKVENC.	33

KAZALO PREGLEDNIC

PREGLEDNICA I: GENETSKI DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA RAZVOJ KLL.....	2
PREGLEDNICA II: NAJPOGOSTEJŠI DIAGNOSTIČNI PRISTOPI PRI KLL.	3
PREGLEDNICA III: DVA RAZLIČNA SISTEMA ZA RAZVRSTITEV PACIETOV PRI KLL.....	4
PREGLEDNICA IV: FAKTORJI, KI NAPOVEDUJEJO SLABO PROGNOZO PRI KLL..	5
PREGLEDNICA V: NAJPOGOSTEJE UPORABLJENE SCHEME ZA ZDRAVLJENJE KLL V SLOVENIJI.	7
PREGLEDNICA VI: SEZNAM MATERIALOV IN APARATUR, POTREBNIH ZA DELO S CELICAMI.	17
PREGLEDNICA VII: SEZNAM MATERIALOV IN APARATUR, POTREBNIH ZA DELO S PRETOČNIM CITOMETROM.	22
PREGLEDNICA VIII: SEZNAM MATERIALOV IN APARATUR, POTREBNIH ZA GENOTIPIZACIJO.	24
PREGLEDNICA IX: SESTAVA REAKCIJSKE ZMESI ENEGA VZORCA ZA PCR IN HRM ANALIZO.....	27
PREGLEDNICA X: PROGRAM IZVEDBE PCR IN HRM ANALIZE.	28
PREGLEDNICA XI: SEZNAM MATERIALOV IN APARATUR, POTREBNIH ZA ANALIZO IZRAŽANJA GENOV.	28
PREGLEDNICA XII: POGOJI REKACIJE PREPISOVANJA RNA V CDNA.....	30
PREGLEDNICA XIII: SESTAVA REAKCIJSKE ZMESI ENEGA VZORCA ZA OBRATNI PREPIS.	30
PREGLEDNICA XIV: SESTAVA REAKCIJSKE ZMESI VZORCA ZA PCR ANALIZO PRI ANALIZI GENOV PTGER4, GADPH, RPLP0.	31
PREGLEDNICA XV: PROGRAM IZVEDBE KVANTITATIVNE PCR ANALIZE ZA TAQMAN® SONDE	32
PREGLEDNICA XVI: PROGRAM IZVEDBE KVANTITATIVNE PCR ANALIZE ZA SYBR™ BARVILO. .	32
PREGLEDNICA XVII: POVPREČNE EC50 VREDNOSTI.	36
PREGLEDNICA XVIII: REZULTATI GENOTIPIZACIJE BOLNIKOV S KLL.....	40
PREGLEDNICA XIX: REZULTATI GENOTIPIZACIJA KONTROLNE SKUPINE ZDRAVIH PROSTOVOLJCEV.	42
PREGLEDNICA XX: REZULTATI OPAZOVANIH IN PRIČAKOVANIH VREDNOSTI FREKVENC SNP rs4495224 (C>A) IN SNP rs7720838 (G>T).	43
PREGLEDNICA XXI: FREKVENCE ALELOV SNP rs4495224 IN SNP rs7720838 PRI BOLNIKI S KLL (SLOVENIJA) IN BOLNIKI S CROHNOVO BOLEZNIJO (NEMČIJA).	44
PREGLEDNICA XXII: REZULTATI FREKVENC ALELOV SNP rs4495224 IN SNP rs7720838 V RAZLIČNIH POPULACIJAH GLEDE NA NOSILCE RIZIČNEGA ALELA A OZIROMA T TER PROTEKTIVNEGA ALELA C OZIROMA G.	44
PREGLEDNICA XXIII: ŠTEVILO NOSILCEV POSAMEZNEGA GENOTIPA OZIROMA ALELA ZA PREUČEVANA POLIMORFIZMA rs4495224 IN rs7720838.....	45
PREGLEDNICA XXIV: RAZPOREDITEV GENOTIPOV IZBRANIH SNP-JEV MED SPOLOMA.	46
PREGLEDNICA XXV: RAZPOREDITEV ALELOV IZBRANIH SNP-JEV MED SPOLOMA.	46
PREGLEDNICA XXVI: NORMIRANE VREDNOSTI EKSPRESIJE GENA PTGER4.	48

POVZETEK

Kronična limfocitna levkemija (KLL) je bolezen z izredno inter-individualno variabilnostjo, ki se odraža tako pri razvoju bolezni, prognozi kot odzivu na zdravlila. Gen *Ptger4*, ki kodira za receptor EP4, je bil označen za potencialni tumor-supresor gen, ekspresija tega pa je bila povišana na maligno spremenjenih limfocitih B. V predhodnih študijah je bila prikazana selektivna citotoksičnost modulatorja omenjenega receptorja PgE₁-OH na celicah KLL.

V pričujoči magistrski nalogi smo v sklopu klinične študije št. 93/12/10 raziskovali biokemijske in genetske dejavnike, ki bi lahko prispevali k bolj optimalni uporabi potencialne protirakave spojine PgE₁-OH. Na primarnih celicah KLL smo s farmakološkim pristopom preverjali citotoksičnost spojine PgE₁-OH in nato na podlagi izbranih polimorfizmov ter izražanja receptorja EP4 določili, pri katerih podskupinah pacientov je PgE₁-OH bolj učinkovit. Ovrednotili smo še, ali bi pojavnost polimorfizmov ali izražanja receptorja EP4 lahko predstavljala nov prognostični biomarker za KLL.

V predstavljeni nalogi smo analizirali nadaljnjih 75 vzorcev celic darovalcev s KLL in potrdili že prej prikazan citotoksični učinek PgE₁-OH *in vitro*. Učinek PgE₁-OH je bil časovno in koncentracijsko odvisen, vrednosti EC₅₀ (12,31 μM 24 h po izpostavitvi in 7,67 μM 48 h po izpostavitvi PgE₁-OH) pa so se skladale s predhodnimi raziskavami. Pri vrednotenju odziva na PgE₁-OH smo opazili inter-individualno variabilnost na več nivojih. Ugotovili smo, da obstaja spolno pogojena občutljivost na preiskovano spojino. Citotoksičen učinek je bil namreč bolj izrazit pri celicah moških darovalcev. Ti so večinska in hkrati bolj rizična skupina, saj imajo večje tveganje za razvoj KLL. Tudi njihov odziv na zdravljenje je slabši. Nadalje je imel PgE₁-OH bolj opazne citotoksične učinke pri nosilcih mutiranega alela A (rs4495224), ki predstavljajo 62 % bolnikov. Učinek PgE₁-OH ni bil odvisen od starosti preiskovancev.

Na celotni kohorti klinične študije (159 vzorcev) in vzorcih zdravih darovalcev (122 vzorcev) smo preverili pojavnosti polimorfizmov rs4495224 in rs7720838, ki se nahajata v bližini regulatorne regije gena *Ptger4* in vplivata na ekspresijo receptorja EP4. Te so bile v skladu s Hardy-Weinbergerjevim ravnotežjem in pojavnostjo pri zdravi ter drugih populacijah. Mutirani aleli/genotipi so se izražali neodvisno od spola in niso predstavljali statistično značilnega tveganja za KLL.

Pri vrednotenju izražanja receptorja EP4 na nivoju mRNA smo prav tako opazili inter-individualno variabilnost. Moški preiskovanci so imeli višjo ekspresijo, izraženost gena *Ptger4* pa je bila višja pri darovalcih z genotipom AA (rs4495224). Pri celicah darovalcev s povišano ekspresijo gena *Ptger4* smo zabeležili nižje vrednosti EC₅₀ za PgE₁-OH ter dokazali, da med njima obstaja korelacija.

Izražanje receptorja EP4 smo potrdili tudi na nivoju proteina z metodo pretočne citometrije. Ob tem smo pokazali, da izpostavitve celic KLL spojinama PGE₂ in PgE₁-OH ne spremeni izražanja preiskovanega receptorja, kar je obetaven podatek za potencialno terapijo.

Naše analize dopolnjujejo vedenje o vlogi receptorja EP4 pri KLL. Na podlagi farmakološkega pristopa, uporabe metod molekularne genetike ter pretočne citometrije smo skušali identificirati morebitne nove prognostične biomarkerje in napovedati učinkovitost potencialne protirakave spojine PgE₁-OH *in vitro*.

Ključne besede: kronična limfocitna levkemija (KLL), prostaglandinski receptor tipa 4 (EP4), PgE₁-OH, polimorfizmi, ekspresija receptorja, EC₅₀

ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a disease with high inter-individual variability, which is reflected in the development of the disease, prognosis and response to the therapy. Gene *Ptger4*, encoding the receptor EP4 was identified as a potential tumor suppressor gene and its expression was elevated on the malignantly transformed lymphocytes B. Previous studies demonstrated that PgE₁-OH had selective cytotoxic effect on the primary CLL cells. In this master thesis, which was performed in the context of a clinical study No. 93/12/10, biochemical and genetic factors which may contribute to the optimal use of the potential anti-cancer substance PgE₁-OH were studied. Cytotoxicity of the compounds PgE₁-OH was examined with the pharmacological approach on the cells of CLL patients. Furthermore, two selected polymorphisms and expressions of the receptor EP4 were determined. In the end we evaluated which subsets of patients could profit from a therapy with a potentially anticancer agent PgE₁-OH. We evaluated whether the incidence of the polymorphisms or EP4 receptor expression may represent new prognostic biomarkers for CLL.

With new 75 samples of CLL donors cells we confirmed previously displayed cytotoxic effects of PgE₁-OH *in vitro*. The effect of PgE₁-OH was time- and concentration-dependent with EC₅₀ values (12,31 μM 24 h after exposure and 7,67 μM 48 hours after exposure to PgE₁-OH), consistent with previous studies. In the evaluation of the response to PgE₁-OH we observed inter-individual variability on different levels. Firstly, we found that there is a sex-dependent sensitivity to the investigated substance. PgE₁-OH was more cytotoxic on the cells of male donors. Male patients represent the majority and, at the same time, a risk group. In addition, their response to the therapy is poorer. PgE₁-OH was significantly more cytotoxic toward the cells of the carriers of the mutated allele A (rs4495224), which represents 62 % of the patients. The effect of PgE₁-OH was not dependent on the age of the subjects.

The entire cohort of the clinical study (159 samples) as well as the samples of the healthy donors were genotyped for the single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs4495224 and rs7720838, located in the *Ptger4* expression-modulating region on chromosome 5p13. The allele frequencies of the SNPs were in accordance with the predicted Hardy-Weinberg equilibrium and the incidence in both healthy as well as other populations. Genetic variants were expressed independently of sex and did not show higher susceptibility for the CLL.

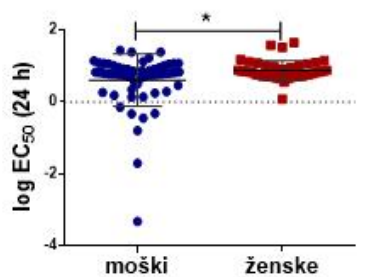
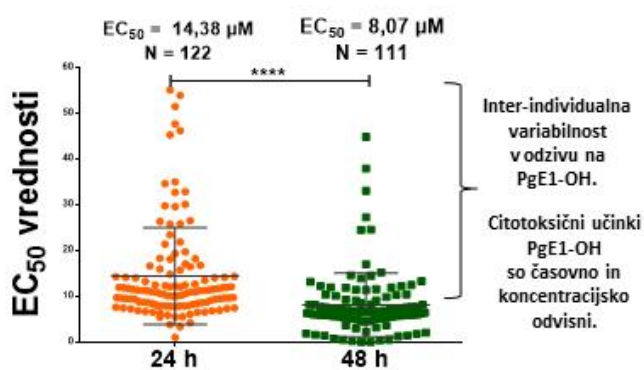
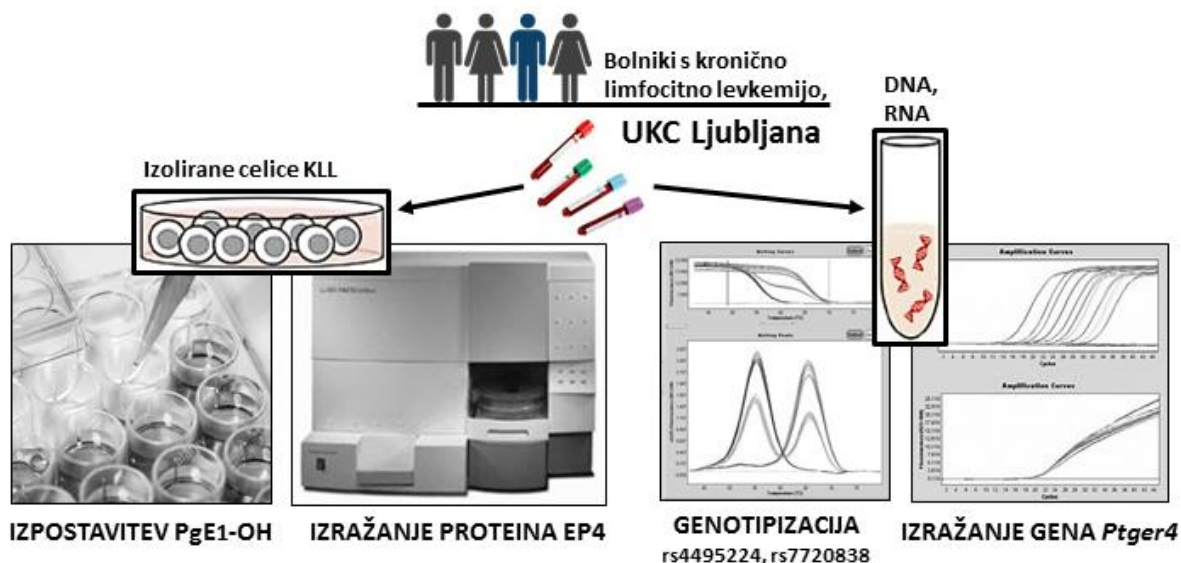
Evaluating the expression of the receptor EP4 on the mRNA level also revealed inter-individual variability. Male patients had higher expression of the *Ptger4* gene, as did the donors with the AA genotype (rs4495224). We proved the correlation between an increased expression of the *Ptger4* gene and lower EC₅₀ values.

Expression of EP4 receptor was also confirmed on the protein level with flow cytometry. We demonstrated that exposure of CLL cells to PGE₂ and PgE₁-OH does not alter the expression of the receptor EP4 – a promising fact for a potential therapy.

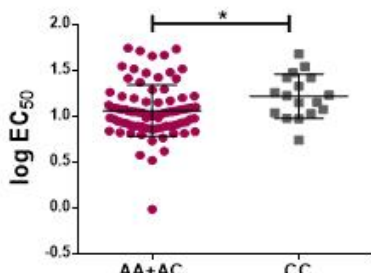
Our analysis offers a novel understanding of the role of EP4 receptor in CLL. Based on pharmacological approaches with methods of molecular genetic and flow cytometry we tried to identify new prognostic biomarkers and predict the efficacy of the potential anti-cancer substance PgE₁-OH *in vitro*.

Key words: chronic lymphocytic leukemia (CLL), prostaglandin receptor typ 4 (EP4), PgE₁-OH, polimorfisms, expression of receptor EP4, EC₅₀

GRAFIČNI POVZETEK



Celice KLL moških darovalcev so bolj občutljive na PgE1-OH.



Nositci rizičnega alela A so bolj občutljivi na PgE1-OH.

rs4495224

Genotip (%)		Alel (%)	
AA	38	A	62
AC	47	C	38
CC	15		
Zdravi	AA 36	A	66
Bolniki	AC 48	C	34
	CC 16		

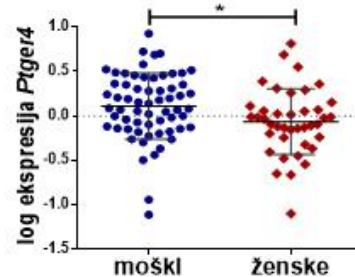
p = 0,9061 p = 0,6587

rs7720838

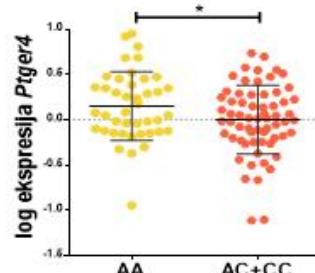
Genotip (%)		Alel (%)	
TT	32	T	56
GT	49	G	44
GG	19		
Zdravi	TT 35	T	54
Bolniki	GT 42	G	46
	GG 27		

p = 0,2434 p = 0,8870

Frekvence genotipov ter alelov bolnikov s KLL so v skladu s HWE, zdravo populacijo in drugimi študijami.



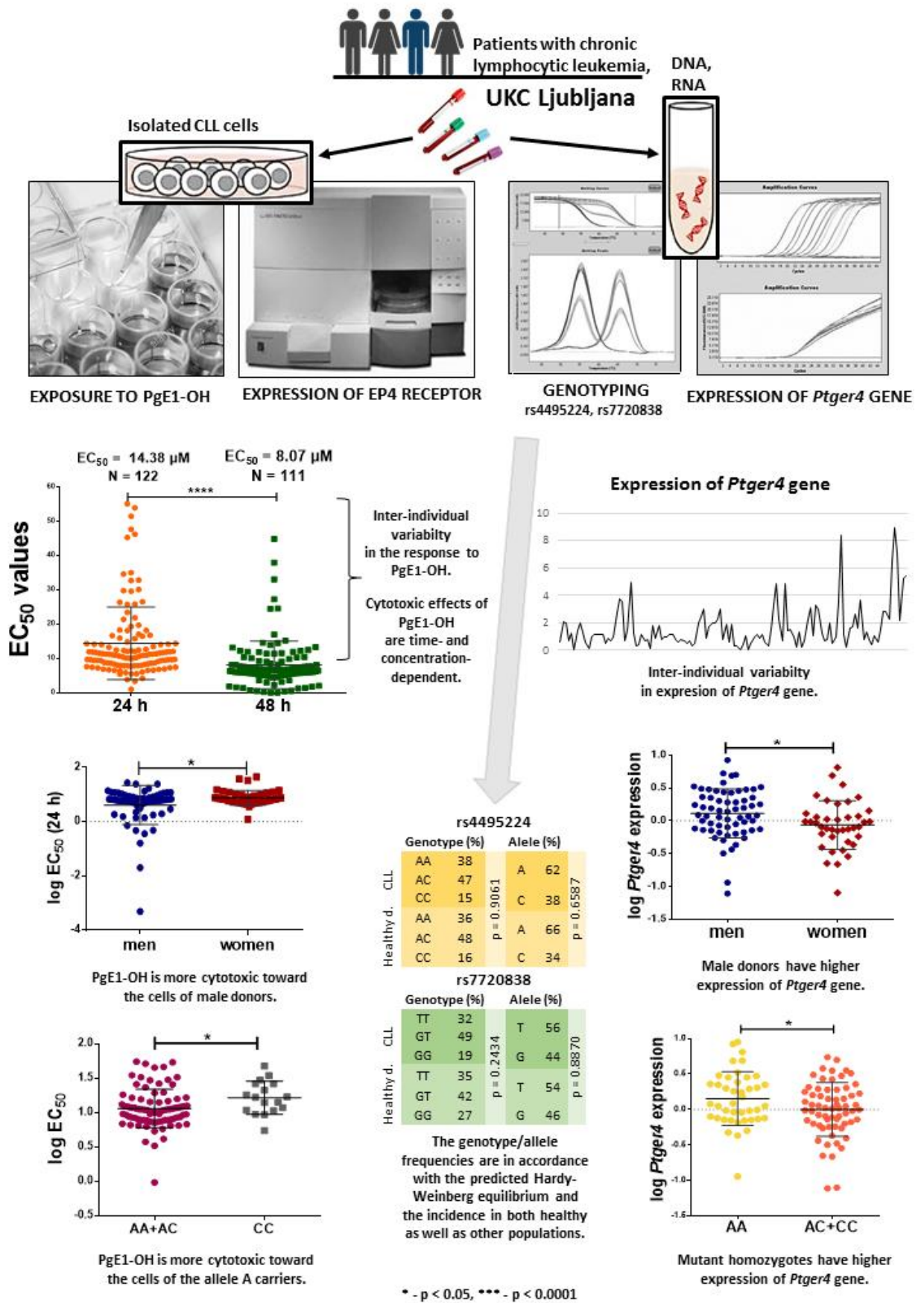
Moški darovalci imajo višjo ekspresijo gena *Ptger4*.



Mutirani homozigoti AA imajo višjo ekspresijo gena *Ptger4*.

* - p < 0,05, **** - p < 0,0001

GRAPHICAL ABSTRACT



SEZNAM OKRAJŠAV

ATM	ataksija-telangiektazija mutiran gen (<i>ang. ataxia-telangiectasia mutated</i>)
BCR	B-celični receptor
BSA	goveji serumski albumin (<i>angl. bovine serum albumine</i>)
cAMP	ciklični adenzin monofosfat
CCD	naprava s svetlobno občutljivim detektorjem (<i>ang. charge coupled device</i>)
CD	celični označevalec (<i>angl. cluster of differentiation</i>)
c-Myc	mielocitomatozni onkogen (<i>angl. myelocytomatosis oncogene</i>)
CREB	odzivni element za cAMP (<i>angl. cAMP response element binding protein</i>)
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EC₅₀	srednja efektivna koncentracija
EP4	prostaglandinski receptor E tipa 4
FBS	fetalni goveji serum (<i>angl. fetal bovine serum</i>)
FC	fludarabin, ciklofosfamid
FCR	fludarabin, ciklofosfamid, rituksimab
FISH	fluorescenčna in situ hibridizacija (<i>angl. fluorescence in situ hybridisation</i>)
FRET	fluorescenčni prenos resonančne energije (<i>ang. fluorescence resonance energy transfer</i>)
GWA	asociacijske študije na celotnem genomu (<i>angl. genome-wide association studies</i>)
HW	Hardy Weinbergovo načelo/ravnotežje (<i>ang. Hardy-Weinberg equilibrium</i>)
IGVH	gen variabilnega področja za težko verigo imunoglobulinov
IL	interlevkin
KLL	kronična limfocitna levkemija (<i>angl. chronic lymphocytic leukemia</i>)
KVČB	kronična vnetna črevesna bolezen
LCL	limfoblastoidne celične linije
MRD	minimalna preostala bolezen (<i>angl. minimal residual disease</i>)

MEK	mitogen aktivirana proteinska kinaza
MFI	povprečna intenziteta fluorescence (<i>angl. median fluorescence intensity</i>)
NF-κB	jedrni dejavnik kappa B (<i>angl. nuclear factor kappa B</i>)
PBS	fosfatni pufer
PCR	verižna reakcija s polimerazo (<i>angl. polymerase chain reaction</i>)
PDE	fosfodiesteraza (<i>angl. phosphodiesterase</i>)
PgE₁-OH	prostaglandin E ₁ alkohol
PGE₂	prostaglandin E ₂
PKA	protein kinaza A
Ptger4	gen, ki kodira receptor EP4
R-Ben	rituksimab, bendamustin
RNA	ribonukleinska kislina
SNP	polimorfizem posameznega nukleotida (<i>angl. single nucleotide polymorphism</i>)
Tm	temperatura taljenja (<i>angl. melting temperature</i>)
TNF-α	tumor nekrotizirajoči dejavnik α
UKCL	Univerzitetni klinični center Ljubljana

1. UVOD

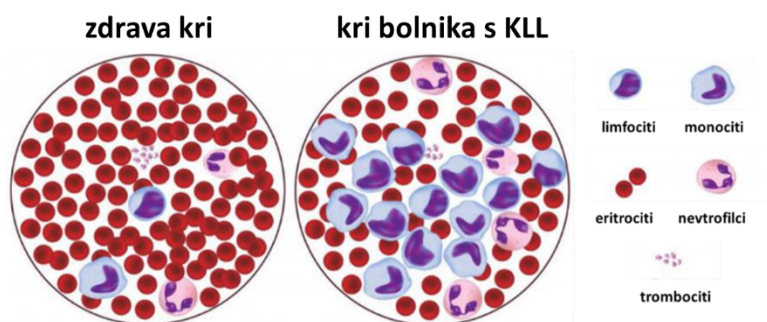
1.1. Levkemija

Rak je skupina več kot 100 različnih bolezni, ki lahko prizadenejo vsak del telesa. Skupna jim je nenormalna rast celic in potencial za širjenje v okoliška tkiva. Na globalnem nivoju je rak vzrok vsaj 16 % smrtim letno (1).

Levkemije spadajo v skupino hematoloških novotvorb - tumorjev krvotvornih in limfoidnih tkiv; ti prizadenejo kri, kostni mozeg in limfoidni sistem ter predstavljajo 2,6 % vseh primerov raka (2). Vrsta levkemije je lahko glede na klinično sliko, hitrost, invazivnost in histrost zdravljenja **akutna** ali **kronična**, glede na tip celic, iz katerih se razvije, pa **mieloična/mielocitna** ali **limfatična/limfocitna** (3).

1.1.Kronična limfocitna levkemija (KLL)

KLL predstavlja 11 % vseh rakavih krvnih bolezni ter 1,1 % vseh primerov raka in je tako **najpogostejši tip levkemije zahodnih držav pri odraslih** (4). Na Sliki 1 so grafično prikazani kloni limfocitov B, ki preplavijo kri bolnika s KLL.



Slika 1: Grafični prikaz razmaza krvi zdravih darovalcev v primerjavi z bolniki s KLL.
Zaradi genskih sprememb se začno limfociti B v kostnem mozgu nenadzorovano deliti, pri čemer nastanejo mnogoštevilčni kloni, ki izrivajo zdrave krvne celice (5). Slika povzeta po (6).

Tveganje za razvoj KLL je približno dvakrat večje za moške kot za ženske in narašča s starostjo, mediana diagnoze bolezni je med 70 in 72 leti. Razmerje med moškimi bolniki in ženskami bolnicami je 63 % : 37 % (7, 8). Incidenca v zahodnih državah je 6.8/100.000 moških in 3.5/100.000 žensk (9, 10). V Sloveniji zabeležijo letno 100 novih bolnikov (11). Družinska anamneza v povezavi z genetskimi faktorji prispeva k dovzetnosti za bolezen; 9 % bolnikov ima tudi sorodnika s KLL; bližnji sorodniki imajo kar 8,5-krat večje tveganje za razvoj bolezni (12). Med rizične faktorje za nastanek KLL so uvrstili izpostavljenost različnim kemikalijam (herbicidu Agent Orange, kmetijskim insekticidom), ni pa dokazov za povezanost z ionizirajočim sevanjem, virusi, načinom prehranjevanja ali življenjskim stilom (13).

1.1.1. Genetski dejavniki

Raznolikost regulatornih genskih mehanizmov, ki pripeljejo do zelo individualnih molekularnih fenotipov pri bolnikih s KLL, je izjemna. Karakterizacija teh posebnosti je pomembna za potrditev diagnoze, določitev prognoze ter izbiro ustrezne terapije. V Preglednici I so opisani najpomembnejši genetski dejavniki, ki vplivajo na oblikovanje raznovrstnih oblik bolezni.

*Preglednica I: Genetski dejavniki, ki vplivajo na razvoj KLL.
Povzeto po (13–18).*

Somatske mutacije	Kromosomske nepravilnosti	Mikro RNA (miRNA)	Epigenomska regulacija
<ul style="list-style-type: none">• tp53, ATM, SF3B1, XPO1, HIST1H1E, CHD2, MYM3, WNT, NOTCH1, MYD88, EGR2, BRAF	<ul style="list-style-type: none">• del(13q14)• del(11q22-23)• del(17p13)• trisomija 12	<ul style="list-style-type: none">• miR-15a• miR-16-1• miR-155	<ul style="list-style-type: none">• hipometiliran genom z vmesnimi hipermetilacijskimi regijami

Somatske mutacije

Pogosto se pojavljajo mutacije v genih za popravljanje deoksiribonukleinske kisline (DNA) (tp53, ATM), mRNA obravnavo (SF3B1, XPO1), kromatinsko preurejanje (HIST1H1E, CHD2, MYM3), WNT signaliziranje, Notch signaliziranje (NOTCH1), vnetne poti (MYD88) ter za B-celično signaliziranje in transkripcijo (EGR2, BRAF) (14).

Kromosomske nepravilnosti

Pri 80 % bolnikov se pojavlja ena izmed citogenetskih nepravilnosti; delecija kromosomov (v več kot 50 % primerih del(13q14)), pri 18 % del(11q22-23), pri ~7 % bolnikov pa del(17p13) ali trisomija 12 pri 16 % bolnikov (15). Uporabljajo se pri diagnozi (poglavje 1.1.2.), nekatere pa so pokazatelj slabe prognoze, razen del(13q14), ki napoveduje ugodnejši potek bolezni (Preglednica IV).

Mikro RNA (miRNA)

KLL je bila prva bolezen, kjer so odkrili, da lahko enoverižne, kratke (21-23 nukleotidov), nekodirajoče molekule ribonukleinske kisline (RNA) vplivajo na izražanje genov (13, 19). MiR-15a in miR-16-1 sta spremenjeni pri 60 % bolnikov, obe pa se vežeta na informacijsko mRNA gena za anti-apoptična proteina Bcl-2 in Mcl-1 (17). Povečana ekspresija miR-155 je vezana na povečano signaliziranje preko BCR receptorja, B-celično delitev in limfogenezo (16).

Epigenomska regulacija

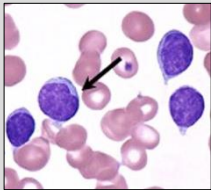
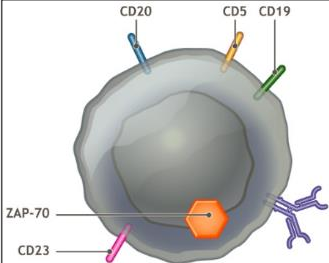
Genom je pretežno hipometiliran, z vmesnimi hipermetilacijskimi regijami, kot pri večini rakov. Neenotnost epigenomov pri KLL je bila potrjena v več študijah, ki so prikazale izredno intra-individualno tumorsko variabilnost. Raziskave na nivoju kromatina so mutacijo gena IGHV (gen variabilnega področja za težko verigo imunoglobulinov) karakterizirale kot enega najpomembnejših vzrokov za heterogenost, a je mutacija uspela pojasniti le 5-10 % heterogenosti vzorca – nadaljnje stopnje so pripisali epigenomski (de)regulaciji (13, 18).

1.1.2. Diagnoza

Bolezen se velikokrat odkrije naključno, ko pri hematološki preiskavi opazijo presežek limfocitov B. Simptomi so namreč zelo nespecifični – utrujenost, upad telesnih sposobnosti, nepojasnjena povečana telesna temperatura, nočno potenje, nepojasnjeno hujšanje in zmanjšanje teka (7). V Preglednici II so navedeni kriteriji za potrditev diagnoze KLL.

Preglednica II: Najpogostejši diagnostični pristopi pri KLL.

Povzeto po (7, 20–24).

krvni testi		<ul style="list-style-type: none">• hematogram: $>5 \times 10^9/L$ limfocitov B, tri zaporedne mesece• razmaz periferne krvi: mali, zreli limfociti z ozkim robom citoplazme in z gostim jedrom• klonskost potrebno potrditi s pretočno citometrijo
imunofenotip		<ul style="list-style-type: none">• T-celični antigen CD5• B-celični površinski antigeni CD19, CD20 in CD23• % površinskih imunoglobulinov CD20 in CD79b je značilno manjši kot pri normalnih zrelih limfocitih B• ZAP-70 in CD38
molekularna genetika		<ul style="list-style-type: none">• delecija dolgega kraka kromosoma 13 (del13q14)• delecija dolgega kraka kromosoma (del11q22-23)• trisomija kromosoma 12• delecija kratkega kraka kromosoma 17 (del17p13)

Najpogostejši so **krvni testi**, z uporabo pretočne citometrije določajo **imunofenotip** oziroma celične imunološke označevalce, pogosto pa se uporabljajo tudi metode **molekularne genetike**, ki odkrivajo citogenetske nepravilnosti. Med omenjene spadajo preiskave kariotipa (klasična citogenetika) in interfazna FISH (fluorescenčna in situ hibridizacija), ki so pomemben napovednik kliničnega poteka KLL in imajo velik vpliv na izbiro primerne

zdravljenja. V Sloveniji jih v Laboratoriju za citogenetiko in molekularno genetiko Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana (UKCL) že rutinsko opravljajo pri vseh bolnikih s KLL, pri katerih njihovo telesno stanje dopušča več vrst zdravljenja (7).

V sklopu kliničnih raziskav se opravljajo tudi preiskave mutacijskega statusa IGVH ter prisotnost celičnih in serumskih označevalcev. Redkeje sta uporabljeni punkcija in biopsija kostnega mozga, s katerima ocenijo, v kakšni meri so celice KLL preplavile kostni mozeg. Poseg je smislen pred uvedbo terapije, prav tako pa je koristen podatek pri določanju prognoze. S slikovnimi tehnikami pa se pogosteje spremlja, kateri deli telesa so prizadeti in kakšen je potek zdravljenja (7, 23).

1.1.3. Prognoza

Za uvrstititev bolnikov v tri klinične stadije sta v uporabi dva sistema; klasifikacija po Binetu in stopnjevanje po Rai-ju, ki ju prikazuje Preglednica III. Prvotna razvrstitev po Rai-ju se pogosteje uporablja v ZDA, klasifikacija po Binetu pa v Evropi, med drugim jo uporabljajo tudi na UKCL (5, 13).

Preglednica III: Dva različna sistema za razvrstitev pacientov pri KLL.

Klasifikacija po Binetu (25)			Klasifikacija po Rai-ju (26)		
Stadij	Klinične značilnosti	Mediana preživetja	Stadij	Klinične značilnosti	Tveganje (27)
A	odsotni anemija in trombocitopenija, < 3 področja s povečanimi bezgavkami	12 let	0	limfocitoza	nizko
B	odsotni anemija in trombocitopenija, > 3 področja s povečanimi bezgavkami	5 let	I	limfocitoza in limfadenopatija	srednje
C	anemija (Hb < 100 g/L) in/ali trombocitopenija (< 100 x 10 ⁹ /L)	2 leti	II	limfocitoza, splenomegalija ali hepatomegalija	
			III	limfocitoza, anemija (Hb < 110 g/l)	visoko
			IV	limfocitoza, trombocitopenija (<100 x 10 ⁹ /l)	

Sami uvrstitvi pa nimata dovolj velike prognostične vrednosti, zato so se v preteklosti uveljavili še drugi kazalci, ki natančneje napovejo potek KLL. Današnje razumevanje ostalih prognostičnih faktorjev se je oblikovalo v sklopu večje kohorte, ki jih je identificirala nemška KLL študijska skupina (*ang. German CLL Study Group (GCLLSG)*) (28). Prikazuje jih Preglednica IV.

Preglednica IV: Faktorji, ki napovedujejo slabo prognozo pri KLL.

Povzeto po (28).

Genetske nepravilnosti	Biokemijske kazalci in celični označevalci	Značilnosti bolnikov
delecija del17p13 (p53 delecija ali mutacija)	povečana vrednost serumske timidin kinaze	starost ≥ 60
delecija 11q22-23 (ATM gen)	serumski β -2-mikroglobulin	moški spol
nemutiran IGHV	CD49d+, CD38+	ECOG $\geq 1^*$
BIRC3, NOTCH1, SF3B1	ZAP-70+	

**ECOG Scale of Performance status - Skala zmogljivosti, ki jo je določila Eastern Cooperative Oncology Group, imenovana tudi WHO ali Zubrod skala. Rankiranje 0-5, pri čemer 0 pomeni popolno zdravje, 5 pa smrt (29).*

Preverjanje celičnih označevalcev pa nima pomembne vloge le pri prognozi, ampak tudi pri spremljanju uspešnosti zdravljenja. S prisotnostjo omenjenih preverijo, ali so po terapiji v telesu ostale maligne celice, ki lahko povzročijo relaps oziroma ponovitev bolezni. Podatek o številu teh celic podajamo s strokovnim terminom minimalna preostala bolezen (*angl. minimal residual disease – MRD*) (30).

1.1.4. Zdravljenje

Pregled razvoja zdravljenja

V preteklih desetletjih se je na področju zdravljenja KLL zgodilo več relevantnih sprememb, ki so prispevale k dinamičnemu preoblikovanju smernic (31), obetavne nove učinkovine pa narekujejo prav takšno prihodnost. Nedavno so večino bolnikov zdravili s **klorambucilom** ali uporabljali različne sheme polikemoterapije. Te so bile le delno uspešne, niso se obnesle predvsem pri bolnikih z agresivnejšimi vrstami KLL (32). Uvedba sheme **fludarabin + ciklofosamid (FC)** je izkazala dobre odgovore pri zdravljenju in povečano preživetje brez napredovanja bolezni v več randomiziranih študijah, vendar nobena od študij ni zabeležila koristi v prid skupnega preživetja (33, 34). M.D. Anderson Cancer Center iz Teksasa je v svojih kliničnih študijah leta 1999 kot prvi dodal **rituksimab k shemi FC (FCR)**. FCR je doprinesel k boljšim izidom zdravljenja ter dodatni alternativni terapiji za bolnike z delecijo 11q, ki so bili sicer uvrščeni v skupino, pri katerih začetno zdravljenje s fludarabinom pogosto ni uspešno (35, 36). Kombinacijo uporabe monoklonskih protiteles s klasičnimi citostatiki imenujemo **kemoimunoterapija**, v primeru KLL pa se omenjeni največkrat kombinirajo z rituksimabom (7). Ena izmed takšnih kombinacij je **R-Ben** (rituksimab z

novejšim alkilirajočim citostatikom **bendamustinom**), učinkovita predvsem za starejše bolnike s pridruženimi komorbidnostmi (37).

Kmalu je postalo jasno, da so za ohranjanje KLL zelo pomembne signalne poti, ki zagotavljajo esencialne signale za razvoj KLL in kot take lahko predstavljajo pomembno terapevtsko tarčo (32). Po uporabi **zaviralcev kinaz**, na primer ibrutiniba (inhibitor Brutonove kinaze) in idelalisiba (PI3-kinazni inhibitor), prihaja pri kontinuiranem zdravljenju do dolgotrajnejše faze remisije bolezni. Kljub temu pri večini bolnikov ne uspejo zabeležiti negativnega MRD-ja, ki nakazuje odsotnost malignih celic v telesu (32). V primeru slabšega odziva na zaviralce kinaz je danes možno uporabiti sodobnejši **venetoklaks**. Ta kot mimetik molekule BH3 zavira anti-apoptotični protein Bcl-2 in je predvsem priporočljiv za bolnike z delecijo kromosoma 17p13 (38). Evropska komisija ga je v lanskem letu uvrstila na seznam zdravil sirot, sicer za zdravljenje akutne mieloidne levkemije, a je v nekaterih državah, npr. v Nemčiji, že registriran tudi za KLL (39).

Na pomenu pri zdravljenju pridobivajo tudi najmodernejše vrste imunoterapije. Na primer **imunomodulacija**; derivat talidomida – lenalidomid je dosegel že fazo III kliničnih študij, ko so le-te prekinili zaradi večjega števila smrti v skupini, tretirani s lenalidomidom v primerjavi s skupino, ki je dobivala klorambucil (40, 41). Ena izmed oblik imunoterapije temelji na T celicah, ki imajo modificiran himerni antigenski receptor - **CAR T celicah** (*ang. chimeric antigen receptor-modified T cells*) (42). Še modernejši pristop pa predstavljajo **zaviralci imunskih kontrolnih točk** (*ang. immune checkpoint inhibitors*). Tumorski signali pogosto inhibirajo kontrolne točke, da se zaščitijo pred napadom bolnikovega imunskega sistema; omenjeni zaviralci pa te stimulirajo in povrnejo funkcijo imunskega sistema. Dobre rezultate pri zdravljenju kaže tudi individualizirana **kombinirana tarčna terapija** (13, 43). Mnogo bolnikov se kljub veliko dostopnim zdravilom še vedno ne odziva na terapijo. Omenjen problem skuša premagati v tem letu razvit projekt **farmakoskopija** (*ang. Pharmacoscopy*), ki je nastal v sodelovanju med Medicinsko univerzo in centrom CEMM na Dunaju. Razvita tehnologija na principu *ex vivo* fotoanaliz delovanja obstoječih učinkovin preverja njihov imunomodulatorni potencial na malignih celicah bolnikov. Z uporabo knjižnic spojin testirajo vse učinkovine, tudi tiste izven klasičnega obsega indikacij («off-label» uporaba). Ugotovili so, da ima približno 10 % registriranih zdravil še nepoznano imunomodulacijski vlogo, ki bi lahko pomagala pri premagovanju resistantnih hematoloških bolezni. Pristop identificira potencialne učinkovine po meri bolnika in tako predstavlja mejnik v razvoju personalizirane medicine (44).

Rezistenca na zdravljenje

Neravnovesje med anti-apoptotično družino proteinov Bcl-2 in proapoptotičnim BAX je izpostavljeno kot glavni vzrok rezistence na zdravila pri KLL (45). Neravnovesje je posledica konstitutivno aktivne signalne poti transkripcijskega dejavnika NF- κ B, ki s povečanjem proizvodnje anti-apoptotičnih proteinov povzroči neodzivnost na apoptozo in na terapijo, ki deluje prek mehanizmov indukcije le-te (46). Vzrok temu, da apoptoza izostane, so lahko tudi neugodne citogenetske preureditve. Učinkovine, ki sicer inducirajo apoptozo, ne delujejo, ko je pri bolniku prisotna delecija 17p13 ali delecija 11q22-23. Obe citogenetski preureditvi sta povezani z izgubo genov, ki nadzorujejo apoptozo; delecijo gena za p53 (del17p13) ali delecijo ATM (del11q22-23) (*angl. ataxia-telangiectasia mutated*) (47). Drugi, z zmanjšanjem apoptoze povezani mehanizmi, so visoke količine inhibitornih apoptotičnih proteinov (*ang. inhibitors of apoptosis proteins-IAP*) in celični FLICE-ju podobni inhibitorni proteini (*ang. cellular FLICE-like inhibitory protein-cFLIP*), ki naj bi pojasnjevali rezistenco KLL na signalni poti receptorja smrti (48).

Zdravljenje v Sloveniji

Zdravljenje se ponavadi prične, ko nastopi anemija ali trombocitopenija (bolniki v stadiju III/IV po Rai-ju oziroma C po Binetu), simptomatska limfadenopatija ter pridruženi bolezenskimi simptomi (nočno potenje, slabost, nenamerna izguba teže, nerazložena vročina) (13). Preglednica V prikazuje najpogosteje uporabljene sheme za zdravljenje KLL v Sloveniji in komentar, za katero podskupino bolnikov so primerne (49).

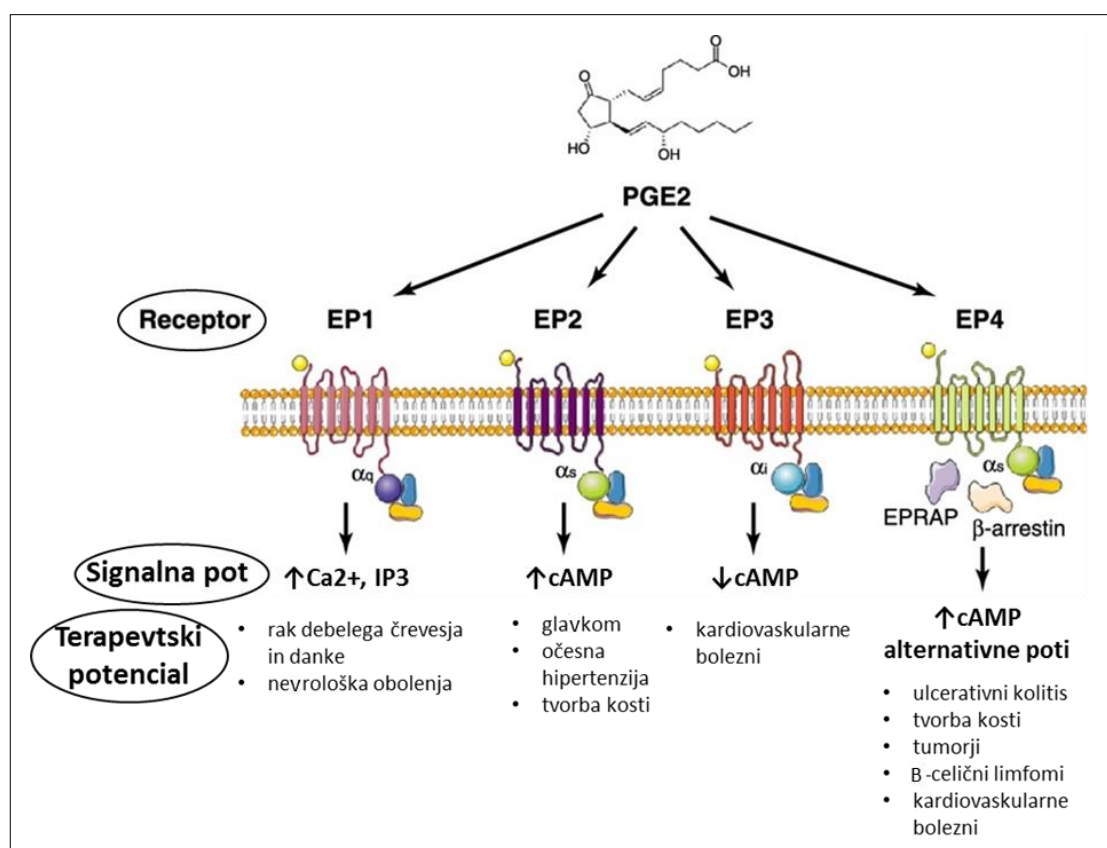
Preglednica V: Najpogosteje uporabljene sheme za zdravljenje KLL v Sloveniji.
Povzeto po (7, 49, 50).

Kratica	Aplikacija	Zdravila	Podskupina bolnikov
LP	<i>p.o.</i>	klorambucil (+metilprednizolon)	starejši bolniki s pridruženimi komorbidnostmi
FC/Flucy	<i>p.o.</i> ali <i>i.v.</i>	fludarabin	prva izbira za mlajše, klinično sposobne bolnike brez del17p13
	<i>p.o.</i> ali <i>i.v.</i>	fludarabin, ciklofosamid	
FCR	<i>i.v.</i>	fludarabin, ciklofosamid, rituksimab	
	<i>i.v.</i> in <i>p.o.</i>	ciklofosamid, epirubicin, vinkristin, metilprednizolon (+rituksimab)	
	<i>i.v.</i>	metilprednizolon	resistentna KLL
	<i>s.c.</i>	alemtuzumab	neodzivni na fludarabin, bolniki z del17p13
	<i>i.v.</i>	bendamustin	neodzivni na fludarabin
	<i>i.v.</i>	ofatumumab	neodzivni na rituksimab

Način aplikacije: *p.o.*- per os, peroralno, *i.v.*-intravensko, *s.c.*-subkutano, *Skupina zdravil:* *alkilirajoči citostatik, glukokortikosteroid, antimetabolit; analog adenozeina, protitelo proti antigenu CD52, protitelo proti antigenu CD20, antraciklinski (antibiotik), inhibitor delitvenega vretena.*

1.2. Prostaglandinski receptor EP4

Lipidni mediatorji prostanoidi se v telesu sintetizirajo iz arahidonske kisline s pomočjo encima ciklooksigenaze (COX). Skupino prostanoidov sestavljajo prostaglandini (PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGF₂, PGG₂, PGH₂), prostaciklin (PGI₂) in tromboksan A₂ (TXA₂). Najbolj razširjen prostaglandin E₂ (PGE₂) deluje kot avtokrini ali parakrini mediator signalov - zadolžen je za signaliziranje med celicami kakor tudi povratne signale do celic. Zaradi svojega lokalnega učinka je molekula s kratkim razpolovnim časom, razgradi se v nekaj v minutah (51, 52). Na Sliki 2 so prikazani receptorji, na katere se veže PGE₂, pripadajoče signalne poti ter terapevtski potencial modulatorjev, ki delujejo na njih.



Slika 2: Signalne poti receptorjev EP1-4.

Prikaz signaliziranja po vezavi prostaglandina E₂ (PGE₂) in aktivaciji enega izmed štirih prostaglandinskih receptorjev EP1-EP4. Receptorji so sestavljeni iz sedmih transmembranskih domen in so sklopljeni z različnimi G-proteini. Modulatorji prostaglandinskih receptorjev so tudi obetavne spojine; na sliki je navedena skupina bolezni, kjer modulatorji receptorjev EP1-4 izkazujejo terapevtski potencial. Slika povzeta po (52).

PGE₂ lahko aktivira štiri podtipove prostaglandinskih receptorjev EP1-EP4, največjo afiniteto pa ima do prostaglandinskega receptorja E tipa 4 (EP4). Omenjeni receptorji so del večje skupine transmembranskih, z G-proteinom sklopljenih receptorjev, ki po aktivaciji inducirajo različne signalne poti. EP1 je sklopljen s proteinom G_{αq}, vezava PGE₂ pri njem

pa sproži povišanje citosolne Ca^{2+} koncentracije. Po aktivaciji receptorja EP2, vezanega na stimulativen protein *G α s* se poviša znotrajcelična koncentracija cAMP. Receptor EP3 je sklopljen z inhibitornim proteinom *G α i* in zmanjša sintezo cAMP. Odvisno od tipa celice lahko aktivacija receptorja EP4 vodi do povišanja cAMP in v nekaterih primerih do aktivacije cAMP neodvisnih poti; PI3K/AKT, MEK/ERK1/2 in modulacije NF- κ B (51, 53, 54).

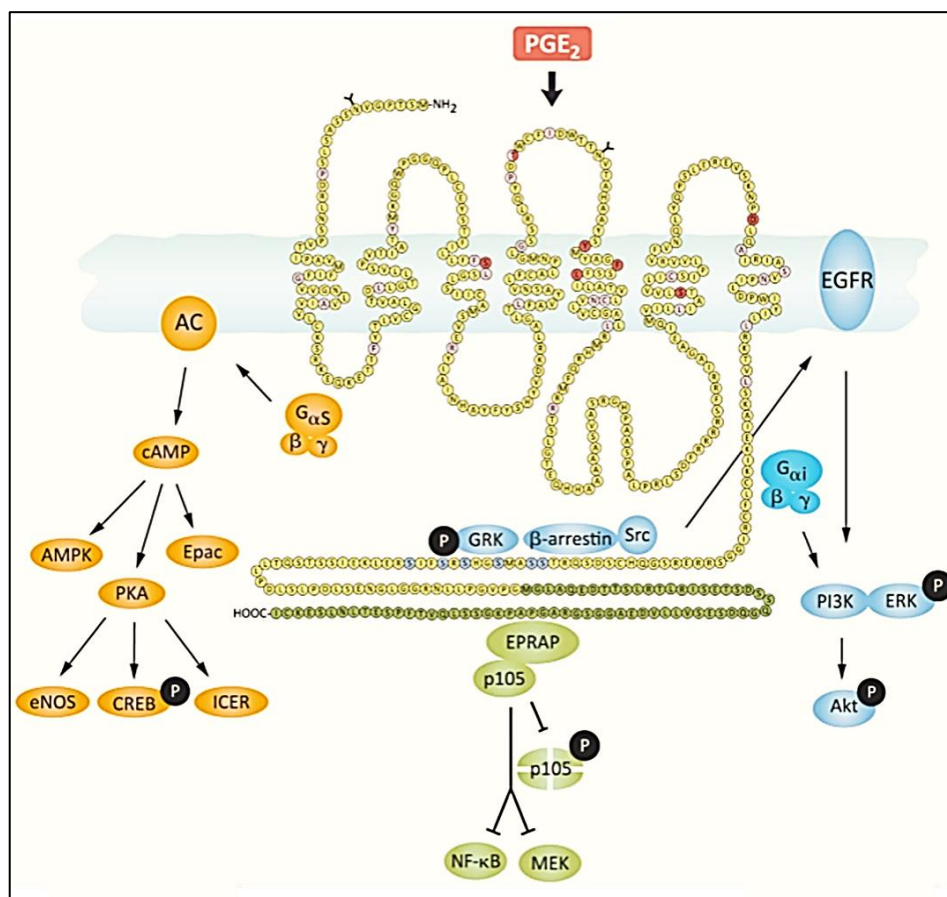
Receptor EP4 je v največji meri izražen v gastrointestinalnem traku, uterusu, koži, krvotvornih organih in ožilju, kar pojasnjuje njegovo **vlogo pri imunskem odzivu, regulaciji krvnega pritiska, funkciji gastrointestinalnih organov ter plodnosti** (51).

Vloga receptorja EP4 pri procesih kancerogeneze je prav tako v veliki meri odvisna od tkivne lokalizacije receptorja in pridruženega mikrookolja. V nekaterih primerih **a) prispeva k rasti in razširjanju tumorjev**, v drugih pa ima **b) protektivno vlogo**.

- a) Negativna vloga tumorske promocije se izkazuje v sledečih procesih; zaviranje apoptoze, spodbujanje proliferacije, motilitete, metastaziranja in angiogeneze. Omenjeno so zabeležile študije pri raku debelega črevesa in danke, prostate, materničnega vratu, jajčnikov, gornjih sečil, dojk, jeter in pljuč (54).
- b) Protektivno delovanje je vezano na izražanje receptorja v limfocitih B. V B-celičnih limfomih se je po aktivaciji BCR receptorja povečala ekspresija gena *Ptger4* in v limfocitih B sprožila proces apoptoze (55). Poskusnim mišim z B-celičnim limfomom so izbili gen *Ptger4*. Zabeležili so pospešeno razširitev tumorja, ko pa so ponovno inducirali čezmerno ekspresijo *Ptger4*, je ta izkazala protektivno vlogo pri razširjanju tumorja. Po izbitju gena se je povečalo izražanje proliferativnih in z NF- κ B povezanih genov, ki inhibirajo apoptozo. Gen *Ptger4* je bil na podlagi teh ugotovitev predlagan za tumor supresor gen (52, 55). Poleg tega je bil receptor EP4 karakteriziran kot negativni povratni regulator proliferacije v odgovoru na signaliziranje preko BCR. Pri povečanem signaliziranju preko BCR se poveča sinteza PGE_2 , ta pa aktivira receptor EP4. Aktivacija receptorja EP4 inducira apoptozo malignih limfocitov B in zavira nadaljno delitev malignih celic (53, 55–57). Receptor EP4 se tako z učinkom zaviranja proliferacije, ki ga povzroči od aktivacije B celičnega receptorja (BCR) odvisna sinteza PGE_2 , zdi ključen člen v signalni kaskadi malignega širjenja. Zaradi vloge v omenjenih procesih je bil označen za obetavno terapevtsko tarčo (55, 57, 58).

1.2.1. Deregulacija signalnih poti pri KLL

Signaliziranje po aktivaciji receptorja EP4 v limfocitih B poteka preko signalnih poti in sicer; a) preko cAMP-odvisne poti, b) aktivacije jedrnega transkripcijskega dejavnika NF- κ B, v manjši meri tudi preko poti PI3K/ERK/Akt (57). Slika 3 prikazuje možne signalne poti po vezavi PGE₂ in aktivaciji receptorja EP4.



Slika 3: Signalne poti, ki se lahko aktivirajo po vezavi agonista PGE₂ na receptor EP4.

Vezava agonista PGE₂ na receptor sproži aktivacijo adenilat ciklaze (AC), sintezo cAMP, sledeči koraki pa so lahko: aktivacija AMP-aktivirane protein kinaze (APMK), aktivacija PKA ali aktivacija izmenjevalnega faktorja Epac. PKA v signalni kaskadi sledijo odzivni element za cAMP - CREB, eNOS ter ICER. Podaljšan C-terminalni del receptorja EP4 omogoča interakcijo z EP4 vezavnim proteinom EPRAP, ki stabilizira p105 podenoto in prepreči aktivacijo NF- κ B in inhibira mitogen aktivirano protein kinazo (MEK). Na ta način se inhibira sinteza provnetnih citokinov v aktiviranih makrofagih. Receptor se lahko hitro desenzitira, ko se G-receptorske kinaze (GRK) vežejo na del C-terminalnega dela. Fosforizacija GRK inducira β -arestine, ki sprožijo internalizacijo receptorja in Src, ki vodi do tranaktivacije receptorja EGFR in nadalje aktivira pot PI3K/ERK/Akt. Alternativno lahko omenjeno pot aktivira tudi vezava Pertussijevega toksina na inhibitorni protein Gai (54).

Ciljanje vseh signalnih poti je pristop več raziskovalnih skupin, pri tem pa je potrebno paziti, da so spojine specifične za konkretno signalno pot in da je le-ta deregulirana pri malignih in ne pri zdravih celicah. Danes namreč vemo, da vezava različnih modulatorjev na z G-proteinom sklopljene receptorje sproži raznolike odzive nižje ležečih signalnih poti.

Omenjeno se zgodi zaradi stabilizacije različnih aktivnih oblik G-proteinov. Nekoč so mislili, da obstaja le ena, ki inducira vse signalne poti z enako jakostjo. Novejše raziskave so pokazale, da aktivacija signalnih poti po vezavi različnih ligandov sproži časovno (ena od poti se sproži prednostno, druga kot sekundarni val), lokalno (aktivacija na različnih delih zunanje ali jedrne membrani ali v endosomih) in biokemijsko (aktivacija drugačnih poti) različne vzorce. Termin, ki opaženo opisuje, najsmotrnejše prevedemo kot favoriziranje liganda (*ang. ligand bias*). Učinkovine prihodnosti bodo uporabljale le želeno vrsto aktivne oblike receptorja, ki bo sprožila kaskado zelenih signalov; ligand bo favoriziral izbrano signalno pot (59, 60). Za obe signalni poti; klasično cAMP-odvisno ter alternativno NF- κ B, je bilo dokazano, da sta drugače regulirani pri KLL kot pri normalnih limfocitih B, zato je ciljanje teh poti smiselno. Na tak način lahko delujemo bolj selektivno na maligno spremenjene celice in v manjši meri ogrožamo zdrave limfocite B (24).

Pri KLL je konstitutivno aktivno tako signaliziranje preko BCR, kakor tudi signalna pot STAT3, kar omogoča celicam daljše preživetje, še dodatno aktivira NF- κ B in poveča produkcijo vnetnih kemokinov in citokinov (61, 62).

a) signalna pot cAMP/PKA/CREB

Ciklični adenzin monofosfat (cAMP) je signalna molekula, ki ima v celici vlogo sekundarnega obveščevalca. Po aktivaciji encima adenilat ciklaze (AC) se cAMP sintetizira iz adenzin-5'-trifosfata (ATP), razgrajujejo ga encimi fosfodiesteraze (PDE). Pri KLL se cAMP metabolizira predvsem preko izoforme PDE4 (63). cAMP lahko nadalje aktivira več molekul (Slika 3), najpogosteje se aktivira protein kinaza A (PKA) in ta fosforira CREB. Ta se kot dimer veže na izbrani del genoma ter tako uravnava transkripcijo nekaterih genov. Znano je, da se pri KLL zmanjša transkripcija anti-apoptičnega gena *Bcl-2*, zaradi česar maligne celice preživijo dlje in so odporne na terapijo, ki deluje na principu indukcije apoptoze (64).

Za KLL se predvideva **zmanjšano bazalno signaliziranje preko cAMP** in posledično nižji bazalni nivo apoptoze. Razlog zato naj bi bila vpletenost večih PDE izoform, ki dodatno razgrajujejo cAMP (65). Že prej omenjena izoforma PDE4 je bila v raziskavah že uporabljena kot potencialna terapevtska tarča; zaviranje le-te je namreč povišalo znotrajcelično količino cAMP in nivo apoptoze. Indukcijo programirane celične smrti so najprej opazili na celični liniji KLS49, nato pa potrdili še na celicah bolnikov s KLL (63).

b) NF- κ B (jedrni transkripcijski dejavnik kapa B)

NF- κ B družino proteinov sestavljajo dimerni proteini p52/p100, p50/p105, c-Rel, p65 in RelB. V nestimuliranih celicah so v citoplazmi, vezani na zaviralni protein I κ B. Ob stimulaciji celice se aktivira I κ B kinaza (IKK), ki fosforilira zaviralni protein I κ B, dimeri NF- κ B se sprostijo in premaknejo v jedro, kjer z vezavo na DNA uravnavajo izražanje genov, ki so odgovorni za imunski sistem, vnetne in stresne procese, razvoj B-celic ter razvoj limfatični organov (66). Opisana pot aktivacije je klasična, možna je tudi alternativna, ki poteka preko aktivacije NF- κ B inducibilne kinaze (NIK).

V zdravih celicah je aktivacija induktivna, v malignih celicah pa postane konstitutivna, kar privede do zaostajanja apoptoze in rezistence na zdravila (24, 67). **Konstitutivna aktivnost NF- κ B poti pri KLL** prispeva k malignosti, saj se večja sinteza proliferativnih in anti-apoptotičnih proteinov, ki preprečujejo rakavim celicam, da stopajo v apoptozo. Pomembna za KLL je predvsem zmanjšana vezava na promotor gena za anti-apoptotična proteina Bcl-xL in Bcl-2 ter na promotor tumor nekrotizirajočega dejavnika α (TNF- α).

Ciljanje konstitutivno aktivne NF- κ B je eden izmed novih terapevtskih pristopov; inhibitorji IKK v kombinaciji ali kot sami predstavljajo obetavno tarčo, podatki iz literature pa navajajo, da bi lahko prešli zaščito mikro-okolja, ki ohranja KLL celice pri preživetju. Ta pristop je zanimiv predvsem zaradi dejstva, ker indukcija apoptoze preko inhibicije NF- κ B zaobide nepravilnosti pri p53, kar je izrednega pomena za terapijo; bolniki z nepravilnostmi gena za p53 so definirani kot skupina z večjim tveganjem in slabim odgovorom na kemoterapijo in bi s ciljanjem te poti lahko veliko pridobili (24).

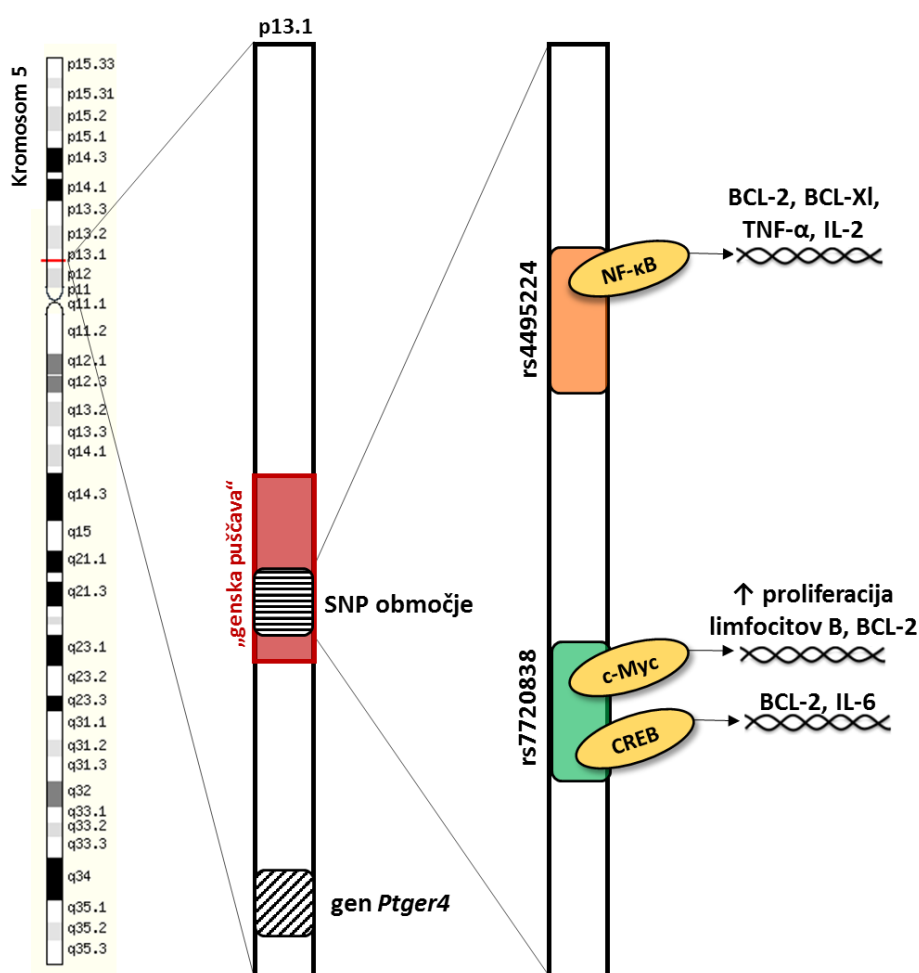
1.2.2. Mutacije gena za receptor EP4

22 Kb velik gen *Ptger4*, ki kodira za receptor EP4, obsega tri eksone in se nahaja na kromosomu 5. V neposredni bližini gena *Ptger4* (270 Kb stran), v genski puščavi na 5p13.1 so identificirali 250 Kb veliko regijo, v kateri je več polimorfizmov posameznega nukleotida (*angl. single nucleotide polymorphism* – SNP) (68).

V regiji se nahajata dva SNP-ja, ki sta tematika pričujoče magistrske naloge - **rs4495224** in **rs7720838** (Slika 4), za njiju pa so ugotovili, da vplivata na ekspresijo gena *Ptger4*. Spoznanja so iz GWA študije, ki so jo izvedli na kavkazijskih bolnikih s Crohnovo boleznijo (CB), kjer so dokazali statistično značilno povezavo s CB (69). Ugotovitve so replicirali na večjem številu vzorcev, kontrol in trojk ter potrdili povezanost rizičnih alelov omenjenih SNP-jev s CB.

SNP rs7720838 je bil med drugim označen tudi kot kandidatni lokus za astmo in avtoimunska obolenja (34, 71). Mesto na genomu, kjer se nahaja, je bilo prepoznano kot vezavno mesto za transkripcijska dejavnika c-Myc in CREB. Mielocitomatozni onkogen oziroma c-Myc (*ang. myelocytomatosis oncogene*) je že dokazano povezan s signaliziranjem preko BCR, saj stimulira klonsko proliferacijo limfocitov B in zavira procese diferenciacije, pri mnogih rakih pa so zabeležili njegovo konstitutivno aktivnost. Vloga CREB je pomembna zaradi regulacije transkripcije anti-apoptičnega proteina Bcl-2.

Rs4495224 pa je del vezavnega mesta za NF- κ B, katere signalna pot je konstitutivno aktivna pri KLL. Prav z močnejšo vezavo transkripcijskih dejavnikov na lokus SNP-jev razlagajo njihov vpliv na izraženost gena *Ptger4* (56, 69, 72, 73).



Slika 4: Prikaz kromosoma 5.

Na lokusu 5p13.1 se nahaja genska puščava s SNP rs4495224 in rs7720838, ki vplivata na ekspresijo bližnje ležečega gena *Ptger4*(74). SNP rs4495224 je del vezavnega mesta za NF- κ B, rs7720838 pa c-Myc in CREB.

NF- κ B, ki je pri KLL konstitutivno aktivna vpliva na povečano izražanje provnetnih in antiapoptičnih genov, c-Myc zavira procese diferenciacije in spodbuja klonsko proliferacijo limfocitov B, CREB pa poveča transkripcijo anti-apoptičnega proteina Bcl-2 (70).

1.2.3. Ekspresija receptorja EP4

Na nivoju fluorescentne mikroskopije ter pretočne citometrije je bila potrjena višja ekspresija receptorja EP4 na različnih tipih maligno spremenjenih celičnih linij (Ramos, MHH-PRE B, NALM-6, KOPN-8, JURKAT, THP1, U93) (46). Kot kontrola so bile uporabljene limfoblastoidne celične linije (LCL). Te so z Epstein-Barr virusom (EBV) preobražene celične linije, pridobljene iz krvi zdravih darovalcev. Ker ohranijo večino prvotnih lastnosti limfocitov B, so primeren model za različna *in vitro* testiranja (74, 75). Pri malignih B-celičnih linijah (Ramos, MHH-PRE B, NALM-6 in KOPN-8) so zabeležili tudi citotoksičen učinek potencialne protirakave spojine PgE₁-OH, pri ostalih tipih celic pa ne. Preverili so, ali nivo ekspresije korelira z učinkom PgE₁-OH, in ugotovili, da temu ni tako. Sklepali so, da raznolika aktivacija receptorja EP4 ni odvisna od ekspresije receptorja EP4, ampak bolj verjetno od tipa transformirane imunske celice. Maligne B-celične linije so bile namreč občutljive na PgE₁-OH in so imele hkrati povečano ekspresijo, pri limfocitni T liniji JURKAT ter monocitnima linijama THP1 in U93 pa so zabeležili le višjo ekspresijo, ne pa tudi občutljivosti na PgE₁-OH (46). Ugotovljena selektivnost za maligne B-celične linije je vodila v kreiranje klinične študije, v sklopu katere so učinek potencialne protirakave molekule PgE₁-OH ovrednotili tudi na primarnih celicah bolnikov s KLL *in vitro*. Citotoksičen učinek PgE₁-OH je bil opaznejši na celicah KLL v primerjavi z LCL, prav tako ekspresija receptorja EP4 na nivoju pretočne citometrije. Na podlagi naštetih dognanj so receptor EP4 označili za potencialno tarčo za zdravljenje KLL (46, 58, 76), s proučevanjem njegove vloge pa nadaljujemo v pričujoči magistrski nalogi.

Vpliv ekspresije gena *Ptger4* je bil identificiran tudi v študiji BCR receptorja, kjer je bil prepoznan kot vodilni, ki se je izrazil v zrelih, ne pa tudi v nezrelih limfocitih B, kar prikazuje njegovo pomembno vlogo pri aktivaciji B-celičnih mehanizmov in diferenciacije (56, 69). V drugi študiji so mu pripisali vlogo tumor supresorja. Ko so v *in vivo* poskusnem modelu B-celičnih limfomov izbili gen *Ptger4*, so zabeležili pospešeno razširitev tumorja. V naslednjem poskusu so inducirali čezmerno ekspresijo *Ptger4* in ta je izkazala protektivno vlogo pri razširjanju tumorja (55).

Naveden primer protektivne vloge je bil zabeležen pri B-celičnih limfomih, pri nekaterih patoloških stanjih pa je imelo povišano izražanje receptorja EP4 negativen učinek. Na primer pri limfocitnem kolitisu, eni od podvrst kronične vnetne črevesne bolezni (KVČB) so opazili povečan nivo provnetnih citokinov, z njimi pa je koreliralo tudi povečano izražanje receptorja EP4 (77). Povišano ekspresijo receptorja EP4 so odkrili tudi pri raku maternične

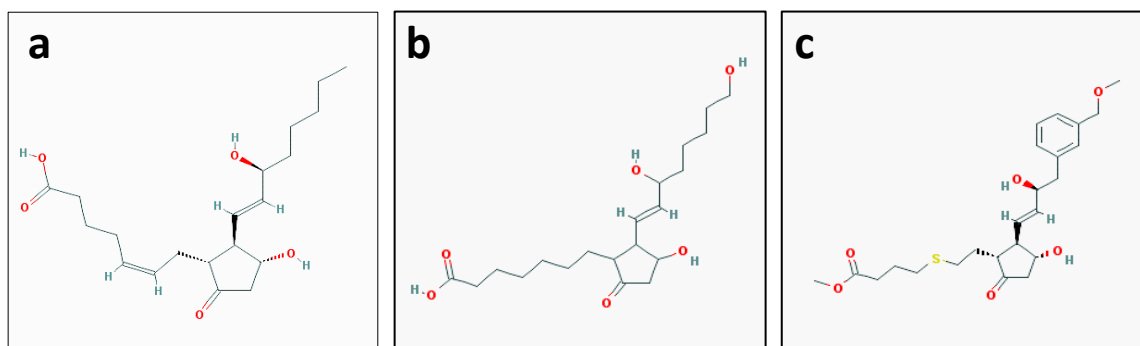
sluznice in materničnega vratu, pri raku debelega črevesa in danke, pri celični liniji ledvičnega karcinoma pa je izbitje gena *Ptger4* zmanjšalo tumorsko invazijo in sposobnost metastaziranja po eksperimentih na poskusnih živalih *in vivo* (78–81).

1.3. Modulatorji receptorja EP4

PGE₂ (Slika 5a), nativni ligand prostaglandinskih receptorjev EP1-4 je kot učinkovina **dinoproston** v Slovenji indiciran za spodbujanje krčenja maternice pri porodu, sicer pa še kot abortiv ter vazodilatator pri ishemijah ali pljučni hipertenziji. Zaradi izredno hitrega metabolizma in nezaželenih učinkov je njegova uporaba omejena (53, 91). Glede na splošno razširjenost v telesu ter vlogo receptorja EP4 v različnih boleznih so razvili kar nekaj obetavnih spojin, ki modulirajo delovanje le-tega. **Agonisti** so v raziskavah uporabljeni pri ulcerativnem kolitisu (spojina rivenprost (Slika 5c) je že dosegla fazo II kliničnih študij), remodelaciji kosti, Alzheimerjevi bolezni, B-celičnih limfomih ter kardiovaskularnih boleznih. **Antagonisti** so izkazali učinek pri tumorjih prostate, dojk, pljuč (grapiprant), raku danke in debelega črevesja (56, 57).

PgE₁-OH

Selektivni ligand receptorja EP4, PgE₁-OH (Slika 5b) je v preteklih predkliničnih študijah izkazal svoj potencial kot spojina za terapijo B celičnih limfomov (46, 58, 76). Citotoksični učinek PgE₁-OH je posredovan preko aktivacije receptorja EP4, ki sproži aktivacijo spodnje ležečih signalnih poti; aktivira se cAMP-odvisna pot, obenem pa inhibira translacija NF-κB. Po izpostavitvi malignih B celičnih linij PgE₁-OH so dokazali inhibicijo NF-κB – odvisnih antiapoptotičnih proteinov, zmanjšana aktivnost omenjenih proteinov pa je povečala tudi učinek v kombinaciji z že uveljavljenimi zdravili; bortezomibom in doksorubicinom (46).



Slika 5: a) PGE₂ (dinoproston), b) PgE₁-OH in c) rivenprost (ONO-4819).

Vse molekule razpolagajo z začetno (pri rivenprostu zaestreno) karboksilno skupino, osrednjim ciklopentanonskim fragmentom in pripeto lipofilno verigo, ki se različno zaključí. Prostorska konfiguracija je pri vseh enaka. Povzeto po (82–84).

2. NAMEN DELA

Namen dela je doprinesi k razumevanju vloge prostaglandinskega receptorja EP4 pri izredno heterogeni bolezni KLL. Raziskovali bomo dejavnike, ki bi lahko prispevali k bolj optimalni uporabi obetavne protirakave spojine PgE₁-OH in ovrednotili, ali bi lahko katera od proučevanih entitet predstavljala potencialni prognostični biomarker za KLL.

Biokemijske in genetske dejavnike napovedi učinkovitosti bomo proučevali *in vitro* na primarnih celicah bolnikov s KLL, ki bodo privolili v sodelovanje v raziskavi, odobreni s strani Komisije RS za medicinsko etiko (KME), št. 93/12/10 in jih primerjali z vzorci zdravih prostovoljcev.

V sklopu **IN VITRO VREDNOTENJE UČINKOVITOSTI PGE₁-OH** bomo izolirali celice KLL in na njih preverili citotoksični učinek spojine PgE₁-OH. Za določanje metabolne aktivnosti celic bomo uporabili test PrestoBlue in po določitvi vrednosti EC₅₀ skušali ugotoviti, pri katerih podskupinah bolnikov PgE₁-OH izkazuje najboljše učinek.

Nadalje bomo v sklopu **GENOTIPIZACIJA** na izolirani DNA iz bolnikovih celic analizirali genska polimorfizma rs4495224 in rs7720838. Nahajata se v bližini regulatorne regije gena *Ptger4* in posledično vplivata na ekspresijo receptorja EP4, deregulacija le-te pa se povezuje s številnimi boleznimi. Frekvence pojavljanja polimorfizmov bomo primerjali s pričakovano, s frekvencami pojavljanja genotipov/alelov pri zdravih prostovoljcih ter s podobnimi skupinami bolnikov iz svetovne populacije. Ovrednotili bomo, ali kateri od polimorfizmov predstavlja prognostični biomarker za KLL. Na ta način bi lahko napovedovali večje tveganje za KLL ali predvideli odzivnost na terapijo PgE₁-OH.

V sklopu **VREDNOTENJE IZRAŽANJA RECEPTORJA EP4** bomo ocenili vpliv izražanja prostaglandinskega receptorja EP4 na dveh nivojih - na nivoju mRNA in na nivoju proteina z uporabo pretočne citometrije. Gen *Ptger4*, ki kodira za receptor EP4, je bil označen za potencialni tumor-supresor gen, ekspresija receptorja pa je večja na celicah KLL bolnikov v primerjavi s kontrolo. Izolirali bomo RNA, pridobljeno iz celic bolnikov s KLL, jo prepisali v cDNA in s pomočjo metode PCR v realnem času kvantitativno ovrednotili ekspresijo gena *Ptger4*. Nivo ekspresije gena *Ptger4* bomo statistično ovrednotili glede na pojavnost polimorfizmov, EC₅₀ vrednosti PgE₁-OH ter spol in starost.

Z uporabo pretočne citometrije bomo določili ekspresijo receptorja EP4 na celicah KLL ter preverili ali izpostavitve PgE₁-OH spremeni izražanje receptorja EP4.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Metode dela s celicami

3.1.1. Materiali in oprema

Preglednica VI: Seznam materialov in aparaturo, potrebnih za delo s celicami.

Material/Aparatura	Proizvajalec
zaščitne rokavice iz lateksa	Kimberly-Clark
raztopina tripanskega modrila	Sigma-Aldrich, MO, ZDA
DMSO	Sigma-Aldrich, MO, ZDA
Ficoll-Paque TM reagent	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Švedska
L-glutamin	Sigma-Aldrich, MO, ZDA
penicilin, streptomycin	Sigma-Aldrich, MO, ZDA
RPMI-1640 medij	Sigma-Aldrich, MO, ZDA
FBS (10 % fetalni goveji serum)	Gibco, Grand Island, NY, ZDA
PBS (za 10xPBS: 80 g NaCl, 2 g KCl 36,3 g, Na ₂ HPO ₄ *12H ₂ O 2,4 g, KH ₂ PO ₄ in dopolnimo H ₂ O dopolnimo do z ultračisto 1,0 L. Sestavine smo natehtali in jih raztopili v vodi, uravnali pH in avtoklavirali. Za 1xPBS redčimo 1 : 10 z ultračisto vodo in avtoklaviramo)	
2-merkaptoetanol	Sigma-Aldrich, MO, ZDA
Obogatitvena mešanica RosetteSep [®] humanih celic B	StemCell Technologies, Vancouver, Kanada
PgE ₁ -OH	Cayman Chemical, MI, ZDA
sterilne 1,5 in 2 mL mikrocentrifugirke (Flowtubes)	Invitrogen, ZDA
pipete 100-1000 µl , 20-200 µl, 0,5-10 µl, 0,1-2,5 µl	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
sterilni nastavki za pipete	Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija
centrifuga Centrifuge 5430 R	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
PrestoBlue TM cell viability reagent	Invitrogen, ZDA
Avtoklav	A-21, Kambič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija
BD Plastipak TM brizgalke	Becton Dickinson, S.A, Španija
BD Microlacne TM 3 igle	Becton Dickinson, S.A, Španija
Centrifugirke (15 in 50 mL)	TPP, Trasadingen, Švica
Invertni svetlobni mikroskop (Olympus CK40)	Olympus optical, Hamburg, Nemčija
Hemocitometer	Brand Neubauer, Nemčija
Inkubator	Heraus Holding GmbH, Hanau, Nemčija
Komora z laminarnim pretokom zraka (LAF komora)	Siemens, ZDA
Krioviale	Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija
Krovna stekla	Assistent, Sondheim, Nemčija
Mikrocentrifugirke (0,5 mL; 1,5 mL in 2 mL)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Plastične sterilne mikrotitrne ploščice za gojenje celičnih kultur (s 6, 12, 24 ali 96 vdolbinami)	TPP, Trasadingen, Švica
Plastične sterilne črne mikrotitrne ploščice (96 vdolbin)	Nunclon TM Delta Surface, Nemčija
Posode T-flask za gojenje celičnih kultur	TPP, Trasadingen, Švica
Mikrotitrski čitalec (Safire 2 TM Genios)	Tecan, Genios, Zürich, Švica
Multikanalne pipete (100, 300 µL)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Serološke pipete za enkratno uporabo (volumni: 5, 10, 25, 50 mL)	TPP, Trasadingen, Švica
Vodna kopel	Mikro+polo, Maribor, Slovenija
Zamrzovalnik - 80°C	Forma scientific, Midland, ON, Kanada
Hladilnik/zamrzovalnik	Gorenje, Velenje, Slovenija

3.1.2. Mediji

MEDIJ ZA CELICE KLL

500 mL RPMI
50 mL toplotno deaktiviranega FBS
5,5 mL antibiotika in antimikotika
5,5 mL L-glutamina
500 µL 50 µM 2-merkaptoetanol

MEDIJ ZA ZAMRZOVANJE KLL

25 mL medija za celice KLL
20 mL FBS
5 mL DMSO

3.1.3. Zbiranje vzorcev

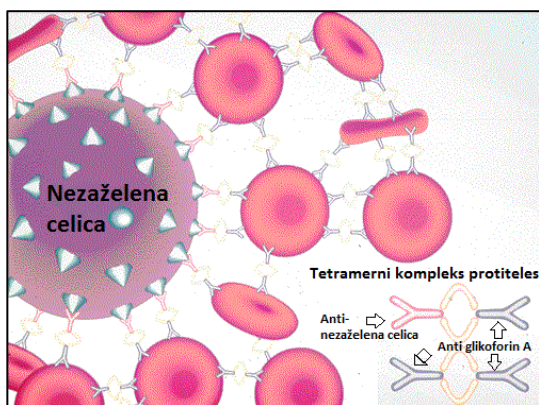
V klinično študijo, ki ima dovoljenje Komisije RS za medicinsko etiko, št. 93/12/10 je bilo vključenih 160 bolnikov z diagnozo kronične limfocitne levkemije, ki so v času od oktobra maja 2012 do februarja 2016 opravili ambulantni pregled na Kliničnem oddelku za hematologijo Univerzitetnega Kliničnega Centra Ljubljana (UKCL). Ko je bolnik podpisal pristanek na sodelovanje, so mu v laboratoriju odvzeli vzorec krvi (~ 5 mL), iz katere smo nato v laboratoriju na Katedri za klinično biokemijo izolirali celice KLL.

3.1.4. Izolacija limfocitov B iz polne krvi

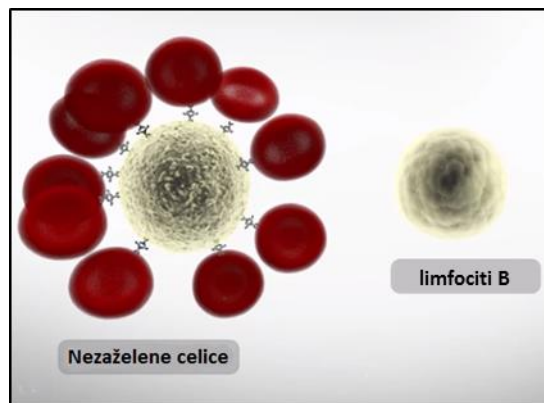
Izolacija celic je potekala v sodelovanju s Tjašo Štolfa (85), ki je izolirane celice KLL prav tako uporabljala za raziskavo v okviru svoje magistrske naloge.

Izolacijo limfocitov B oziroma celic KLL je možno izvesti po dveh metodah, bolj priljubljeni negativni selekcijski metodi ter alternativni pozitivni selekcijski metodi. Izbrali smo izolacijo z uporabo negativne selekcijske metode, ki je priporočljiva za delo s svežimi vzorci, prav tako se pri tem limfociti B funkcijsko ne spremenijo (86).

Pri izolaciji smo uporabljali reagent - obogatitveno mešanico RosetteSep® humanih celic B, sestavljeno iz mišjih in podganjih monoklonskih protiteles. Te tvorijo bispecifičen tetramerni kompleks (Slika 6) in nezaželene celice ločijo od limfocitov B (Slika 7).



Slika 6: Premreženje eritrocitov s tetramernim kompleksom protiteles in neželenimi celicami.
Povzeto po (87).

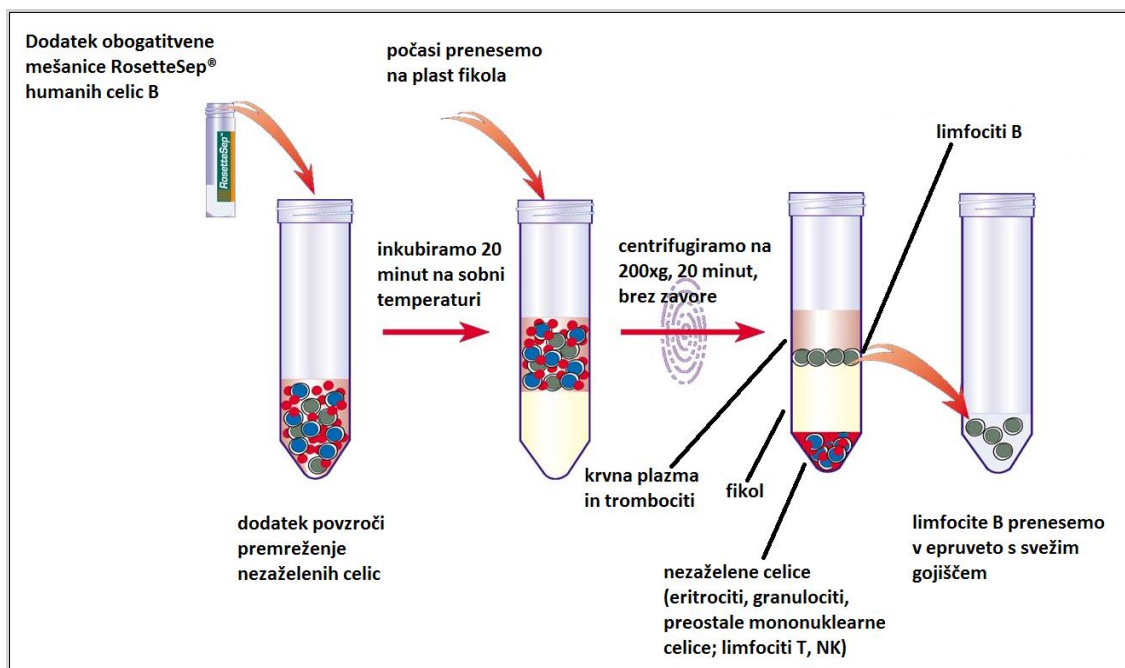


Slika 7: Ločitev nezaželeih celic od limfocitov B.
Povzeto po (88).

Ob vezavi kompleksa in celic se ob gradientnem centrifugiranju ustvari več slojev – nekatere celice se posedejo zaradi premreženja s protitelesi, nekatere pa razporedijo v različne sloje zaradi drugačne gostote. Posedejo se humane hematopoetske celice s površinskimi celičnimi antigeni (CD2, CD3, CD16, CD36, CD56, CD66b) ter eritrociti, ker je na njihovi površini glikoforin A (89). Pred samo izolacijo smo vse reagente, centrifugo in vzorce ogreli na sobno temperaturo (~22 °C).

Postopek (Slika 8)

1. Vzorcju polne krvi (~ 5 mL) smo dodali obogatitveno mešanico RosetteSep® humanih celic B (50 µL/mL) in 20 minut inkubirali na sobni temperaturi.
2. Redčili smo z enakim volumnom raztopine 2 % FBS/PBS in nežno premešali.
3. Razredčen vzorec smo previdno prenesli v epruveto z že prej nanešenim fikolom (~ 5 mL), tako, da se plasti nista premešali.
4. Centrifugirali smo 20 minut na 200g pri sobni temperaturi, brez zavore.
5. S pipeto smo previdno odstranili zgornjo plast do približno 1 cm nad plastjo limfocitov B. Plast limfocitov B smo previdno krožno pobrali in celice prenesli v epruveto s svežim gojiščem (~13 mL). Pazili smo, da smo prenesli le celice in ne fikola, ki je toksičen za celice.
6. Centrifugirali smo na 1700 rpm, 7 minut.
7. Odstranili smo supernatant, usedlini celic pa dodali sveže gojišče.
8. Celice smo prešteli s pomočjo invertnega svetlobnega mikroskopa in hemocitometra
9. Redčili smo jih na koncentracijo $2 \cdot 10^6/\mu\text{L}$ ter jih čez noč pustili v inkubatorju na 37 °C, 5 % CO₂.



Slika 8: Postopek izolacije limfocitov B.

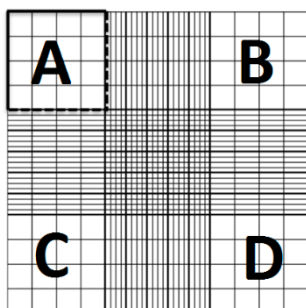
Zaradi večje specifične gostote so se eritrociti, granulociti, limfociti T in celice NK posedli na dno epruvete, pod plast fikola. Limfociti B so se nahajali nad plastjo fikola. Debelina plasti limfocitov B je odvisna od količine malignih limfocitov B v vzorcu. V supernatantu, nad plastjo limfocitov B, so se nahajali trombociti, PBS, krvna plazma in maščobe. Povzeto po (90).

3.1.5. Celični laboratorij

Za delo s celičnimi kulturami je potrebna posebna oprema, ki zagotavlja aseptično okolje. V prostor, v katerega smo vstopali v zato namenjeni halji in obutvi, je nameščena komora z laminarnim pretokom zraka (LAF komora) in vgrajenim HEPA filtrom (*angl. high efficiency particle*), ki odstranjuje kontaminante iz zraka. Pred delom v LAF komori smo le-to morali 20 minut obsevati z UV-svetlobo, ki je pobila mikroorganizme. Površino komore ter uporabljeno opremo, materiale ter rokavice smo pred uporabo razkužili še s 70 % etanolom (91).

3.1.6. Štetje celic

Celice smo šteli pod invertnim mikroskopom s pomočjo hemocitometra (Slika 9) in tripanskega modrila. Za štetje celic smo najprej pripravili 10 μL celične suspenzije in ji dodali 10 μL tripanskega modrila. Zmes smo dobro premešali s pipetiranjem in 10 μL prenesli na hemocitometer. Tripansko modrilo obarva mrtve in poškodovane celice modro, žive celice pa imajo intaktno membrano in zato ne vsebujejo tripana ter svetijo belo. Žive in mrtve celice smo prešteli v štirih vidnih poljih in po formuli izračunali število živih celic (Enačba 1). Za nadaljnje delo smo uporabili celične kulture z živostjo $\geq 90\%$ (91, 92, 93).



Slika 9: Hemocitometer.
Povzeto po (94).

Enačba 1: Enačba za računanje koncentracije celic s hemocitometrom (91).

$$\text{Število celic/mL} = \frac{A+B+C+D}{4} \cdot DF \cdot 10^4$$

A, B, C, D – število živih celic v posameznem polju hemocitometra
 DF – faktor redčenja

3.2. Določanje EC_{50} vrednosti

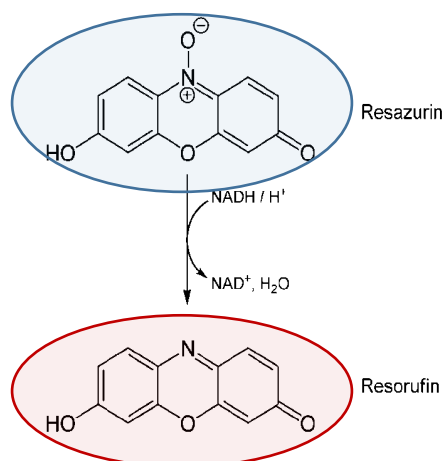
3.2.1. Izpostavitev celic PgE_1 -OH in test metabolne aktivnosti

Določanje EC_{50} vrednosti je potekalo v sodelovanju s Tjašo Štolfa (85), ki je le-te prav tako uporabljala za raziskavo v okviru svoje magistrske naloge. Pripravili smo presežek suspenzije celic KLL s koncentracijo $4 \cdot 10^5$ celic/mL, premešali in napipetirali na mikrotitrsko ploščico z 12 vdolbinicami. Celice v vsaki vdolbinici smo nato izpostavili naraščajočim koncentracijam PgE_1 -OH (1, 5, 10, 25, 50, 100 μM), v dve vdolbinici pa nismo dodali spojine. Prvi nismo dodajali ničesar (ta je predstavljala netretirano kontrolo), drugi pa 0,2 % DMSO

(netretirana kontrola topila). Iz vsake vdolbinice smo nato z multikanalno pipeto prenesli po 100 μ L alikvota na črno mikrotitrsko ploščico z 96 vdolbinicami. Uporaba črnih mikrotitrskih ploščic je nujna, saj smo merili fluorescenco. Za vsak alikvot smo naredili trojno tehnično ponovitev.

Mikrotitrške ploščice smo nato inkubirali za 21 h in 45 h v inkubatorju (37 °C, 5 % CO₂). Naslednji dan oziroma dva dni po izpostavitvi smo v vsako vdolbinico dodali 10 μ L reagenta PrestoBlue. Po nadaljnih treh urah smo na mikrotitrskem spektrofotometričnem čitalcu Safire Tecan genios pomerili fluorescenco pri 590 nm.

Testi metabolne aktivnosti so kolorimetrične metode, kjer je jakost fluorescence sorazmerna s številom metabolno aktivnih živih celic. Pri eksperimentalnem delu za magistrsko nalogo smo uporabljali reagent PrestoBlue, ki vsebuje barvilo resazurin (7-hidroksi-3H-fenoksazin-3-on-10-oksid). Moder resazurin se s pomočjo encima mitohondrijske reduktaze (NADPH, NADH) pretvori v rdeč resorufin (Slika 10), ki ga spektrofotometrično zaznamo na 590 nm.



Slika 10: Mitohondrijske reduktaze so sposobne moder resazurin reducirati v roza-rdeč resorufin.

Reakcija poteka samo v živih celicah. (95).

Enačba 2: Izračun metabolne aktivnosti celic.

$$\% \text{ metabolne aktivnosti} = 100 \times \frac{F(\text{vzorec}) - F(\text{slepa kontrola})}{F(\text{kontrola}) - F(\text{slepa kontrola})}$$

F – povprečje fluorescenc iz trojnika, vzorec – celice, izpostavljene poljubni koncentraciji agonista PgE₁-OH, slepa kontrola – 0,2 % DMSO v RPMI mediju brez celic, kontrola – celice brez dodatka PgE₁-OH

Žive celice so sposobne pretvarjati resazurin v resorufin, ki fluorescira, mrtve pa ne, saj njihovi encimi ne delujejo (96). Fluorescenco smo merili na mikrotitrskem čitalcu. Višje vrednosti fluorescence so pomenile žive oziroma metabolno bolj aktivne celice. Jakost fluorescence je bilo potrebno normirati na slepo kontrolo topila (0,2% DMSO V RPMI mediju), kar prikazuje Enačba 2. Najprej smo določili % metabolne aktivnosti pri vsaki koncentraciji, nato pa vrednosti prenesli v program GraphPad Prism, s pomočjo katerega smo izračunali srednjo efektivno koncentracijo EC₅₀.

3.3. Pretočna citometrija

3.3.1. Materiali in oprema

Preglednica VII: Seznam materialov in aparatur, potrebnih za delo s pretočnim citometrom.

Material/Aparatura	Proizvajalec
zaščitne rokavice iz lateksa	Kimberly-Clark
avtoklavirana ultra čista voda	
4 % formaldehid (20 ml formaldehida raztopimo v 30 ml demineralizirane vode)	
0,5 % Triton-X v PBS (250 µm 10% Tritona-X raztopimo v 50 ml PBS)	Sigma-Aldrich, MO, ZDA
3 % BSA v PBS (150 mg BSA raztopimo v 50 ml PBS)	Sigma-Aldrich, MO, ZDA
PBS (za 10 x PBS: 80 g NaCl, 2 g KCl 36,3 g, Na ₂ HPO ₄ *12H ₂ O 2,4 g, KH ₂ PO ₄ in dopolnimo H ₂ O dopolnimo do z ultračisto 1,0 L. Sestavine smo natehtali in jih raztopili v vodi, uravnali pH in avtoklavirali. Za 1 x PBS redčimo 1 : 10 z ultračisto vodo in avtoklaviramo)	
raztopina primarnih poliklonskih kunčjih protiteles proti C-terminalnemu delu humanega receptorja EP4; 1mg/mL	Cayman chemical, MI, ZDA
raztopina primarnih poliklonskih kunčjih protiteles proti N-terminalnemu delu humanega receptorja EP4, 1mg/mL	Biotech, Abington, VB
raztopina sekundarnih monoklonskih kozjih protiteles proti Fc regiji kunčjega IgG, konjugirano z barvilom Alexa Fluor®488; 2 mg/mL	Molecular probes, Eugene Oregon, ZDA
sterilne 1,5 in 2 mL mikrocentrifugirke (Flowtubes)	Invitrogen, ZDA
pipete 100-1000 µl, 20-200 µl, 0,5-10 µl, 0,1-2,5 µl	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
sterilni nastavki za pipete	Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija
vibracijski mešalnik (Vortex GENIE 2)	Scientific industries, Orlando, Florida, ZDA
centrifuga Centrifuge 5430 R	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
pretočni citometer FACS Calibur	Becton Dickinson, New Jersey, ZDA
Cell-Quest®software za obdelavo podatkov na FACS	Becton Dickinson, New Jersey, ZDA
PgE ₁ -OH	Cayman Chemical, MI, ZDA
PgE ₂	Cayman Chemical, MI, ZDA

Princip metode

(angl. *Flow Cytometry ali Fluorescence-Activated Cell Sorting – FACS*)

Pretočna citometrija je laserska tehnika, ki nam omogoča analizo fizikalnih in biokemičnih lastnosti posameznih celic. Celice v suspenziji potujejo skozi laserski snop svetlobe in pri tem oddajajo svetlobne signale, ki so odvisni od strukturnih značilnosti celic. Svetlobni žarek, ki zadane celico, se lomi ali odbije, lahko pa se tudi absorbira v določenih fluorokromih, ki nato izsevajo svetlobo večjih valovnih dolžin. Vsak detektor zazna določeno valovno dolžino - ker je le-teh več (pretočni citometer ima dva do štiri

fluorescenčne detektorje), lahko določamo več parametrov hkrati. Rezultat analize je dvoparametrski histogram, ki podaja granuliranost in velikost analiziranih celic (97, 98). Poleg velikosti in granuliranosti celic lahko s imunofluorescenčnim označevanjem celic določamo antigene na njihovi površini. Za določanje izbranega antigena uporabimo protitelesa konjugirana s fluorokromi (98). Pri magistrski nalogi smo določali ekspresijo receptorja EP4, za kar smo potrebovali primarno protitelo proti receptorju EP4 in sekundarno, ki je bilo označeno s fluorokromom. Analizo ekspresije receptorja EP4 smo opazovali po izpostavitvi nativnemu ligandu PGE₂ in spojini PgE₁-OH.

3.3.2. Analiza ekspresije receptorja EP4 po izpostavitvi spojinam

24 h pred meritvijo na pretočnem citometru smo celice izpostavili spojinam:

1. Pripravili smo presežek suspenzije limfocitov B s koncentracijo $1,0 \times 10^6$ celic/mL, premešali in napipetirali na mikrotitrsko ploščico z 12 vdolbinicami.
2. Celice v vsaki vdolbinici smo nato izpostavili izbranim koncentracijam sledečih spojin: 5 μ M PGE₂ in 5 μ M PgE₁-OH.
3. V eni vdolbinici smo pustili samo celice - ta je predstavljala kontrolo, drugi pa smo dodali 0,2 % DMSO – predstavlja kontrolo topila.
4. Mikrotitrsko ploščico smo nato inkubirali za 21h v inkubatorju (37 °C, 5 % CO₂).

Naslednji dan smo pripravili vzorec za meritev na pretočnem citometru:

5. Pripravili smo potrebne reagente (4 % formaldehid, 0,5 % Triton-X v PBS, 3 % BSA v PBS, PBS).
6. Prešteli smo celice ter pripravili celično suspenzijo celic z 1×10^6 celic; za vsak vzorec 2 centrifugirki; ena je za merjenje ekspresije, druga je kontrola;
7. centrifugirali smo 5 minut pri 1200 rpm in odstranili supernatant;
8. celice smo fiksirali s 500 μ L 4 % raztopine formaldehida (10 minut) ter vorteksirali;
9. centrifugirali smo 5 minut pri 2300 rpm, odstranili supernatant;
10. spirali smo z 1 mL PBS ter vorteksirali;
11. centrifugirali smo 5 minut pri 2300 rpm, odstranili supernatant
12. permeabilizirali smo celice s 500 μ L 0,5 % raztopino Tritona X-100 v PBS ter vorteksirali, da se membrana »naluknja« ter so vidni vsi; tudi jedrni EP4 receptorji (10 minut);
13. centrifugirali smo 5 minut pri 2300 rpm, odstranili supernatant;
14. spirali smo z 250 μ L PBS ter vorteksirali;
15. centrifugirali smo 5 minut pri 2300 rpm, odstranili supernatant;
16. celice smo inkubirali z 250 μ L 3 % raztopine BSA v PBS ter vorteksirali, da se prekrijejo nespecifična vezavna mesta (30 minut);
17. centrifugirali smo 5 minut pri 2300 rpm, odstranili supernatant;
18. spirali smo z 250 μ L PBS ter vorteksirali;

19. inkubirali smo s raztopino primarnih protiteles proti receptorju EP4 1:200 (125 μ L raztopine primarnih protiteles v 3 % raztopini BSA v PBS, 60 minut); ko smo dodali protitelesa, nismo več vorteksirali; v kontrolo nismo dodali protiteles;
20. centrifugirali smo 5 minut pri 2300 rpm, odstranili supernatant;
21. spirali smo z 1 mL PBS;
22. centrifugirali smo 5 minut pri 2300 rpm, odstranili supernatant;
23. v temi smo inkubirali obe centrifugirki z 250 μ L raztopine sekundarnih protiteles 1:5000 (250 μ L raztopine sekundarnih protiteles v 3 % raztopini BSA v PBS, 60 minut);
24. centrifugirali smo 5 minut pri 2300 rpm, odstranili supernatant;
25. spirali smo z 1 mL PBS;
26. centrifugirali smo 5 minut pri 2300 rpm, odstranili supernatant;
27. celice smo resuspendirali v 250 μ L svežega PBS;
28. analizirali smo s pretočnim citometrom.

3.4. Genotipizacija

3.4.1. Materiali in oprema

Preglednica VIII: Seznam materialov in aparaturov, potrebnih za genotipizacijo.

Material/Aparatura	Proizvajalec
komplet reagentov »MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit«	Epicentre, an Illumina company
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (10X)	Roche
LightSNiP rs4495224 Genotyping Assay	TIB MOLBIOL
LightSNiP rs7720838 Genotyping Assay	TIB MOLBIOL
zaščitne rokavice iz lateksa	Kimberly-Clark
HyClone voda	Thermo Fisher
96–100 % izopropanol	Merck, Nemčija
70 % etanol (Z avtoklavirano ultračisto vodo ustrezno razredčimo 96 % etilni alkohol)	ECP, d.o.o., Trzin, Slovenija
sterilne 1,5 in 2 mL mikrocentrifugirke (Flowtubes)	Invitrogen, ZDA
pipete 100-1000 μ l , 20-200 μ l, 0,5-10 μ l, 0,1-2,5 μ l	Eppendorf, Nemčija
sterilni nastavki za pipete (do 10, 200 in 1000 μ L)	Sarstedt, Nemčija
Nanodrop ND-1000 Spektrofotometer	NanoDrop Technologies Inc., ZDA
vibracijski mešalnik Bio Vortex V1	Biosan
centrifuga Centrifuge 5430 R	Eppendorf, Nemčija
minicentrifuga Mini Centrifuge MCF-2360	LMS
centrifuga Centric 322A	Tehtnica, Železniki
PCR analizator Lightcycler 480 II	Roche
PCR ploščice Lightcycler microwell 480	Roche
folija Lightcycler za zaščito	Roche
Delovna komora z UV lučko DNA/RNA UV Cleaner	Biosan

3.4.2. Izolacija DNA iz limfocitov B

Za izolacijo DNA iz predhodno shranjene pelete limfocitov B smo uporabili komplet reagentov »MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit« (Epicentre, an Illumina company). Izolacija temelji na metodi z izsoljevanjem (99), sledili smo navodilom proizvajalca (100). Izpustili smo le dodatek RNAze, saj lahko glede na njeno nestabilnost in razgradnjo z eksogenimi in endogenimi RNAzami sklepamo, da RNA v vsakem primeru razpade.

3.4.3. Merjenje koncentracije DNA in redčenje DNA

Koncentracijo izolirane DNA smo merili s pomočjo spektrofotometriškega aparata NanoDrop® ND-1000. Na optično vlakno, ki je nad napravo s svetlobno občutljivim detektorjem (*ang. Charge Coupled Device - CCD*) smo odpipetirali 1,5 µL vzorca (za slepi vzorec smo uporabili pufer iz kompleta za izolacijo, v katerem smo na koncu raztopili DNA). Nato smo zgornjo optično ročico, ki zagotavlja vir svetlobe, položili na spodnjo optično enoto. Ob stiku obeh optičnih enot z vzorcem je aparat iz vzorca oblikoval 1 mm stolpec, skozi katerega je potovala svetloba, CCD detektor pa je posnel intenziteto prepuščene svetlobe pri 260 nm, kjer ima DNA absorpcijski maksimum. Aparat nam je prav tako pomeril absorbanco pri 280 nm, nakar je podal razmerje A_{260} / A_{280} , ki mora pri ustrezno čistem vzorcu DNA znašati 1,8 ali več. Po vsaki meritvi smo pobrisali nanašalno površino in nanegli 1,5 µL novega vzorca (101).

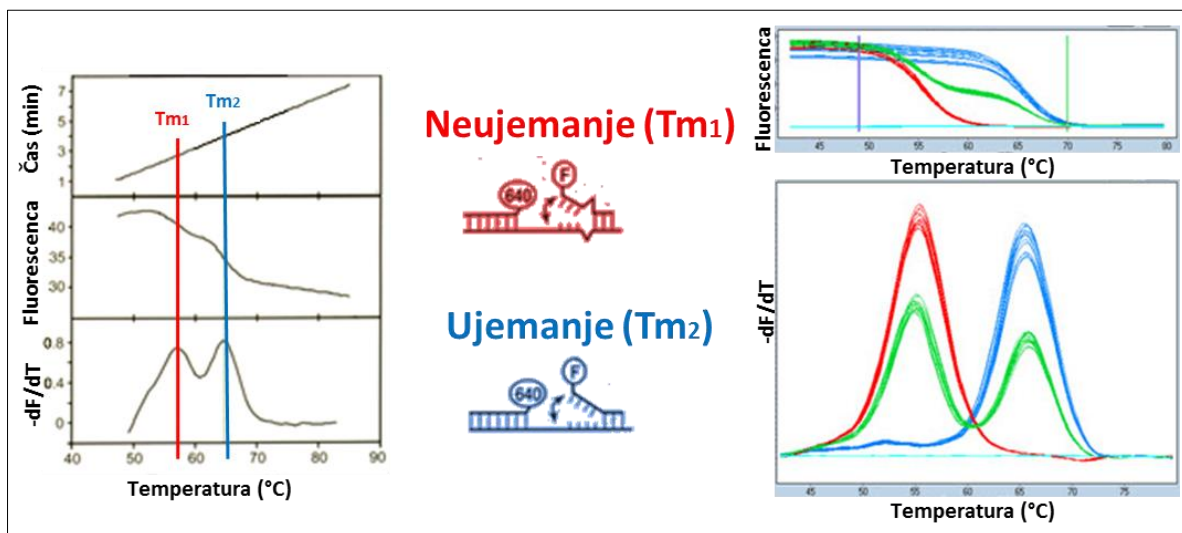
Za izvedbo genotipizacije smo pripravili delovne raztopine vzorcev s koncentracijami 10 µg/mL. Za redčenje smo uporabili HyClone vodo.

3.4.4. Določanje genotipov z analizo talilne krivulje DNA

Pri večini metod genotipizacije je potrebno odsek DNA, ki ga analiziramo, predhodno pomnožiti, kar lahko storimo z verižno reakcijo s polimerazo (*ang. polymerase chain reaction - PCR*). PCR je metoda *in vitro* sinteze nukleinskih kislin, s katero lahko v kratkem času sintetiziramo veliko število kopij določenega odseka DNA. PCR v realnem času je nadgradnja klasičnega PCR, imenovan tudi kvantitativni PCR, saj omogoča merjenje količine produkta v vsakem ciklu med samo reakcijo (102).

Analiza talilne krivulje DNA pri visoki ločljivosti (*ang. High-resolution melting analysis - HRM analiza*) je post-PCR tehnika, ki se uporablja za analizo polimorfizmov posameznega nukleotida (SNP). Po pomnožitvi zelenega odseka DNA se tvorijo različni dupleksi, ki so

posledica različnega prileganja probe in tarčne enoverižne DNA. Ti so različno temperaturno stabilni in tako dobimo več oblik talilnih krivulj DNA (Slika 11). Prednosti metode pred klasičnim sekvenciranjem in TaqMan hidrolizirajočimi sondami so predvsem njena cenovna dostopnost, preprostost, točnost in hitrost, zato je zelo uporabna pri personalizirani medicini (103).



Slika 11: Prikaz različnih grafov HRM analize v odvisnosti od temperature.

Dupleksi z nepopolnim ujemanjem so temperaturno manj stabilni, posledica česar je nižja temperatura taljenja (T_{m1}) v primerjavi z dupleksi, pri katerih je prisotno popolno ujemanje (T_{m2}). Prirejeno po (104).

Desno: Prva slika predstavlja različne talilne krivulje - modra in rdeča krivulja prikazujeta homozigota, zelena pa heterozigota. Na drugi sliki so prikazani različni talilni vrhovi, ki jih dobimo po integraciji prvega grafa – homozigoti imajo enojni vrh, heterozigoti pa dvojnega. Prirejeno po (105).

Princip HRM analize s SimpleProbe® tehnologijo

Prvi korak je pomnožitev tarčnega odseka DNA okoli lokacije SNP-ja s PCR v realnem času. Pomnožen odsek se imenuje amplicon, saj je nastal z amplifikacijo DNA. Reakcijska mešanica poleg osnovnih sestavin za PCR vsebuje še SimpleProbe® probo, ki je na 5' ali 3' koncu označena z nefluorescenčnim dušilcem in reporterskim fluoroforom, ponavadi fluoresceinom. Kadar je proba v reakcijski mešanici prosta, dušilec v večji meri prestra fluorescenco ekscitiranega reporterskega barvila. Ko se v fazi prileganja proba veže na tarčni odsek DNA, to povzroči porast fluorescence reporterskega barvila, saj se z vezavo probe zmanjša prestražanje fluorescence s strani dušilca (106, 107).

HRM analiza poteka v treh stopnjah;

1. Dvig temperature na 95 °C povzroči denaturacijo dvoverižnih ampliconov DNA v enoverižne amplicone DNA.

2. Prileganje probe pri 40°C - tvorijo se duplesi med probo in tarčno enoverižno DNA. SimpleProbe® proba je oblikovana tako, da se popolnoma prilega bodisi mutiranemu bodisi nemutiranemu homozigotu, zaradi česar so talilne krivulje oziroma vrhovi pri različnih genotipih različni (Slika 11). Pri enem tipu homozigota je v duplesu prisotno popolno ujemanje probe in tarčne enoverižne DNA, pri drugem tipu homozigota pa ne. Pri heterozigotu se tvorita oba tipa duplesov, zato lahko na grafu vidimo dva talilna vrhova, ki predstavljata dve T_m.

3. Postopno dvigovanje temperature (40 °C →75 °C): razklenitev probe in tarčne enoverižne DNA in postopen upad fluorescence, ki je razviden iz talilne krivulje. Temperaturi, pri kateri se razkrene polovica duplesov, pravimo temperatura taljenja (*ang. melting temperature* - T_m) in jo lahko odčitamo iz grafa kot 50 % fluorescence. Če graf talilne krivulje negativno logaritmiramo dobimo graf talilnega vrha (106, 107).

Postopek

Pri postopku smo sledili priporočenim navodilom, priloženim kompletu reagentov »LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe« (108). V delovni komori smo v 1,5 mL epruvetki pripravili reakcijsko zmes MasterMix HybProbe (10X) brez vzorčne DNA. V vialo, ki je vsebovala DNA polimerazo, smo prenesli vsebino vial z reakcijskim pufrom in rahlo premešali s pipeto. V epruvetko smo nato prenesli preračunan volumen reakcijske zmesi MasterMix HybProbe (10X), dodali MgCl₂, probo (LightSNiP rs4495224 ali rs7720838 Genotyping Assay) ter ultra čisto vodo. Glede na število vzorcev, ki smo jih genotipizirali, smo količino posameznih sestavin reakcijske zmesi pomnožili s številom vzorcev in prišteli še 10 % pribitek zaradi izgub pri pipetiranju. Pripravljeno reakcijsko zmes smo premešali in kratko centrifugirali. Po 8 µL reakcijske zmesi brez vzorčne DNA smo napipetirali v mikroepuvetke na posebni ploščici za genotipizacijo (PCR ploščica Lightcycler microwell 480). Nato smo dodali še 2 µL vzorčne DNA s koncentracijo 4 ng/µL. Sestava reakcijske zmesi enega vzorca je navedena v Preglednici IX.

Preglednica IX: Sestava reakcijske zmesi enega vzorca za PCR in HRM analizo.

Sestavine	Volumen (µL)
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (10X)	1
LightSNiP * Genotyping Assay	0,3
Ultra čista voda	5,9
MgCl ₂ (25 mM)	0,8
Vzorčna DNA (4 ng/µL)	2
Skupni volumen reakcijske zmesi enega vzorca	10

*- rs4495224 ali rs7720838

Ploščico smo na koncu prekrili s posebno folijo, jo centrifugirali 4 min pri 1900 obratih/min in nato vstavili v aparat LightCycler® 480 System (Roche), ki je izvedel PCR v realnem času ter HRM analizo po vnaprej določenem programu (Preglednica X). Rezultat analize so talilne krivulje posameznega vzorca, ki jih program avtomatsko integrira in tako dobimo talilne vrhove, ki se razlikujejo glede na genotip vzorca (Slika 11).

Preglednica X: Program izvedbe PCR in HRM analize.

Stopnja	Temperatura (°C)	Čas
Preinkubacija	95	10 min
PCR (45 ciklov)	Denaturacija	95
	Prileganje začetnikov	60
	Podaljševanje	72
HRM analiza	Denaturacija	95
	Prileganje probe	40
	Taljenje	40 → 75
Hlajenje	40	+ 0,19 °C/s 30 s

Podatke, pridobljene s analizo talilne krivulje smo še dodatno validirali tako, da smo 20 vzorcev pri vsakem od SNP-jev poslali na sekvenciranje in preverili ali so se genotipi skladali z določenimi. Skladanje je bilo 100 %.

3.5. Analiza izražanja genov

3.5.1. Materiali in oprema

Preglednica XI: Seznam materialov in aparatov, potrebnih za analizo izražanja genov.

Material/Aparatura	Proizvajalec
komplet reagentov Pure Link™ RNA Mini Kit	Life technologies, ZDA
zaščitne rokavice iz lateksa	Kimberly-Clark
Voda brez RNAz	
komplet reagentov High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, ZDA
RNAza inhibitor	Applied Biosystems, ZDA
Trizol® reagent	Life technologies, ZDA
70 % etanol (Z avtoklavirano ultračisto vodo razredčimo 96 % etilni alkohol)	ECP, d.o.o., Trzin, Slovenija
sterilne 0,5, 1,5 in 2 mL mikrocentrifugirke	Invitrogen, ZDA
pipete 100-1000 µl, 20-200 µl, 0,5-10 µl, 0,1-2,5 µl	Eppendorf, Nemčija
sterilni nastavki za pipete (do 10, 200 in 1000 µL)	Sarstedt, Nemčija
nanodrop ND-1000 Spektrofotometer	NanoDrop Technologies Inc., ZDA
vibracijski mešalnik Bio Vortex V1	Biosan
centrifuga Centrifuge 5430 R	Eppendorf, Nemčija
minicentrifuga Mini Centrifuge MCF-2360	LMS
centrifuga Centric 322A	Tehtnica, Železniki
ciklični termostat peqSTAR	peqlab
PCR analizator Lightcycler® 480 II	Roche

PCR ploščice Lightcycler® microwell 480	Roche
folija Lightcycler® za zaščito	Roche
TaqMan® Assay (Mm00436053_m1)	Applied Biosystems, ZDA
LightCycler® 480 Probes Master Mix (2x)	Roche
SYBR™ Select Master Mix	Life technologies, ZDA
Delovna komora z UV lučko DNA/RNA UV Cleaner	Biosan

3.5.2. Izolacija RNA iz limfocitov B

Pri postopku izolacije smo sledili priporočenim navodilom, priloženim kompletu reagentov »PureLink® RNA Mini Kit« (109). Pri izolaciji limfocitov B smo za potrebe izolacije RNA odmerili 3 milijone celic, jih centrifugirali, odstranili medij in jim dodali 0,5 ml reagenta trizola, ki vsebuje fenol in gvanidijev izotiocinat. Nato smo vzorce shranili na -80°C do izolacije RNA.

Prvi korak izolacije RNA je bila 5-minutna inkubacija na sobni temperaturi, nakar smo zamrznjenim celicam dodali 200 µl kloroforma in po 15 sekundah stresanja ponovno inkubirali 3 minute. S 15-minutnim centrifugiranjem na 1200 g pri 4 °C smo dosegli popolno fazno ločitev. DNA je bila raztopljena v spodnji, roza fenolni fazi (organski fazi), RNA v zgornji vodni fazi, proteini pa so se oborili v plast med obema fazama. Zgornjo vodno fazo smo prenesli v svežo epico, dodali ekvivalenten volumen 70 % etanola, vorteksirali in mešali s preobračanjem, da so se raztopili vsi vidni delci. Centrifugo smo ogreli na sobno temperaturo. Celoten volumen raztopine smo prenesli na RNA centrifugalni filter, centrifugirali na 12.000 g, 30 sekund. Zavrgli smo eluat, ki je stekel skozi filter v zbiralno tubico. Dodali smo 700 µl spiralnega pufra I, centrifugirali na 12.000 g, 30 sekund. Zavrgli smo eluat in centrifugalni filter vstavili v novo zbiralno tubico. Dodali smo 500 µl spiralnega pufra II, centrifugirali na 12.000 g, 30 sekund, zavrgli eluat in naveden korak ponovili. Da smo osušili membrano z RNA, smo centrifugirali eno minuto na 12.000 g. Zbiralno tubico z eluatom smo zavrgli ter vstavili centrifugalni filter v obnovitveno centrifugirko, dodali 30 µl vode brez RNAz in inkubirali dve minuti. Centrifugirali smo na 14.000 g za dve minuti, eluirano raztopino RNA smo ponovno nanesti na centrifugalni filter ter ponovili zadnji korak. Koncentracijo RNA smo pomerili na spektrofotometriškem aparatu NanoDrop® ND-1000, uporaba le-tega je opisana v poglavju o izolaciji DNA. Željeno razmerje A_{260} / A_{280} za čisto RNA je okoli 2 (101).

3.5.3. Obratno prepisovanje

V majhne cetrifugirke smo napipetirali 10 µl mešanice za obratni prepis in 10 µl vzorca RNA ter rahlo centrifugirali na ročni centrifugi. Sestavo reakcijske mešanice prikazuje Preglednica XII, pogoje reakcije pa Preglednica XIII. Do začetka prepisa v PCR smo hranili na ledu. Centrifugirke smo inkubirali v cikličnem termostatu peqSTAR. Po končanem prepisu smo vzorce cDNA hranili na -20°C.

Preglednica XII: Sestava reakcijske zmesi enega vzorca za obratni prepis.

Sestavine	Volumen (µL)
pufer reverzne transkriptaze	2,0
raztopina dNTPjev (deoksiribonuklotid trifosfatov)	0,8
naključni oligonukleotidni začetniki	2,0
reverzna transkriptaza (Multiscribe™)	1,0
inhibitor RNAze	1,0
destilirana voda brez RNAz	3,2
Vzorec RNA	10

Preglednica XIII: Pogoji reakcije prepisovanja RNA v cDNA

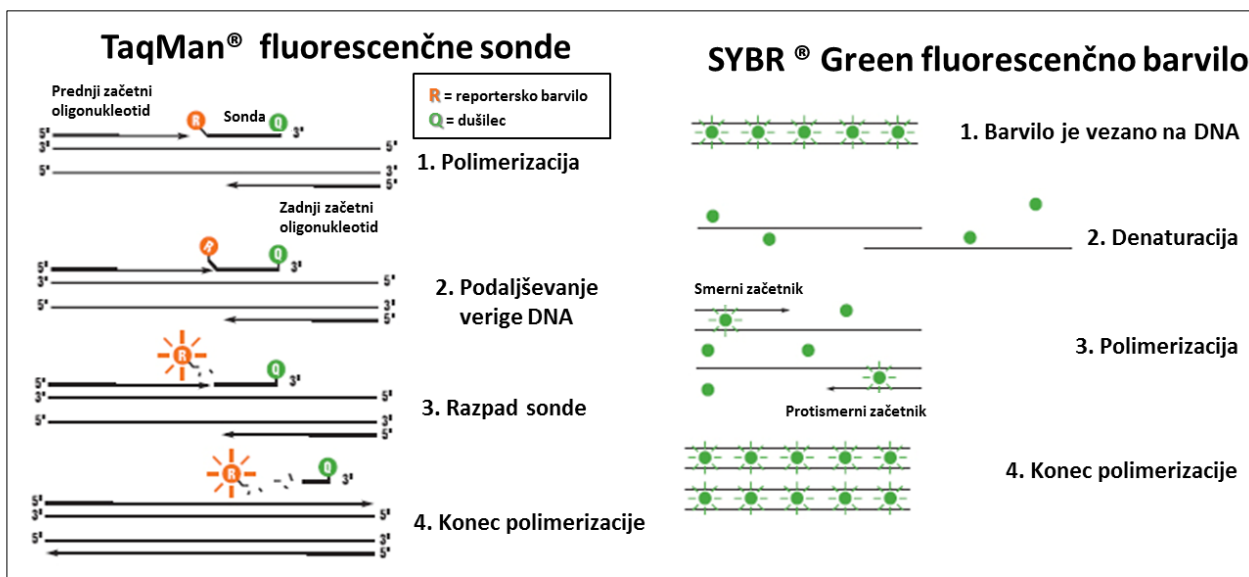
	Temperatura (°C)	Čas
Korak 1	25	10 min
Korak 2	37	120 min
Korak 3	95	5 min
Korak 4	4	∞

3.5.4. Kvantitativni PCR v realnem času

Izvedli smo reakcijo PCR, ki temelji na principu klasične verižne reakcije s polimerazo, le da nam dodatno omogoča tudi kvantitativno sledenje pomnoženega zaporedja. Pri kvantitativni detekciji smo uporabljali dva različna načina za detekcijo pomnoženih kopij cDNA; detekcijo s TaqMan® fluorescenčnimi sondami ter SYBR® Green fluorescentnim barvilom (Slika 12). Prvi način detekcije je specifičen, saj se Tagman® sonda specifično veže na odsek DNA, ki ga želimo pomnožiti, drugi pa nespecifičen - SYBR® barvilo se nespecifično vgradi v DNA, ki se pomnožuje (109, 110).

Postopek

Za vsako izvedbo reakcije PCR smo pripravili reakcijsko zmes, ki je zapisana v Preglednici XIV. Skupno reakcijsko zmes brez vzorčne cDNA smo zmešali v 1,5 mL epruveti, zaradi izgub pri pipetiranju smo količino povečali za 10 %. Po 6 oziroma 7 µL reakcijske zmesi brez vzorčne DNA smo napipetirali v mikroepruvetke na posebno ploščico (PCR ploščica Lightcycler microwell 480). Nato smo dodali še 4 oziroma 3 µL vzorčne cDNA. Vse reakcije smo izvedli v trojniku.



Slika 12: Princip pomnoževanja dveh uporabljenih načinov detekcije PCR produktov – TaqMan® sonde ter SYBR® Green barvilo (109).

Pri fluorescenčnih (hidrolizirajočih) Taqman® sondah izkoriščamo 5' - eksonukleazno aktivnost Taq DNA polimeraze. V reakcijsko zmes dodamo dvojno označeno sondo, ki ima na obeh koncih vezana različna fluorofora – na 5' koncu je vezano reportersko barvilo, ki fluorescira, na 3' pa dušilec, ki fluorescenco prepreči. V stopnji podaljševanja 5' – eksonukleazna aktivnost Taq DNA polimeraze povzroči hidrolizo na tarčno zaporedje vezane sonde. Razdalja med reporterskim barvilom in dušilcem se poveča in preprežanje fluorescence je onemogočeno. Ob enem naraste fluorescenca reporterskega barvila, ki je sorazmerna količini pomnoženega PCR produkta. Dušilcev mehanizem preprežanja fluorescence reporterja se imenuje fluorescenčni prenos resonančne energije (ang. fluorescence resonance energy transfer - FRET) in temelji na prenosu energije med donorskim in akceptorskim kromoforom (110). Pri detekciji s SYBR® Green fluorescenčnim barvilom se le-to nespecifično veže na vse dvojnivijske molekule ter s tem povzroči emitiranje fluorescence. Reakcija mešanica vsebuje barvilo, ki se ne veže na enovivijsko cDNA. Ko poteka PCR reakcija nastajajo dvoverižni produkti, v katere se barvilo veže in šele takrat postane fluorescentno. Nastala fluorescenca je sorazmerna količini pomnoženega PCR produkta (111).

Preglednica XIV: Sestava reakcijske zmesi vzorca za PCR analizo pri analizi genov Ptger4, Gadph, Rplp0.

<i>Ptger4</i>	Volumen (µL)	<i>Gadph</i>	Volumen (µL)	<i>Rplp0</i>	Volumen (µL)
TaqMan® Assay za PTGER4	0,5	SYBR™ Select Master Mix	5	SYBR™ Select Master Mix	5
LightCycler® 480 Probes Master (2x)	5	F – začetnik 20 µM	0,05	F – začetnik 20 µM	0,05
		R – začetnik 20 µM	0,05	R – začetnik 20 µM	0,05
Ultra čista voda	0,5	Ultra čista voda	1,9	Ultra čista voda	1,9
cDNA	4	cDNA	3	cDNA	3

Ploščico smo na koncu prekrili s posebno folijo, jo centrifugirali 4 min pri 1900 obratih/min in nato vstavili v aparat LightCycler® 480 System (Roche). Program izvedbe analize za posamezno detekcijo je prikazan v Preglednicama XV in XVI. Taqman® sonde smo

uporabili za določanje količine gena *Ptger4*, SYBR™ tehnologijo pa za referenčne gene (*Gadph*, *Tbp*, *Actb*, *Gadph*, *Gusb*, *Rplp0*, *Rplp-13a* in *18s-rna*).

Preglednica XV: Program izvedbe kvantitativne PCR analize za TaqMan® sonde.

Stopnja		T (°C)	Čas
Preinkubacija (aktivacija TaqMan® polimeraze in denaturacija cDNA)		95	5 min
PCR (45 ciklov)	Denaturacija	95	15 min
	Prilagajanje začetnikov	60	20 s
	Podaljševanje	72	1 min
Hlajenje			

Preglednica XVI: Program izvedbe kvantitativne PCR analize za SYBR™ barvilo.

Stopnja		T (°C)	Čas
Preinkubacija (aktivacija polimeraze in denaturacija cDNA)		95	5 min
PCR (45 ciklov)	Denaturacija	95	15 min
	Prilagajanje začetnikov	60	20 s
	Podaljševanje	72	1 min
Taljenje		65 → 97	
Hlajenje			

3.5.5. Standardizacija na referenčni gen

Za relativno določitev vsebnosti cDNA, ki jo preučujemo, je potrebno meriti še vsebnost cDNA nekega endogenega standarda, za katerega je značilna konstantna raven izražanja v vseh poskusnih vzorcih. S tem izničimo vplive variabilnosti uporabljenih naprav in priprave vzorcev – to zagotavlja, da bo variacija v količini genetskega materiala pri hišnem genu enako kot pri proučevanem. Tej zahtevi odgovarjajo osnovni metabolni geni, ki so vključeni v esencialne procese, potrebne za preživetje celice, njihovo izražanje pa mora biti stabilno in neregulirano (111). Raven endogenega standarda nam služi kot referenčna vrednost, na katero nominiramo vsebnost tarčne cDNA.

Standardizacijo na referenčni gen je potrebno opraviti pred vsako analizo izražanja genov. Na podlagi pogoste uporabe za podobne raziskave, smo analizirali potencialne hišne gene: *Gadph*, *Tbp*, *Actb*, *Gadph*, *Gusb*, *Rplp0*, *Rplp-13a* in *18s-rna*. Na 33 poljubnih vzorcih smo preizkusili, kateri od potencialnih genov nam daje najbolj konsistentno raven izražanja in nato z algoritmom NormFinder® izbrali kombinacijo dveh: *Gadph* ter *Rplp0*, izračunali njuno geometrijsko sredino in to delili z vrednostjo ekspresije *Ptger4*.

3.6. Statistična obdelava podatkov

Podatke smo statistično vrednotili s programoma Excel in GraphPad Prism. Kot statistično značilne rezultate smo privzeli tiste, kjer je bila $p < 0,05$.

Pred izvajanjem statističnih testov povezanosti in korelacije je bilo potrebno preveriti, če se numerične spremenljivke (vrednost EC_{50} , ekspresija gena *Ptger4*) normalno porazdeljujejo. Navedeno smo testirali s testom normalnosti (D'Agostino & Pearson in Shapiro-Wilk). Po testiranju normalnosti porazdelitve smo izvedli parametrične teste (t-test, ANOVA) ter analizo korelacije. Logaritmirane vrednosti EC_{50} se sicer niso normalno porazdeljevale, vendar smo se zaradi dovolj velika števila vzorcev odločili za uporabo parametričnih testov.

3.6.1. Hardy Weinbergovo načelo (HW načelo)

Pred primerjanjem frekvenc populacij pri porazdelitvi genotipov ali alelov, ki imajo določeno mutacijo, smo morali izračunati, ali se le-te nahajajo v Hardy Weinbergovem ravnotežju. HW ravnotežje nam pove, ali so uporabljeni vzorci reprezentativni za splošno slovensko populacijo. Najprej je bilo potrebno izračunati dejanske alelne frekvence za alel X in alel Y (Enačba 3 in 4), iz njih pa število pričakovanih posameznikov z ustreznim genotipom XX, XY ali YY (Enačba 5, 6, 7). Nato smo dejansko in pričakovano število posameznikov z ustreznim genotipom primerjali med sabo. Uporabili smo Fisherjev natančni test, ki je dostopen na spletni strani GraphPad Quick Calcs (112). Če dobljena vrednost p presega izbrano stopnjo tveganja ($\alpha = 0,05$) rečemo, da je kontrolna skupina v skladu z HW ravnotežjem. H-W ravnotežja sledi binomskemu pravilu $(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$, pri katerem $(p+q)^2$ izhaja iz $p + q = 1$, ki velja ker ima kromosom 2 alela (113).

Enačba 3-7: Enačbe za izračun alelnih frekvenc.

$$p = \frac{2n_{XX} + n_{XY}}{2N} \quad (3)$$

$$q = \frac{2n_{YY} + n_{XY}}{2N} \quad (4)$$

$$\text{pričakovano število (XX)} = p^2 N \quad (5)$$

$$\text{pričakovano število (XY)} = 2pqN \quad (6)$$

$$\text{pričakovano število (YY)} = q^2 N \quad (7)$$

p - frekvenca alela X v populaciji; *q* - frekvenca alela Y v populaciji; *N* - število vseh preiskovancev;
n_{XX}, *n_{XY}* in *n_{YY}* - število posameznikov z genotipi XX, XY, YY

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

Kronična limfocitna levkemija (KLL) je v zahodnih državah najbolj pogosto hematološko maligno obolenje med odraslimi (4). Bolezen se med bolniki izredno razlikuje v razvoju bolezni, prognozi ter odzivu na terapijo. V predhodnih raziskavah so receptor EP4 ovrednotili kot potencialno tarčo za zdravljenje KLL (58, 76). V magistrski nalogi smo želeli ugotoviti, kaj bi lahko bili potencialni vzroki inter-individualnih razlik pri bolnikih s KLL in kaj vpliva na heterogen odziv na potencialno protirakavo spojino PgE₁-OH *in vitro*.

V prvem delu magistrske naloge smo na celicah darovalcev farmakološko ovrednotili *in vitro* aktivnost PgE₁-OH ter potrdili potencial receptorja EP4 in njegovega selektivnega agonista PgE₁-OH za zdravljenje KLL. Izpostavili smo podskupine, pri katerih ima omenjeni potencialno najbolj citotoksičen učinek. Nadalje nas je zanimalo, ali mutacije v bližini promotorja gena *Ptger4*, ki kodira za prostaglandinski receptor EP4, vplivajo na večjo pojavnost bolezni. Preverili smo tudi, ali so izolirane celice bolnikov s prisotno mutacijo različno občutljive na spojino PgE₁-OH. Ovrednotili smo še pomen ekspresije gena *Ptger4*, saj bi lahko predstavljal prognostični biomarker za KLL, in raziskali, ali imajo prej omenjene mutacije vpliv na ekspresijo receptorja EP4. Navedene ugotovitve smo povezali z demografskimi podatki in tako ovrednotili, ali mutacije v genu *Ptger4* ali ekspresija omenjenega korelirajo s spolom ter starostjo bolnikov.

Iz kliničnega oddelka za hematologijo Interne klinike UKCL smo pridobili vzorce bolnikov, ki jim je bila diagnosticirana KLL. Bolniki so pred odvzemom vzorca polne krvi privoli v sodelovanje v raziskavi št. 93/12/10, ki je bila predhodno odobrena s strani Komisije RS za medicinsko etiko (KME).

V sklopu magistrske naloge smo v analize vključili 159 bolnikov, 92 moških in 67 žensk, ki so sodelovali v klinični študiji. Povprečna starost ob prvem odvzetju vzorca je bila 69 let. Večino preiskovane kohorte predstavljajo moški (58%), pri ženskah se bolezen redkeje pojavlja, kar je v skladu tako s slovensko literaturo kot mednarodnimi prevalenčnimi podatki (7, 114).

4.1. Celice KLL smo izolirali s postopkom RosetteSep®

Za potrebe nadaljnjih eksperimentov in ustvarjanja biobanke smo morali iz vzorca polne krvi bolnikov izolirati maligno spremenjene limfocite B oziroma celice KLL. Poleg celic smo shranjevali tudi DNA in RNA ter na tak način dopolnjevali obstoječo biobanko vzorcev. V II. delu študije od oktobra 2015 do februarja 2016 smo pridobili 66 novih vzorcev.

I. *IN VITRO* VREDNOTENJE UČINKOVITOSTI PGE₁-OH

4.2. Spojina PgE₁-OH ima citotoksičen učinek na izolirane celice KLL, ki je časovno odvisen

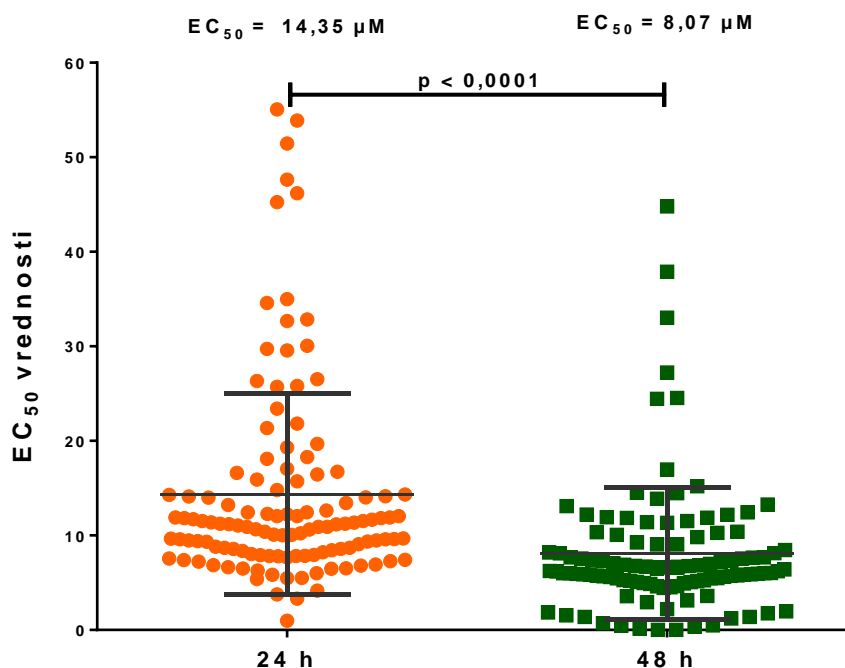
V predhodnih raziskavah je bilo prikazano, da so citotoksični učinki nativnega liganda prostaglandinskega receptorja PGE₂ posledica delovanja na receptor EP4 (46, 53). Citotoksičnost je rezultat delovanja dveh signalnih poti – prva je aktivacija cAMP-odvisne poti, druga pa inhibicija translacije NF-κB (46, 115). V nadaljnih *in vitro* eksperimentih z izoliranimi celicami KLL je bil selektivni agonist PgE₁-OH bolj citotoksičen kot nativni ligand PGE₂, prikazali pa so tudi njegovo bolj selektivno delovanje na EP4 kot ostale na prostaglandinske receptorje (EP1, EP2, EP3). Izolirane celice KLL so bile izpostavljene endogenemu ligandu PGE₂ ter spojini PgE₁-OH. 24 h po izpostavitvi PgE₁-OH se je živost celic znižala na 33 %, po izpostavitvi enaki količini PGE₂, ki deluje na vse štiri tipe prostaglandinskih E2 receptorjev (EP1-4), pa je bila živost celic 88 % (58). Selektivno citotoksično delovanje selektivnega modulatorja receptorja EP4 - PgE₁-OH smo želeli ovrednotiti tudi mi in sicer na novo pridobljenih vzorcih v okviru klinične študije.

Na novo zbranih vzorcih bolnikovih smo potrdili predhodno opisan citotoksični učinek. Celice so imele pred izpostavitvijo vsaj 90 % viabilnost. 24 h in 48 h po izpostavitvi različnim koncentracijam omenjene spojine smo s pomočjo testa PrestoBlue ocenili metabolno aktivnost celic. Vrednost EC₅₀ (*ang. half maximal effective concentration*) predstavlja koncentracijo PgE₁-OH, pri kateri je bil izmerjen učinek, podan kot upad metabolne aktivnosti celic KLL za 50 %. Po obdelavi podatkov smo izračunali aritmetično sredino vrednosti EC₅₀ - povprečje EC₅₀ vrednosti analiziranih novih 75 vzorcev 24 h po izpostavitvi je bilo $12,31 \pm 6,28 \mu\text{M}$. Po 48 h smo izračunali EC₅₀ vrednosti 64 vzorcev, povprečje le-teh pa je znašalo $7,67 \pm 5,85 \mu\text{M}$. Nižje EC₅₀ vrednosti smo opazili po 48 h; daljša izpostavljenost spojini PgE₁-OH je imela bolj citotoksični učinek na celice; EC₅₀ vrednosti so se povprečno zmanjšale za 38 %, razlika med 24 h in 48 h izpostavitvijo pa je bila statistično značilna ($p < 0,0001$), kar potrjuje že prej opaženo časovno odvisnost v odzivu na PgE₁-OH.

EC₅₀ vrednosti, ki smo jih dobili z našimi testiranjmi, se skladajo s prejšnjimi (Preglednica XVII). Tekom celotne klinične študije je bilo analiziranih 121 vzorcev bolnikov 24 h po izpostavitvi PgE₁-OH; povprečna EC₅₀ vrednost je bila $14,35 \pm 10,63 \mu\text{M}$ in 110 vzorcev 48 h po izpostavitvi, kjer smo izračunali povprečno EC₅₀ vrednost $8,07 \pm 6,99 \mu\text{M}$. Nekateri

bolniki so se ponovili (12 bolnikov), v nadaljnih analizah pa so uporabljene EC_{50} vrednosti, ki smo jih določili ob prvem odvzemu krvi ter izolaciji celic KLL.

Na Sliki 13 so grafično predstavljeni podatki EC_{50} , ki sem jih v okviru magistrske naloge analizirala, združeni s podatki, pridobljenimi v okviru magistrskih nalog Maše Vidmar (58) in Tjaše Štolfa (85), v Prilogi 1 pa se nahaja celoten seznam vseh EC_{50} vrednosti.



Slika 13: EC_{50} vrednosti bolnikovih celic 24 h in 48 h po izpostavitvi PgE_1-OH . Učinki PgE_1-OH so časovno odvisni; vrednosti EC_{50} , ki smo jih dobili 24 h in 48 h po izpostavitvi se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,0001$). Za analizo smo uporabili neparni t-test.

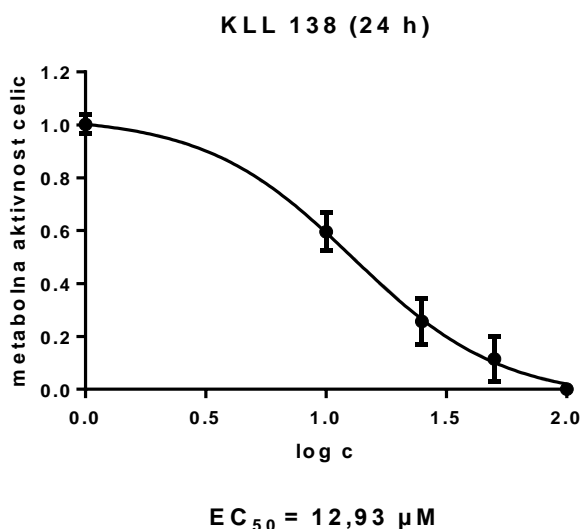
Preglednica XVII: Povprečne EC_{50} vrednosti.

čas	I. del študije (58)		II. del študije		združene vrednosti	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
št.vzorcev	51	51	75	64	121	110
povprečje EC_{50}	17,3 μM	8,5 μM	12,31 μM	7,67 μM	14,35 μM	8,07 μM

4.3. Citotoksični učinki PgE_1-OH so koncentracijsko odvisni

V skladu s prejšnjimi testiranjmi (58), smo tudi mi zabeležili s koncentracijo PgE_1-OH povezan upad metabolne aktivnosti celic KLL. Večanje koncentracije PgE_1-OH je vodilo v večje citotoksične učinke. Dejstvo, da so učinki potencialne antitumorne spojine PgE_1-OH

koncentracijsko in časovno odvisni, je pomembno tudi s stališča terapije, saj lahko pomaga pri prilagajanju optimalnega terapevtskega odmerka. Prikazan graf na Sliki 14 predstavlja reprezentativen primer padanja metabolne aktivnosti v odvisnosti od koncentracije. Ostali grafi so v Prilogi 3.



Slika 14: Citotoksični učinek PgE₁-OH je koncentracijsko odvisen.

Izolirane maligne limfocite B oziroma celice KLL ($4 \cdot 10^5$ celic/mL) smo izpostavili naraščajočim koncentracijam PgE₁-OH (1 μM, 5 μM, 10 μM, 25 μM, 50 μM, 100 μM) in jih pustili delovati 24 h oziroma 48 h. Po pretečenem času smo merili metabolno aktivnost celic s testom PrestoBlue. Pomerjeno fluorescenco smo normirali na netretirano kontrolo, ki je bila v našem primeru topilo (0,2 % DMSO v RPMI mediju) za spojino PgE₁-OH. Poskus je bil izveden v trojniku.

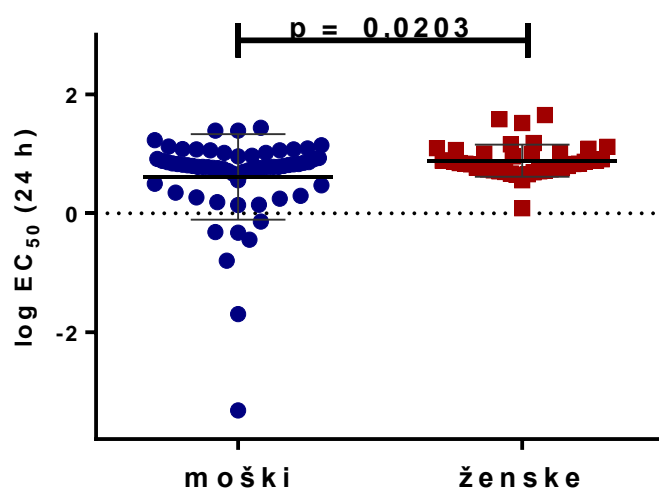
4.4. Inter-individualna variabilnost v odzivu na PgE₁-OH

Spojina PgE₁-OH je imela citotoksičen učinek na izoliranih celicah KLL, odziv pa je bil koncentracijsko in časovno odvisen. Določene vrednosti EC₅₀ so navedene v Prilogi 1, kjer lahko vidimo, da se je odziv na delovanje PgE₁-OH med celicami bolnikov s KLL zelo razlikoval (EC₅₀ vrednosti so v območju od 0,02 μM do 55,07 μM). Razlogov za veliko inter-individualno variabilnost bi lahko bilo veliko. V naslednjih poglavjih smo poskušali raziskati, kako je inter-individualni odziv na PgE₁-OH povezan s spolom (poglavje 4.3.1.), starostjo darovalcev (poglavje 4.3.2.), mutacijama rs4495224 in rs7720838 (poglavje 4.4.1.) ter ekspresijo gena *Ptger4* (poglavje 4.5.). Številni prognostični faktorji in biološki označevalci pri KLL želijo pojasniti izredno heterogeno doživljanje bolezni in razvrščajo bolnike v bolj ali manj rizične skupine – med te sodijo genetske nepravilnosti (npr. 17p/TP53 delecija ali mutacija), biokemijske nepravilnosti (ZAP-70+) ali bolnikove značilnosti (starost, spol) (28). Ker navedene značilnosti še vedno ne morejo pojasniti izredno

heterogene klinične slike bolnikov, se iskanje novih prognostičnih kazalcev nadaljuje. Tako je tudi nas v sklopu raziskave zanimalo, ali lahko detektiramo nove prognostične biomarkerje. Z ugotovljeno povezavo med KLL in prej navedenimi dejavniki bi namreč lahko bolje napovedali potek bolezni ali se odločili za smotrnejšo uporabo terapije. S pomočjo analiz odvisnosti občutljivosti na PgE₁-OH od spola, starosti, polimorfizmov in ekspresije gena *Ptger4* smo lahko napovedali učinkovitost potencialne protirakave spojine PgE₁-OH v izbranih podskupinah.

4.4.1. PgE₁-OH je bolj citotoksičen pri celicah moških bolnikov s KLL

Ugotovili smo, da ima spojina PgE₁-OH citotoksičen učinek na izolirane celice darovalcev, nadalje pa nas je zanimalo, ali obstajajo od spola odvisne razlike v omenjenem učinku. Povprečna EC₅₀ vrednost vseh darovalcev je bila 14,35 μM (24 h), ko pa smo te razdelili glede na spol, smo opazili, da imajo celice moških darovalcev nižje EC₅₀ vrednosti: 14,16 ± 1,33 μM v primerjavi z ženskami; 17,64 ± 2,07 μM (24 h). Moške celice so bile tako bolj občutljive na testirano spojino, razlika med logaritmiranimi vrednostmi pa je statistično značilna (p = 0,0203). Slika 15 prikazuje učinek PgE₁-OH v odvisnosti od starosti.



Slika 15: Citotoksični učinek PgE₁-OH in vitro je izrazitejši pri moški kot pri ženski populaciji in vitro. Za analizo smo uporabili neparni t-test (p = 0,0203). Povprečna log vrednost EC₅₀ celic moških darovalcev je bila 14,16 ± 1,33 μM (N = 65) v primerjavi z ženskami; 17,64 ± 2,07 μM (N = 43), log vrednosti EC₅₀ pa 0,61 ± 0,08 μM za moške in 0,88 ± 0,04 μM za ženske celice KLL.

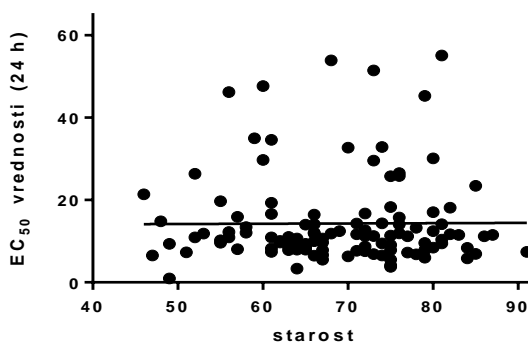
Gre za obetavno postavko, saj so moški sicer označeni kot tisti, pri katerih je odziv na zdravljenje slabši (114) in je tudi sicer moški spol označen za rizični faktor, ki sugestira slabšo prognozo (28). Že dalj časa je znano dejstvo, da so moški pogosteje podvrženi limfoidnim malignim boleznim – pri nekaterih podtipih, kot je na primer Burkittov limfom

presega razmerje moški : ženske celo število 3, pri KLL pa se zabeležena razmerja gibljejo med 1,9:1 – 1,7:1 (8, 114, 116). Moški predstavljajo večinski del skupine bolnikov s KLL, prav tako v našem primeru (58 % moških : 42 % žensk), vendar je razmerje nekoliko manjše (1,4:1) od svetovnega. Trend padanja razmerja tudi na svetovnem nivoju pojasnjujejo z povprečno daljšo življenjsko dobo žensk in tako povečanim številom bolnic v bolezenski skupini (114).

4.4.2. Delovanje PgE₁-OH je neodvisno od starosti

KLL je bolezen starejše populacije, povprečna starost ob diagnozi bolnikov je bila 69 let, pojavnost bolezni pa s starostjo še narašča (49). Izredno pomembno je, da potencialne zdravilne spojine že v *in vitro* študijah izkazujejo učinek, neodvisen od starosti.

Želeli smo ugotoviti, ali je delovanje spojine PgE₁-OH odvisno od starosti bolnikov s KLL in ali bi bil ta učinkovit tudi pri starejši populaciji. Jakost korelacije med starostjo in EC₅₀ vrednostmi (Slika 16) smo preverili s Pearsonovim koeficientom. Izkazalo se je, da bil $r^2 = 0,0001$ in $p = 0,8979$, kar pomeni neznatno povezanost in nakazuje, da med starostjo in EC₅₀ vrednostmi ni korelacije. Vrednost korelacijskega koeficienta je vrednost med -1 in 1, kjer -1 pomeni popolnoma negativno korelacijo, 0 odsotnost korelacij, 1 pa napoveduje popolnoma pozitivno korelacijo (117).



Slika 16: Učinek agonista PgE₁-OH *in vitro* je neodvisen od starosti.

Izvedli smo analizo korelacije, $r^2 = 0,0001$, $p = 0,8979$, ki ni pokazala statistično značilne povezave.

Vsaka pika predstavlja enega bolnika.

Ugotovili smo, da je PgE₁-OH enako učinkovit pri vseh starostnih skupinah, tudi pri bolnikih starejših od 60 let, ki sicer predstavljajo rizično skupino (28) in kot tak predstavlja potencialno protitumorno spojino tudi za njih. Seveda pa naša *in vitro* študija ne more predvideti pridruženih komorbidnosti, ki dostikrat omejujejo učinkovito zdravljenje malignih obolenj starejših bolnikov.

II. GENOTIPIZACIJA

4.5. Analiza polimorfizmov rs4495224 in rs7720838

Zapis za gen *Ptger4* se nahaja na kromosomu 5p13.1. Številne študije so zabeležile povezanost polimorfizmov v bližini regulatornih delov omenjenega gena z večjim tveganjem za določene bolezni (118), rs4495224 in rs7720838 so povezali z večjo pojavnostjo kronične vnetne črevesne bolezni (KVČB), predvsem njenim podtipom - Crohnovo boleznijo (72, 73). Gen *Ptger4*, ki kodira za receptor EP4, je bil označen za tumor supresor gen, saj je pri malignih boleznih B celic izkazal protektivno vlogo na poskusih na miših *in vivo* (55). Omenjene mutacije bi lahko spremenile izražanje gena *Ptger4* in tako izničile njegovo tumor supresorsko vlogo, s tem pa bi bili nosilci rizičnih alelov bolj izpostavljeni malignim obolenjem. Ugotoviti smo želeli, ali obstaja opisana povezava med polimorfizmi in večjo pojavnostjo KLL, saj bi lahko določenih alel/genotip v tem primeru predstavljal prognostični biomarker (poglavje 4.5.3.). Pred tem smo se morali prepričati, ali je naša preiskovana populacija reprezentativna (poglavje 4.5.1.). Zanimalo nas je tudi, ali je podobna kateri od prej preiskovanih populacij, pri kateri so opazili večje tveganje za določene bolezni (poglavje 4.5.2.). Preverili smo še, ali je izražanje alelov/genotipov spolno pogojeno (poglavje 4.5.4.). Na koncu pa smo še ovrednotili, ali so nosilci posameznega alela/genotipa bolj občutljivi na v prejšnjem poglavju preiskovano potencialno protirakavo spojino PgE₁-OH (poglavje 4.5.5.) in tako nadaljevali z določanjem podskupin bolnikov, kjer PgE₁-OH izkazuje najbolj citotoksičen učinek.

V sledečih preglednicah so prikazani rezultati genotipizacije izbranih polimorfizmov SNP1 (rs4495224) in SNP2 (rs7720838) za bolnike s KLL (Preglednica XVIII) kot tudi kontrolno skupino zdravih prostovoljcev (Preglednica XIX).

Preglednica XVIII: Rezultati genotipizacije bolnikov s KLL.

VZOREC	SNP1	SNP2	VZOREC	SNP1	SNP2	VZOREC	SNP1	SNP2
2	CC	GG	67	AC	GT	125	AC	GT
3	AC	GT	68	AC	GT	126	AA	GG
4	AC	GT	69	AC	GT	127	AC	GT
5	AA	TT	70	AC	GT	128	AC	GG
6	AC	GT	71	CC	GT	129	AC	GT
7	AA	TT	72	AA	TT	130	AC	GT
11	AA	TT	73	AC	GT	131	AA	TT
12	AC	GT	76	AC	GT	133	CC	GT
13	CC	GG	77	AA	GT	134	AC	GG
14	AC	GT	78	AA	TT	135	CC	GG

15	AC	GT	79	AC	GT	137	AA	TT
16	AA	GT	80	CC	GG	138	AC	GT
17	AA	TT	81	AA	GT	139	AC	TT
18	CC	GT	82	AC	TT	140	AC	GG
19	AC	GT	83	AA	TT	141	CC	GG
22	AA	GG	84	AA	GT	142	AC	GG
23	AA	GT	85	AC	GT	144	CC	GT
25	CC	GG	87	AC	GT	145	CC	TT
26	CC	GG	88	AA	TT	146	CC	GT
30	AC	GG	89	AA	TT	147	AA	GT
31	AC	GT	90	AA	TT	148	CC	TT
32	AC	GG	91	AC	GT	150	AA	TT
33	AA	TT	92	AC	GT	151	AC	TT
34	AC	GT	94	AA	TT	152	AA	TT
35	AC	GT	95	AA	TT	158	AA	TT
36	AA	TT	96	AC	GT	159	AC	TT
38	AA	TT	97	AC	GT	160	AC	GT
39	CC	GG	98	AC	GT	167	AC	GT
40	AA	GT	99	AC	GG	168	AA	TT
41	AA	TT	100	AA	TT	169	AA	TT
42	AC	GT	101	AC	GT	170	AA	TT
43	AC	GG	102	AA	GT	171	AA	GT
45	CC	GG	103	AA	TT	172	AC	GT
46	AC	GT	104	AA	TT	174	AC	GT
47	CC	GG	105	AC	GT	175	AC	GT
48	AC	GT	106	AC	GT	176	AC	GT
49	CC	GG	107	AA	TT	181	CC	GG
50	AC	GT	109	AA	GT	182	AC	GT
51	AC	GG	110	AC	GT	183	AC	GG
52	CC	GG	111	AA	GT	184	CC	GG
53	AC	TT	112	AA	TT	186	AC	GT
54	AA	TT	113	AA	TT	187	AC	GT
55	AC	TT	114	AA	GT	189	AA	TT
56	AC	GT	115	AA	TT	190	AC	GT
57	AA	TT	116	AA	TT	191	AC	GG
58	AC	GT	117	AC	GT	192	CC	GT
59	AC	GT	118	AA	GT	193	AC	GG
60	AA	GG	119	AA	TT	194	AA	GT
61	AA	GT	120	AA	TT	196	AA	TT
62	AC	GG	121	AC	GT	197	AA	GT
63	AC	GT	123	AC	TT	198	AA	TT
64	AC	GT	124	AA	TT	203	AC	GT
66	AA	TT	število analiziranih vzorcev s KLL: 159					

Legenda: SNP1 - rs4495224, SNP2 - rs7720838

Preglednica XIX: Rezultati genotipizacija kontrolne skupine zdravih prostovoljcev.

VZOREC	SNP1	SNP2	VZOREC	SNP1	SNP2	VZOREC	SNP1	SNP2
K2	AC	GT	K56	AA	TT	K137	AC	GT
K4	AC	GT	K57	AC	GT	K138	AA	TT
K5	AC	GT	K58	CC	GG	K139	CC	GT
K7	AC	GT	K59	AC	GT	K140	CC	GT
K8	AC	GT	K60	AA	TT	K141	AC	GT
K9	AC	GT	K61	CC	GG	K142	AA	TT
K10	CC	GG	K62	AC	GT	K144	AA	GG
K11	CC	GG	K63	CC	GG	K145	AC	GT
K12	CC	GG	K64	AC	GT	K146	AC	GT
K13	AC	GG	K65	AA	TT	K147	AC	TT
K14	AC	TT	K66	AA	TT	K148	AA	TT
K15	AC	GT	K67	AC	GT	K149	AA	TT
K16	AA	TT	K68	AC	GT	K151	CC	GG
K17	AA	TT	K69	CC	GG	K152	AA	TT
K18	CC	GG	K70	AC	GT	K154	AC	GT
K19	AC	GT	K72	AC	GT	K156	AA	GT
K20	AA	GT	K74	AC	GT	K158	AC	GG
K21	AA	TT	K77	CC	GG	K160	AA	TT
K22	AC	GG	K78	AC	TT	K161	AA	GG
K23	AC	GT	K80	CC	GG	K162	AC	GT
K26	AC	GG	K83	AC	GG	K163	AC	GG
K27	AA	GT	K86	AC	TT	K167	AA	TT
K28	AA	GT	K88	AC	GT	K168	AA	TT
K31	AC	GG	K89	AA	TT	K172	AA	GT
K32	AC	GG	K90	AA	TT	K175	AA	TT
K33	AC	TT	K92	AC	TT	K176	AC	GT
K35	AC	TT	K95	AA	TT	K177	AA	TT
K36	AA	GT	K108	CC	GG	K180	AA	TT
K37	AA	TT	K110	AA	TT	K186	AC	GG
K38	AC	GT	K117	AA	TT	K187	AA	GT
K39	AC	TT	K124	AA	TT	K188	AC	GT
K40	AC	GG	K125	AC	TT	K190	CC	GG
K42	CC	GG	K126	CC	GT	K191	CC	GG
K44	AC	GG	K129	AC	GT	K203	AA	TT
K45	AC	GG	K130	AA	TT	K204	AC	GG
K48	AA	TT	K131	AA	TT	K205	AC	GT
K49	CC	GG	K132	AC	GT	K213	AC	GT
K50	AA	GT	K134	AC	GT	K214	AC	GT
K52	AA	TT	K135	AA	GT	K215	AC	GT
K53	AA	GT	K136	AC	GT	K216	AA	TT
K55	AC	GG	število analiziranih kontrolnih vzorcev: 122					

Legenda: SNP1 - rs4495224 , SNP2 - rs7720838

4.5.1. Polimorfizma rs4495224 in rs7720838 sta v skladu s HWE

Podatke o prisotnosti polimorfizmov gena *Ptger4* prikazuje Preglednica XX. V skupini bolnikov kot tudi kontrolni skupini obeh SNP rs4495224 in rs7720838 smo našli največ heterozigotov. Heterozigotom sledijo homozigoti z mutirano varianto AA (rs4495224) ter TT (rs7720838), številčno najmanjša pa je nemutirana varianta homozigotov CC (rs4495224) ter GG (rs7720838).

Po izračunu pričakovanih vrednosti po enačbi iz poglavja 3.6.1, smo ugotovili, da se oba polimorfizma v skupini bolnikov in kontrolni skupini porazdelujeta v skladu s HWE (p vrednosti prikazuje Preglednica XX). Vzorec smo lahko označili za reprezentativen in podatke o genotipih uporabljali za nadaljnje statistične analize.

Preglednica XX: Rezultati opazovanih in pričakovanih vrednosti frekvenc SNP rs4495224 (C>A) in SNP rs7720838 (G>T).

		rs4495224				rs7720838				
KLL	Genotip	Opazovano		Pričakovano		Genotip	Opazovano		Pričakovano	
		%	N	%	N		%	N	%	N
KLL	AA	37,97	60	38,10	60,20	TT	31,65	50	31,71	50,10
	AC	47,46	75	47,28	74,70	GT	49,37	78	49,18	77,70
	CC	14,56	23	14,68	23,20	GG	18,99	30	19,05	30,10
	Skupaj	100	158	100	158	Skupaj	100	158	100	158
			p = 0,9553					p = 0,9657		
Zdravi darovalci		%	N	%	N		%	N	%	N
	AA	35,83	43	36,00	43,20	TT	35,00	42	30,17	36,20
	AC	48,33	58	48,00	57,60	GT	41,66	50	51,33	61,60
	CC	15,83	19	16,00	19,20	GG	26,67	32	21,83	26,20
	Skupaj	100	120	100	120	Skupaj	100	120	100	120
		p = 0,9393					p = 0,0743			

*Podane so frekvence genotipov v %, N - število oseb z določenim genotipom.
Vrednosti p so bile izračunane z uporabo Fisherjevega natančnega testa.*

4.5.2. Pojavnost polimorfizmov v slovenski skupini bolnikov se ne razlikuje od drugih populacij

Odkrita korelacija med ekspresijo gena *Ptger4*, ki kodira za receptor EP4 in z njim povezanimi polimorfizmi, je vodila v analize vloge večih SNP-jev pri različnih boleznih (69). Zanimalo nas je ali se naša kohorta razlikuje od tujih, kar bi lahko nakazovalo na geografski vpliv na pojavnost določenih SNP-jev in s tem na populacijsko odvisno pojavnost bolezni. Iz podatkov naše kontrolne skupine smo izračunali alelne frekvence in jih primerjali s podatki iz literature in raziskavami drugih skupin, kar prikazujeta preglednici XXI in XXII.

Za analizo smo uporabili dvostranski Fisherjev natančni test, ki je z vrednostmi $p > 0,05$ pokazal, da geografski dejavnik nima vpliva na različno prisotnost alelov v naši populaciji.

Preglednica XXI: Frekvence alelov SNP rs4495224 in SNP rs7720838 pri bolnikih s KLL (Slovenija) in bolnikih s Crohново boleznijo (Nemčija).

Podatki iz tujine povzeti po (72, 73).

rs4495224		KLL/Crohnova	rs7720838	
A	C		T	G
62	38	Slovenija	56	44
72	28	Nemčija	62	38
p = 0,1757			p = 0,4723	

Podane so alelne frekvence v %. Vrednosti p so bile izračunane z uporabo Fisherjevega natančnega testa.

Preglednica XXII: Rezultati frekvenc alelov SNP rs4495224 in SNP rs7720838 v različnih populacijah glede na nosilce rizičnega alela A oziroma T ter protektivnega alela C oziroma G.

Podatki iz tujine povzeti po (69, 72, 73).

	rs4495224		populacija	rs7720838	
	A	C		T	G
Bolniki	62	38	Slovenija (KLL)	56	44
	72	28	Nemčija (Crohnova bolezen)*	62	38
	72	28	Amerika (Crohnova bolezen)*	63	37
	ND	ND	Amerika (alergija)*	58	42
Zdravi darovalci	66	34	Slovenija (zdravi)	53	47
	66	34	Nemčija (zdravi)	57	43
	63	37	Pubmed: Evropa (zdravi)	56	44
	65	35	Amerika (zdravi)	55	45

Podane so alelne frekvence v %, ND - ni določeno,

* - statistično značilna razlika med bolniki in zdravo populacijo.

Alel A SNP-ja rs4495224 je bil sicer tako v v nemški, kot tudi ameriški populaciji večkrat označen za rizični alel, saj njegova prisotnost izkazuje večje tveganje za Crohново bolezen (72, 73).

Alel T SNP-ja rs7720838 je bil po ameriški metaraziskavi določen kot mutacija, ki je povezana z povečano dovzetnostjo za različne alergije (71), že prej se je njegova pozicija omenjal kot kandidatni lokus za astmo (119), dokazana je njegova povezanost z ekspresijo gena *Ptger4*, študije na miših pa so izpostavile njegovo vlogo v prvotnem imunskem odzivu kože (120, 121).

4.5.3. Pojavnost določenega genotipa ni povezana z večjo pojavnostjo KLL

Povečana pojavnost rizičnega alela A pri rs4495224 oziroma rizičnega alela T pri rs7720838 je bila v več študijah označena kot večje tveganje za pojavnost določenih bolezni (69). Zanimalo nas, je ali obstaja statistično značilna razlika v porazdelitvi genotipov za posamezen polimorfizem v slovenski populaciji s KLL v primerjavi z zdravimi darovalci. V primeru večje pojavnosti katerega od alelov/genotipov pri skupini bolnikov s KLL, bi to nakazovalo, da ta potencialno predstavlja večje tveganje za razvoj bolezni. Če tak pojav zabeležijo v večih neodvisnih študijah in se dokaže povezanost z določeno boleznijo, se ta lahko uporablja kot prognostični biomarker. Po uporabi Fisherjevega dvostranskega natančnega testa smo ugotovili, da se pogostost genotipov med skupinama ne razlikuje statistično značilno (Preglednica XXIII). V skupini bolnikov pri rs4495224 smo opazili celo nižjo pojavnost alela A (62 %) v primerjavi z zdravo populacijo (66 %), ki je bil sicer v okviru študije KVČB označen za rizični alel. Pri rs7720838 pa se zdita skupini zelo podobni; med bolniki KLL in zdravimi nosilci v ostalih študijah identificiranega rizičnega alela T je le 2 % razlike. V okviru študije nismo uspeli dokazati, da bi rizična alela A in T lahko uporabili kot prognostični marker za KLL. Pojavnosti rizičnih alelov v skupini z bolniki in zdravimi darovalci se namreč ne razlikujejo statistično značilno.

Preglednica XXIII: Število nosilcev posameznega genotipa oziroma alela za preučevana polimorfizma rs4495224 in rs7720838.

		rs4495224				rs7720838						
		Genotip		Alel	Genotip		Alel					
		%	N	%	%	N	%	%				
Bolniki	AA	38	60	A	62	TT	32	50	T	56		
	AC	47	75		C	38	GT	49		78	G	44
	CC	15	23				GG	19		30		
Zdravi darovalci		%	N		%		%	N		%		
	AA	36	43	A	66	TT	35	42	T	54		
	AC	48	58	C	34	GT	42	50	G	46		
	CC	16	19			GG	27	32				
		p = 0,9061		p = 0,6587		p = 0,2434		p = 0,8870				

Podane so frekvence genotipov in alelov v %.

Vrednosti p so bile izračunane z uporabo Fisherjevega natančnega testa.

4.5.4. Pojavnost polimorfizmov je neodvisna od spola

Epidemiološke študije KLL konsistentno zabeležujejo manjšo pojavnost in boljše preživetje ženskih bolnic v primerjavi z moškimi (114). Različnim izidom naj bi botrovale molekularne, genetske in hormonske razlike med spoloma (47).

Zanimalo nas je, ali obstajajo razlike med spoloma, ki bi nakazovale, da je vzrok temu različno genetsko ozadje oziroma različna razporeditev genotipov ali prevladajočih alelov izbranih polimorfizmov. Ugotovili smo, da med ženskimi in moškimi v slovenski populaciji s KLL ni bilo statistično značilnih razlik med razporeditvijo genotipov, prav tako ne alelov (Preglednici XXIV in XXV).

Preglednica XXIV: Razporeditev genotipov izbranih SNP-jev med spoloma.

	rs4495224						rs7720838					
	AA		AC		CC		TT		GT		GG	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
moški	34	40	39	45	13	15	25	29	45	52	16	19
ženske	23	36	32	51	8	13	23	37	28	44	12	19
	p = 0,8287						p = 0,5909					

Podane so frekvence genotipov v %, N - število oseb z določenim genotipom.
Vrednosti p so bile izračunane z uporabo Fisherjevega natančnega testa.

Preglednica XXV: Razporeditev alelov izbranih SNP-jev med spoloma.

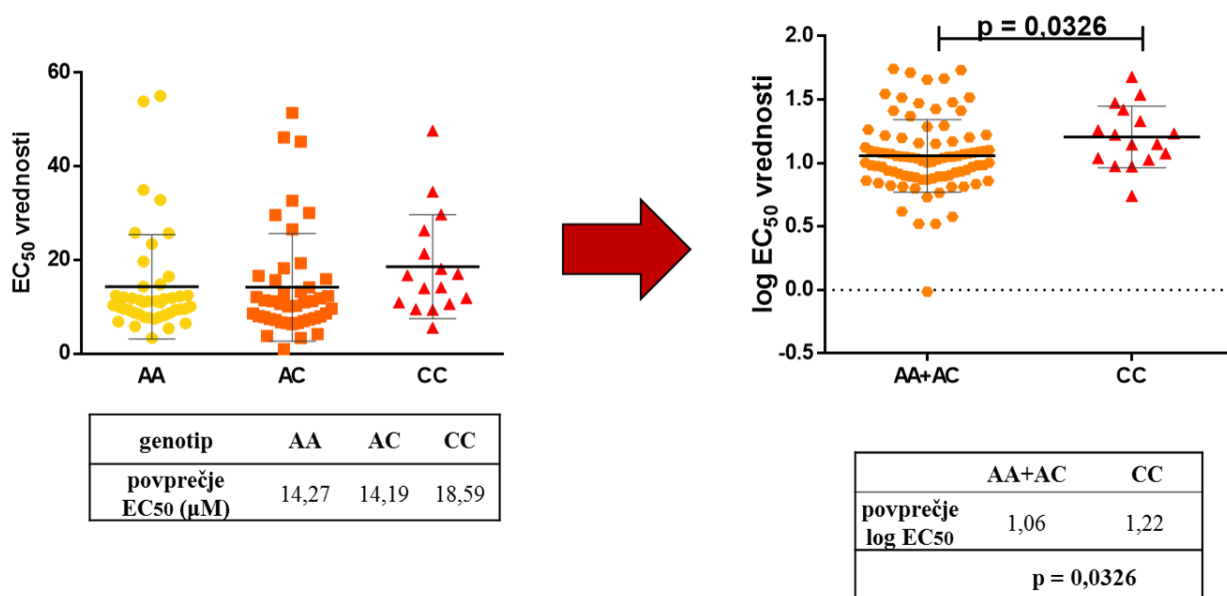
	rs4495224		rs7720838	
	A	C	T	G
moški	62,5	37,5	55	45
ženske	61,5	38,5	59	41
	p = 1,0000		p = 0,6684	

Podane so frekvence alelov v %. Vrednosti p so bile izračunane z uporabo Fisherjevega natančnega testa.

4.5.5. PgE₁-OH je bolj citotoksičen pri nosilcih alela A (rs4495224)

V prejšnjem poglavju 4.2. smo opisali, da ima spojina PgE₁-OH citotoksične učinke na celice darovalcev s KLL. V odzivu celic na spojino smo opazili veliko inter – individualno variabilnost, kot enega izmed možnih razlogov zanjo pa smo navedli prisotnost polimorfizmov rs4495224 in rs7720838. Zanimalo nas je, ali prisotnost katere od mutacij vpliva na povečano ali zmanjšano občutljivost KLL celic *in vitro*. Po razporeditvi EC₅₀ vrednosti glede na genotipe in uporabi testa ANOVA, nismo zabeležili statistično značilnih razlik med odzivom nosilcev določenega genotipa na spojino PgE₁-OH. Opazili pa smo, da skupini z mutiranim enim ali obema aleloma pri SNP-ju rs4495224 izkazujeta približno enako občutljivost na PgE₁-OH *in vitro* (EC₅₀ za skupino AA je bil 14,27 μM, za AC pa 14,19 μM), zato smo le-ti združili in jih statistično primerjali z nemutiranim homozigotom CC. Posamezniki z alelom A so bili pri večjih boleznih označeni za rizično skupino (72, 73). V primeru naše kohorte se je izkazalo, da so celice nosilcev alela A bolj občutljive na uporabljeno potencialno spojino PgE₁-OH v primerjavi s celicami homozigotov CC. Slednja

ugotovitev je obetavna, saj predstavljajo nosilci alela A večino slovenske populacije s KLL (62 %), prav tako je v vseh preučevanih preiskovanih skupinah frekvenca alela A še večja (63 % - 72 %; glej Preglednico XXII). PgE₁-OH tako po rezultatih naše *in vitro* študije predstavlja spojino, ki še učinkoviteje deluje na prevladujočo rizično skupino, mutacija rs4495224 pa je v navedenem primeru pozitivna, saj poveča občutljivost celic na potencialno protirakavo spojino PgE₁-OH. Na Sliki 17 je prikazana razporeditev EC₅₀ vrednosti glede na genotipe.



Slika 17: Nosilci alela A so bolj občutljivi na spojino PgE₁-OH kot nemutiranimi homozigoti CC.

Razlika med odzivom na PgE₁-OH je statistično značilna ($p = 0,0326$).

Za analizo smo uporabili neparni t-test.

Pri SNP rs7720838 smo izvedli enako statistično analizo, vendar pri njem nismo opazili statistično značilnih razlik v odzivu na PgE₁-OH med skupinami genotipov ali alelov.

III. VREDNOTENJE IZRAŽANJA RECEPTORJA EP4

Prisotnost receptorja EP4 na celicah KLL je bila v predhodnih študijah že dokazana s konfokalno mikroskopijo in pretočno citometrijo (58). Naš namen je bil preveriti izražanje še na nivoju mRNA z uporabo PCR-ja v realnem času, saj jo na ta način najlažje kvantificiramo in primerjamo z drugimi rezultati. Določili smo ekspresijo gena *Ptger4*, ki kodira za receptor EP4 ter jo normirali na izbrana referenčna gena. Želeli smo ugotoviti, ali obstajajo povezave med izraženostjo gena in spolom (poglavje 4.6.1.), starostjo (poglavje 4.6.2.) ali preiskovanimi polimorfizmi (poglavje 4.6.3.). Po tem, ko smo v prvem sklopu ovrednotili aktivnost spojine PgE₁-OH in ugotovili, da je ta bolj citotoksična pri celicah moških darovalcev in tistih, ki so nosilci alela A (rs4495224), a deluje enako dobro pri vseh starostih preiskovancev, smo želeli preveriti še kakšen je vpliv ekspresije na njegovo učinkovitost (poglavje 4.6.4.). Zanimalo nas je tudi, ali se ekspresija receptorja EP4 spremeni po tretiranju s PgE₁-OH (4.7.1.), kar smo preverili na nivoju proteina z uporabo pretočne citometrije.

4.6. Analiza ekspresije receptorja na nivoju mRNA

Z namenom ovrednotenja ekspresije receptorja EP4 smo izolirali 102 vzorcev RNA bolnikov s KLL, jih prepisali s reverzno transkriptazo v cDNA in kvantificirali s pomočjo PCR-ja v realnem času. Dobljene rezultate smo normirali na referenčna gena *Gadph* in *Rplp0* kot je opisano v legendi. Preglednica XXVI prikazuje ekspresijo analiziranega receptorja *Ptger4* pri slovenskih bolnikih s KLL. Vrednosti ekspresije gena *Ptger4* zelo variirajo, povprečna normirana vrednost ekspresije pa je znašala $1,66 \pm 1,60$.

Preglednica XXVI: Normirane vrednosti ekspresije gena Ptger4.

Vzorec	<i>Ptger4</i> norm	Vzorec	<i>Ptger4</i> norm	Vzorec	<i>Ptger4</i> norm	Vzorec	<i>Ptger4</i> norm
13	0,57	64	0,80	123	0,33	170	1,22
15	2,07	65	0,11	124	0,35	171	0,72
16	1,95	66	1,81	125	0,08	172	0,80
17	0,70	69	0,84	128	0,39	173	1,95
18	1,22	73	1,77	129	1,03	174	0,54
19	0,00	74	0,78	130	0,08	175	0,97
20	1,43	77	0,99	132	0,50	176	3,53
21	2,01	80	0,95	134	0,99	177	8,38
22	1,38	82	1,17	135	1,11	178	1,17
23	0,62	83	1,12	137	0,92	179	0,19
24	0,12	84	0,80	141	1,13	180	1,61

25	0,95	87	0,59	143	0,63	181	1,68
26	1,18	90	0,74	146	0,32	182	2,66
32	1,16	91	0,66	147	1,50	184	1,60
34	1,16	94	0,50	148	3,25	185	3,64
36	1,13	95	0,66	150	4,86	186	0,74
37	0,47	96	0,36	152	2,29	188	1,30
38	0,91	97	0,54	153	0,71	189	0,76
39	0,73	99	2,02	155	4,84	190	0,43
41	0,96	100	2,43	156	1,42	191	1,04
42	2,72	101	2,99	157	1,54	192	0,57
43	3,78	110	0,88	158	0,97	193	1,57
44	3,57	111	1,74	159	0,22	194	2,84
45	0,72	112	2,03	160	1,38	194	2,84
46	1,41	113	2,00	161	0,22	195	2,24
47	4,99	114	2,23	162	0,70	197	6,46
48	1,29	115	2,98	164	2,27	198	8,94
53	0,29	116	0,76	165	3,07	199	7,13
54	0,43	117	1,9	167	1,05	200	2,14
61	1,19	121	0,63	168	3,32	202	5,26
63	0,70	122	1,90	169	3,02	203	5,46

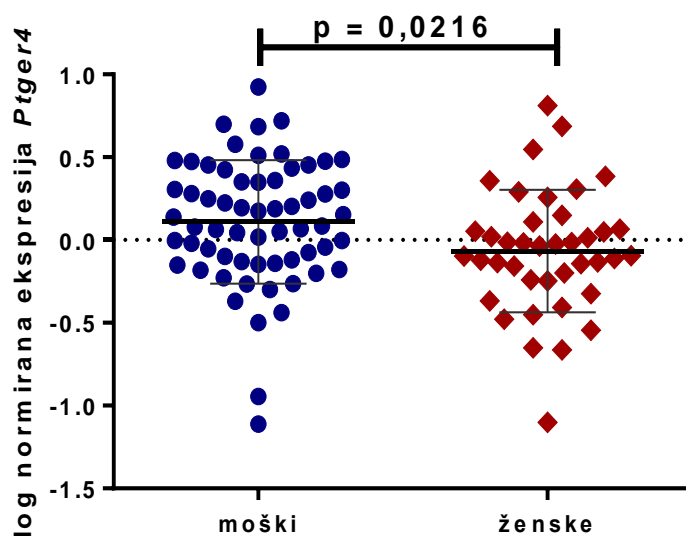
Izračun normirane *Ptger4* ekspresije je rezultat sledeče enačbe: $Ptger4\ norm = \frac{ekspresija\ (Ptger4)}{ekspresija\ (referenčnih\ genov)}$
 $ekspresija\ (referenčnih\ genov) = \sqrt[2]{ekspresija\ (Gadph) \times ekspresija\ (Rplp0)}$. Za nadaljnje analize smo uporabljali logaritmirane vrednosti normirane ekspresije. Poskus je bil izveden v trojniku.

V prejšnjih stopnjah raziskave št. 93/12/10 so preverili prisotnost receptora EP4 na celicah KLL s konfokalno mikroskopijo in pretočno citometrijo, s katero so ugotovili višjo ekspresijo preiskovanega proteina na donorskih celicah KLL kot na celičnih linijah LCL (58). Ekspresija se je tudi na proteinskem nivoju izkazala za zelo variabilno. Naša opažanja so v skladu s prejšnjimi ugotovitvami in prinašajo potrditev raznolikega izražanja receptora EP4 še na nivoju mRNA.

4.6.1. Višja ekspresija gena *Ptger4* je značilna za moške bolnike s KLL

Čeprav živijo ženske dalj časa, je večina bolnikov s KLL moških (7, 114), prav tako je bilo tudi v naše analize vrednotenja izražanja gena *Ptger4* vključenih več slednjih (62 moških : 40 žensk). Tveganje za razvoj KLL je pri moških približno dvakrat večje, pri njih se bolezen razvije povprečno nekaj let prej kot pri ženskah, pogosteje pa se pojavlja tudi agresivnejša oblika KLL (122–124).

Zanimalo nas je, ali obstaja spolno pogojena razlika izražanja gena *Ptger4*, saj bi ta lahko bila eden od razlogov, zakaj se KLL pogosteje pojavlja pri moških ter pri njih obstaja večje tveganje za KLL. Potrdili smo normalno porazdelitev logaritmiranih vrednosti ekspresije gena *Ptger4* in izvedli neparni t-test. Ugotovili smo, da je ekspresija gena *Ptger4* statistično značilno večja ($p = 0,0216$) pri celicah moških darovalcev s KLL (Slika 18). Povprečna vrednost ekspresije za moške celice je bila $1,29 \pm 1,11$ ($N = 62$), za ženske pa $0,86 \pm 1,14$ ($N = 40$).



Slika 18: Ekspresija gena *Ptger4*, ki kodira receptor EP4 je značilno večja pri celicah KLL moških darovalcev v primerjavi z ženskimi.

Za analizo smo uporabili neparni t-test ($p = 0,0216$). Ekspresija je normirana na referenčna gena *Gadph* in *Rplp0*. Povprečna vrednost ekspresije za moške celice je bila $1,29 \pm 1,11$ ($N = 62$), za ženske pa $0,86 \pm 1,14$ ($N = 40$), log vrednost ekspresija pa: $0,11 \pm 0,05$ za moške in $-0,07 \pm 0,06$ za ženske.

Ugotovitev, da imajo moški bolj izražen gen *Ptger4*, skupaj s predhodnimi ugotovitvami, da so EC_{50} vrednosti PgE_1-OH moških darovalcev nižje (poglavje 4.4.1), nakazuje, da je citotoksični učinek agonista receptorja EP4 PgE_1-OH višji pri bolnikih KLL, ki imajo povišano ekspresija receptorja EP4. Navedeno smo podrobneje opisali v poglavju 4.6.4..

Višja ekspresija gena *Ptger4* bi lahko predstavljala tudi nov prognostični biomarker za KLL pri moških, saj se KLL pogosteje pojavlja pri moških, ki imajo po naših ugotovitvah statistično značilno višjo ekspresijo gena *Ptger4* od žensk. Povišana ekspresija gena *Ptger4* bi lahko vodila v bolj intenzivno signaliziranje preko nižje ležečih signalnih poti; na primer NF- κ B poti, ki je konstitutivno aktivna signalna pot, dokazano deregulirana pri številnih malignih boleznih; tudi pri KLL. Aktivirana NF- κ B sproži višjo ekspresijo proliferativnih in

anti-apoptotičnih genov in tako med živimi ohranja pokvarjene celice, ki bi sicer prešle v apoptozo (125).

Pri nekaterih raziskavah so že ugotovili, da se nekateri geni izražajo v odvisnosti od spola, kar lahko vodi v drugačno, tudi agresivnejšo obliko bolezni. Pri študiji, ki je raziskovala epigenetsko odzadje KLL, so izpostavili utišan gen *Relb* kot nov marker agresivnejše oblike KLL pri moških. Izmed 17 dereguliranih genov, ki so jih identificirali kot krivce za razvoj na apoptozo rezistentnih celic KLL, so našli utišanje *Relb* pri moških, ne pa tudi pri ženskah (124).

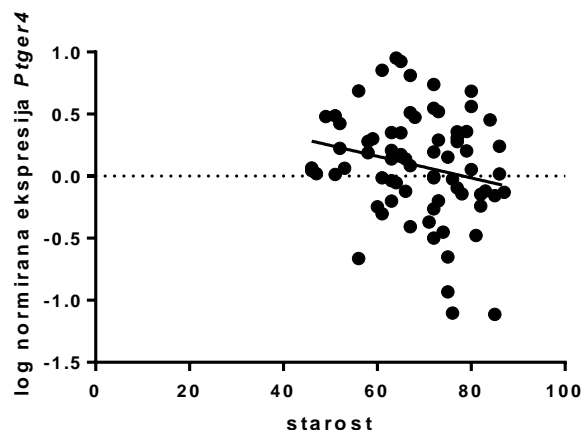
Tudi druge študije navajajo, da imajo ženske manjše tveganje za razvoj levkemij. Navedeno razlagajo z inhibitornim vplivom hormona estrogena na NF- κ B, ki nadalje zavira izražanje nekaterih anti-apoptotičnih proteinov (na primer Bcl-2, Bcl-xl,...). Pri moških bolnikih vpliv estrogena izostane, zato protektivni učinek le-tega ne pride do izraza in so posledično bolj dovzetni za maligna obolenja (126).

Zanimivo je opomniti na dejstvo, da se razmerje moški : ženske obrne na glavo, če primerjamo KLL in KVČB, ki smo jo v povezavi z dokazano korelacijo s *Ptger4* genom omenjali že prej. Podatki iz literature za KLL kažejo močno prevlado moških bolnikov, medtem ko pri KVČB epidemiologi zabeležujejo več ženskih bolnic, predvsem v zahodnih, razvitejših državah (127, 128).

Tudi na splošno velja, da so moški tisti, pri katerih je praviloma tveganje za razvoj raka večje, pri ženskah pa je večja dovzetnost za avtoimune bolezni (129).

4.6.2. Ekspresije gena *Ptger4* ni odvisna od starosti

Pojavnost KLL se s starostjo močno povečuje, glede na splošno podaljšanje povprečne življenjske dobe lahko sklepamo, da se bo le-ta še povečevala. Želeli smo ugotoviti, ali je povečano ali zmanjšano izražanje gena *Ptger4* povezano z naraščajočo starostjo bolnikov. Pred analizo korelacije med starostjo bolnikov in izražanjem gena *Ptger4* smo preverili ali se vrednosti ekspresije normalno porazdeljujejo. Statistični test D'Agostino & Pearson je pokazal, da rezultati log ekspresije gena *Ptger4* sledijo Gaussovi distribuciji. Po izračunu korelacijskega Pearsonovega koeficienta ($r^2 = 0,0471$), smo ugotovili, da obstaja med starostjo in ekspresijo gena *Ptger4* nepričakovana negativna korelacija, ki je mejno statistično značilna ($p = 0,0669$). Pri naši kohorti smo tako opazili rahel trend padanja ekspresije gena *Ptger4* v odvisnosti od starosti, ki je prikazan na Sliki 19.

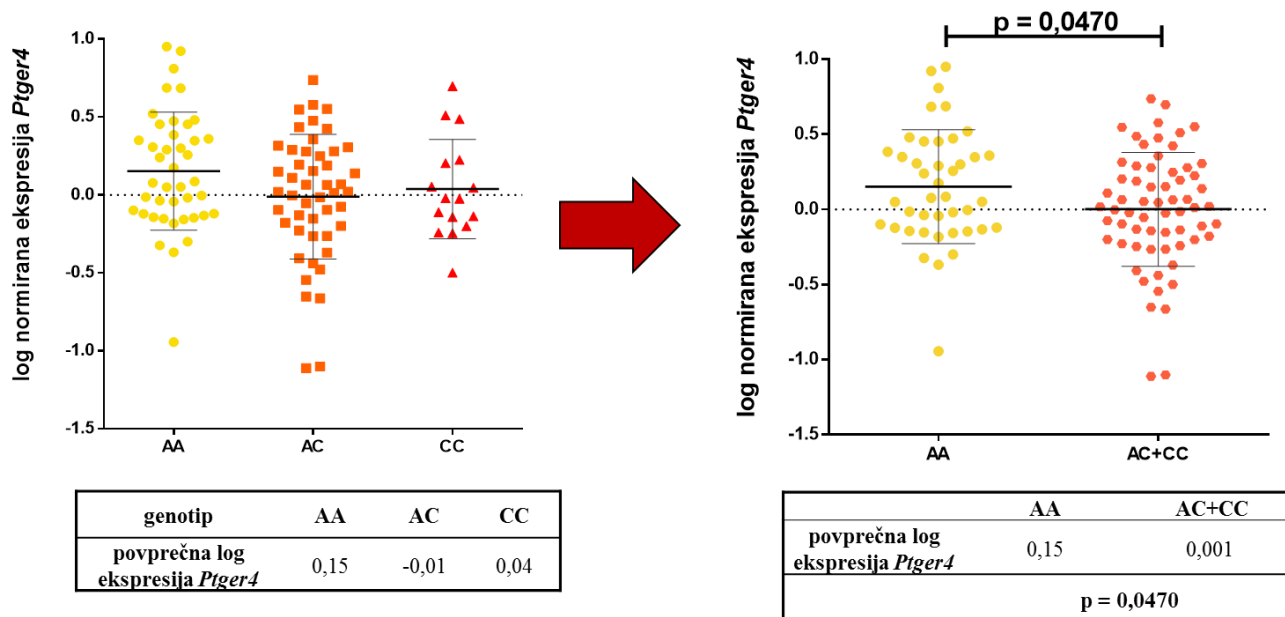


Slika 19: Ekspresija gena *Ptger4* v odvisnosti od starosti.

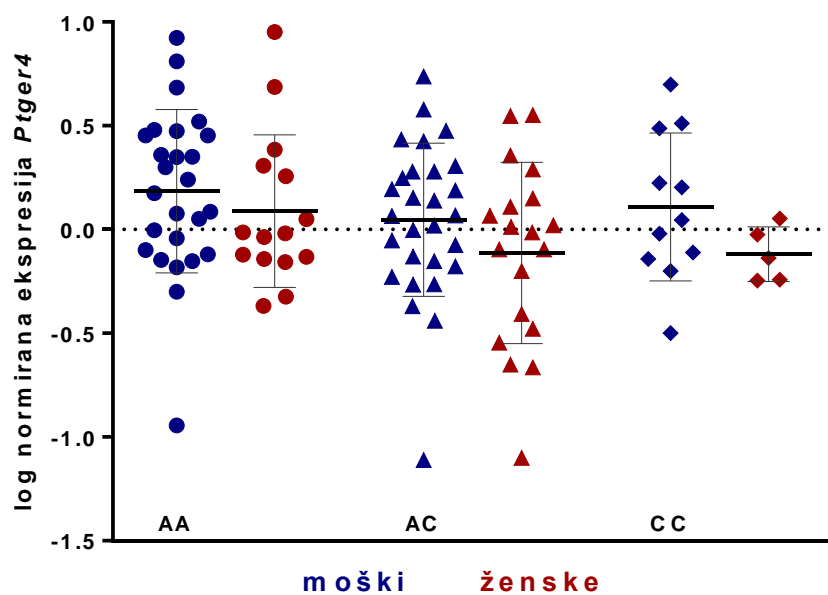
Analiza korelacije je pokazala mejno statistično značilno povezavo med ekspresijo *Ptger4* in starostjo ($r^2 = 0,0471$, $p = 0,0669$). Ekspresija je normirana na referenčna gena *Gadph* in *Rplp0*.

4.6.3. Višja ekspresija gena *Ptger4* je značilna za homozigote AA (rs4495224)

Nedavne raziskave lokusa 5p13.1, kjer se nahaja gen *Ptger4* so povezale tam ležeče polimorfizme s povečano ekspresijo receptorja EP4 (69), zato je tudi nas zanimalo, ali obstaja takšna povezava tudi med bolniki s KLL v slovenski populaciji. Alel A je bil v preteklih študijah za KVČB označen kot rizični alel, saj obstaja večja pojavnost predvsem Crohnove bolezni pri nosilcih omenjenega alela v primerjavi z nosilci nemutirane variante C (72, 73). V slovenski kohorti tega pojava nismo zasledili, a smo opazili povečano ekspresijo gena *Ptger4* pri moških bolnikih kot tudi ženskih bolnicah z genotipom AA (Sliki 20 in 21). Povečana ekspresija pri mutiranih homozigotih AA bi bila lahko posledica dejstva, da se mutacija rs4495224 pojavlja na regulatornem delu genoma, kjer se nanj vežejo transkripcijski dejavniki, ki vplivajo na izražanje receptorja EP4. *In silico* analiza bolnikov s Crohnovo boleznijo je namreč identificirala SNP rs4495224 kot del bistvenega vezavnega mesta NF- κ B ter prikazala močnejšo vezavo tega pri nosilcih rizičnega alela A. Pri rs7720838 so močnejšo vezavo ugotovili za nosilce rizičnega alela T za XBP1 in c-Myc (72). Za potrditev navedenega bi bilo smiselno izvesti luciferazni test (*ang. luciferase reporter assay*) in preveriti moč vpliva regulatornih regij na gensko izražanje.



Slika 20: Ekspresija gena *Ptger4* je večja pri mutiranih homozigotih AA kot pri nosilcih alela C.
 Za analizo smo uporabili neparni t-test ($p = 0,0470$).
 Ekspresija je normirana na referenčna gena *Gadph* in *Rplp0*.

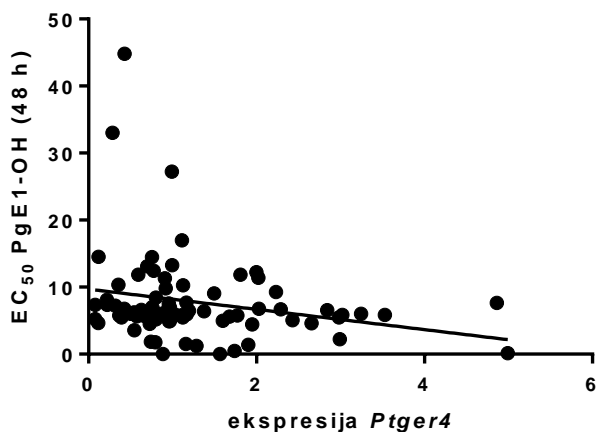


Slika 21: Ekspresija gena *Ptger4* glede na genotip in spol.
 Značilno različna višja ekspresija pri mutiranih homozigotih AA se pojavlja pri moških, kot tudi pri ženski populaciji. Ekspresija je normirana na referenčna gena *Gadph* in *Rplp0*.

4.6.4. Med povečano ekspresijo gena *Ptger4* in nižjim vrednostmi EC₅₀ PgE₁-OH obstaja korelacija

Pri celicah darovalcev, ki so imeli večjo ekspresijo gena *Ptger4* smo opazili nižje EC₅₀ vrednosti. Skušali smo ugotoviti ali navedene vrednosti korelirajo glede na celotno kohorto. Po opravljeni statistični analizi korelacije smo ugotovili, da obstaja med ekspresijo gena *Ptger4* in učinki PgE₁-OH statistično značilna povezava ($r^2 = 0,0521$, $p = 0,0460$), prikazana na Sliki 22.

V primeru večje ekspresije gena *Ptger4* se poveča sinteza receptorja EP4 in je tega na celicah več, vezava PgE₁-OH pa lahko intenzivneje aktivira spodnje ležeče signalne poti. Citotoksični učinek je tako opaznejši, kar odraža nižja EC₅₀ vrednost. Korelacija nakazuje na potrjeno dejstvo, da je pri bolnikih z večjo ekspresijo *Ptger4* za citotoksično delovanje potrebnega manj PgE₁-OH.



*Slika 22: Statistično značilna korelacija med višjo ekspresijo *Ptger4* in nižjimi EC₅₀ bi lahko nakazovala na to, da spojina PgE₁-OH res deluje preko aktivacije signalnih poti receptorja EP4. Izvedli smo test korelacije, $r^2 = 0,0521$, $p = 0,0460$.*

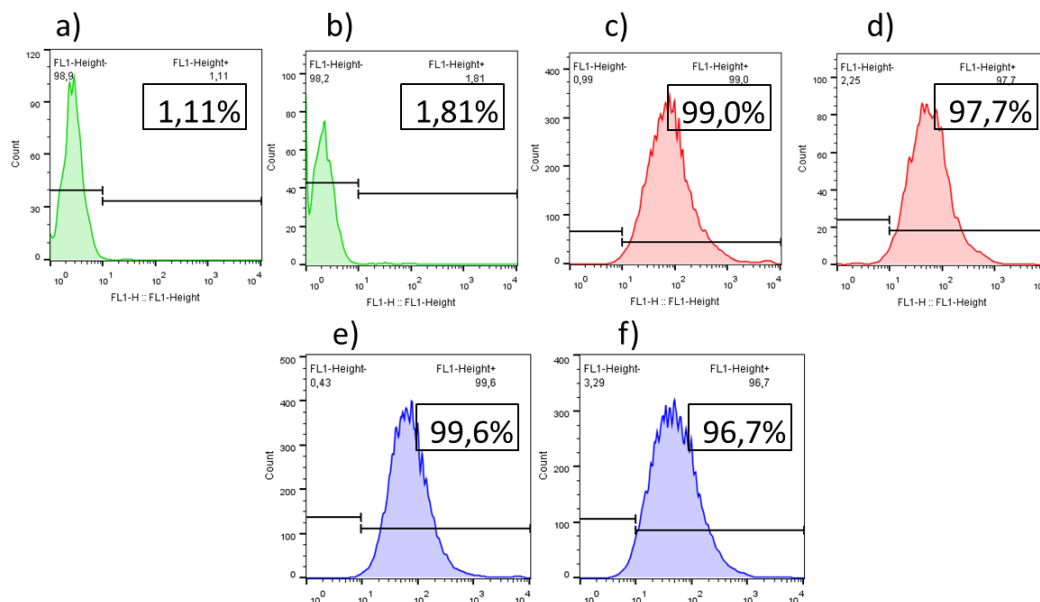
V prejšnjih stopnjah raziskave št. 93/12/10 so že preverjali morebitno korelacijo med ekspresijo receptorja EP4 na celicah KLL in EC₅₀ vrednostmi spojine PgE₁-OH na nivoju pretočne citometrije. Ekspresija se je izkazalo za zelo variabilno, kakor tudi odziv celic na PgE₁-OH, med njima pa niso zaznali korelacije (58).

Preverjena pa je bila tudi povezava med ekspresijo receptorja EP4 na celičnih linijah LCL in EC₅₀ vrednostmi PgE₁-OH. Pri slednjih so ugotovili, da obstaja šibek trend med nižjimi EC₅₀ vrednostmi in višjo ekspresijo receptorja EP4 (76).

4.7. Analiza ekspresije receptorja s pretočno citometrijo

4.7.1. Receptor EP4 je izražen na celicah KLL in njegova ekspresija je ohranjena po izpostavitvi spojinam

Predhodno je bilo ugotovljeno, da celice KLL izražajo receptor EP4 (46, 58). Tudi mi smo na nivoju mRNA z uporabo PCR-ja v realnem času potrdili prisotnost receptorja EP4 na celicah naših darovalcev (poglavje 4.6.). Nadalje smo želeli še na nivoju proteina z uporabo pretočne citometrije ovrednotiti izraženost receptorja EP4 in preveriti, ali uporaba spojine PgE₁-OH spremeni njegovo izraženost. V primeru daljše terapije bi to namreč lahko pripeljalo do spremenjene odzivnosti na preiskovano spojino. Zanimalo nas je, ali izpostavljenost agonista EP4 sproži povečano ali zmanjšano izražanje receptorja EP4, slednje bi lahko nakazovalo na to, da je prišlo do internalizacije receptorja. Uporabili smo potencialno protirakavo spojino, kot kontrolo pa nativni ligand receptorja EP4 - PGE₂. Celice KLL smo izpostavili spojinama za 24 h in jih nato pripravili po postopku, ki je opisan v poglavju 3.4.2.. Izražanje receptorja EP4 se pri pretočni citometriji podaja kot mediana intenzitete fluorescence (*angl. median fluorescence intensity* - MFI). S primerjavo MFI med celicami bolnika KLL, ki so bile izpostavljene spojinama in celicami KLL, ki niso bile, smo ugotovili, da se povprečna ekspresija receptorja EP4 ne spreminja (Slika 23).



Slika 23: Histogrami prikazujejo MFI, ki odraža ekspresijo receptorja EP4.

a) neoznačena kontrola, b) neoznačena kontrola +DMSO, c) označena kontrola, d) označena kontrola +DMSO. Celice KLL so bile izpostavljene spojinama e) PGE₂ in f) PgE₁-OH.

Predstavljeni rezultati so preliminarni, podatek pa je pozitiven z vidika terapije, saj nakazuje na to, da preiskovana spojina PgE₁-OH ne vpliva na zmanjšanje količine receptorja EP4.

5. SKLEPI

Na podlagi vedenja, da je bil prostaglandinski receptor EP4 označen kot potencialna terapevtska tarča pri KLL (58, 76), smo želeli preveriti več dejavnikov, ki bi lahko prispevali k bolj optimalni uporabi agonista EP4 PgE₁-OH. Biokemijske in genetske dejavnike napovedi učinkovitosti smo proučevali z uporabo bioloških vzorcev zdravih prostovoljcev in bolnikov s KLL.

V prvem sklopu *IN VITRO VREDNOTENJE UČINKOVITOSTI PGE₁-OH* smo potrdili že prej prikazan selektivni citotoksični učinek PgE₁-OH na novih primarnih celicah KLL in glede na veliko inter-individualno variabilnost odziva nanj izpostavili podskupine bolnikov, pri katerih je le-ta izkazoval najboljši učinek. Citotoksičen učinek preiskovane spojine je bil bolj izrazit pri prevladujoči moški populaciji, nanj pa ni vplivala starost bolnikov.

V sklopu *GENOTIPIZACIJA* smo analizirali genska polimorfizma rs4495224 in rs7720838, ki se nahajata v regulatorni regiji gena *Ptger4* in vplivata na ekspresijo receptorja EP4, deregulacija le-te pa se povezuje s številnimi boleznimi. Pogostost genotipov v slovenski populaciji je bila v skladu s pričakovano, prav tako so se podatki ujemali z drugimi raziskavami/podatki iz literature. Prisotnosti določenega genotipa nismo uspeli povezati z večjim tveganjem za KLL v slovenski populaciji. Opredelili smo podskupino, pri kateri je bil PgE₁-OH bolj učinkovit; to so bili nosilci rizičnega alela A (rs4495224), kar je obetavna novica, saj predstavljajo večino bolnikov (62 %).

Sklop *VREDNOTENJE IZRAŽANJA RECEPTORJA EP4* ocenjuje vpliv izražanja receptorja EP4, ki je bil označen za potencialni tumor-supresor gen (55) iz dveh vidikov; na nivoju kvantitativne mRNA ekspresije gena *Ptger4* in na nivoju pretočne citometrije; ekspresije receptorja EP4 na površini celic KLL. Ekspresija gena *Ptger4* je bila večja pri celicah moških darovalcev, z naraščanjem starosti pa smo opazili rahel trend padanja le-te. Mutirani homozigoti AA (rs4495224) so imeli večjo ekspresijo gena *Ptger4* v primerjavi z nemutiranimi homozigoti CC in heterozigoti AC. Med povečano ekspresijo gena *Ptger4* in manjšimi EC₅₀ vrednostmi obstaja statistično značilna korelacija.

Z uporabo pretočne citometrije smo želeli preveriti, ali izbrane spojine vplivajo na spremembo ekspresije receptorja na celicah KLL. Ekspresija receptorja EP4 je bila ohranjena, ko smo le-te izpostavili nativnem ligandu PGE₂ ter preiskovani spojini PgE₁-OH.

Ugotovitev je pozitivna z vidika terapije in nakazuje na to, da preiskovana spojina PgE₁-OH ne vpliva na zmanjšanje količine receptorja EP4.

Po opravljenih testiranjih *in vitro* lahko PgE₁-OH označimo za obetavno spojino. Nizka povprečna vrednost EC₅₀; 12,31 μM (24 h po izpostavitvi) ter 7,67 μM (48 h po izpostavitvi) se je skladala s predhodnimi raziskavami. PgE₁-OH je izkazal dobro delovanje tako pri celicah moških darovalcev in tistih s slabšo prognozo (starejši od 60 let), prav tako pa je učinkovitejši pri prevladujoči skupini bolnikov, to je pri nosilcih mutiranega tipa alela A (rs449256). Naši podatki predstavljajo iztočnice, s pomočjo katerih bi lahko z izbiro najbolj optimalne podskupine bolnikov uravnavali tveganje za doseg maksimalnih učinkov terapije.

Vsekakor predstavljajo zbrani podatki zanimivo osnovo za iskanje povezav s kliničnimi značilnostmi bolnikov in raziskave serije primerov. V prihodnje bi bilo smiselno ustvariti celično linijo KLL in na njej podrobneje raziskati proteinski nivo izražanja NF-κB, cAMP, CREB, c-Myc in ostalih, ki so del signalnih poti BCR in receptorja EP4.

Podatki o pojavnosti izbranih polimorfizmov so prvi tovrstni pri KLL, v prihodnosti bi bilo smiselno razširiti nabor vzorcev oziroma primerjati ugotovitve na tujih kohortah. Kmalu bo navedene *in vitro* in *in silico* hipoteze potrebno potrditi tudi na modelnih živalih *in vivo*.

Izjemna heterogenost KLL je bila potrjena tudi po naših eksperimentih, *status quo* zlate dobe novih tehnologij pa obeta, da bomo v prihodnosti z detektiranjem bolnikovega edinstvenega genskega »finger printa« in sledeče optimizacije terapije uspeli premagati marsikatero maligno obolenje.

6. LITERATURA

1. WHO | Cancer. WHO. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. (13.4.2017)
2. HMRN - Incidence. <https://www.hmrn.org/statistics/incidence> (13.4.2017)
3. Društvo BKB. <http://www.drustvo-bkb.si/o-krvnih-bolezni/akutne-in-kronicne-levkemije/> (13.4.2017)
4. Harris NL, Jaffe ES. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues 1997.
5. What Factors Affect a Chronic Lymphocytic Leukemia Prognosis? wiseGEEK. <http://www.wisegeek.com/what-factors-affect-a-chronic-lymphocytic-leukemia-prognosis.html>. (7.4.2017)
6. Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW.: Chronic Lymphocytic Leukemia. ASH Educ. Program Book 2004;1:163–83.
7. Zver S: Smernice za odkrivanje in zdravljenje kronične limfatične levkemije. Zdrav Vestn 2010; 79: 465-74.
8. Hallek M: Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. American Journal of Hematology 2015; 90(5):446-60.
9. Nabhan C, et al.: The impact of race, ethnicity, age and sex on clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive Surveillance, Epidemiology, and End Results analysis in the modern era. Leuk. Lymphoma. 2014; 55:2778–2784.
10. Chronic Lymphocytic Leukemia - Cancer Stat Facts. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/clyl.html>. (12.4.2017)
11. Rak v Sloveniji 2013. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije, 2016.
12. Cerhan JR, Slager SL. Familial predisposition and genetic risk factors for lymphoma. Blood. 2015; 126:2265–2273.
13. Kipps TJ, et al.: Chronic lymphocytic leukaemia, Nat Rev Dis Primers. 2017; 3: 16096.
14. Damm F, Mylonas E, Cosson A, Yoshida K, Valle VD, et al.: Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. Cancer Discov. 2014; 4(9):1088–1101.
15. Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D. Interna medicina. Ljubljana: Založba Littera Picta. 2005;1256-1257. pp. tretja izdaja ed.
16. Cui B, Chen L, Zhang S, Mraz M, Fecteau J-F, et al.: MicroRNA-155 influences B-cell receptor signaling and associates with aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2014;124(4):546–54.
17. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, et al.: miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2005;102(39):13944–49.
18. Rendeiro AF, Schmidl C, Strefford JC, Walewska R, Davis Z, Farlik M, Oscier D, Bock C: Chromatin accessibility maps of chronic lymphocytic leukaemia identify subtype-specific epigenome signatures and transcription regulatory networks. Nat Commun. 2016; 27;7:11938.
19. Novaković S, Jezeršek Novaković B, Strojjan P, Žgajnar J. Onkologija. 2009, Ljubljana: Mladinska knjiga. 35 pp.
20. Chronic Lymphocytic Leukemia - 3. Available at: <http://imagebank.hematology.org/image/2047/chronic-lymphocytic-leukemia--3>. (23.5.2017)

21. A.D.A.M. OnDemand™ - Understanding Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). Available at: <http://www.adamondemand.com/understanding-chronic-lymphocytic-leukemia/#.WSSxsGjyiM9>. (23.5.2017)
22. Weirda WG, O'Brian S, Wang X, Magnac C, Porsher R, Davi F, et al.: Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with CLL. *Blood* 2007; 109: 4679–85.
23. Leukemia - Chronic Lymphocytic - CLL: Diagnosis. Cancer.Net (2012). Available at: <http://www.cancer.net/cancer-types/leukemia-chronic-lymphocytic-cll/diagnosis>. (23.5.2017)
24. Lopez-Guerra M, Colomer D: NF-kappaB as a therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Expert Opin Ther Targets* 2010;14(3):275-88.
25. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, et al.: A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981; 48(1):198–206.
26. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS: Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975; 46 (2): 219–234.
27. Hallek M, et al.: Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute–Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008; 111(12): 5446–5456.
28. Chen C, Puvvada S.: Prognostic Factors for Chronic Lymphocytic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2016; 11(1):37-42.
29. al, O. M., et. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. - PubMed - NCBI. Available at: <https://sci-hub.cc/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7165009>. (23.5.2017)
30. European Medicines Agency. Guideline on the use of minimal residue disease as an endpoint in chronic lymphocytic leukaemia studies. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2014/12/WC500179047.pdf (15.5.2017)
31. Kay NE, Rai KR, O'Brien S.: Chronic lymphocytic leukemia: current and emerging treatment approaches. *Clin. Adv. Hematol. Oncol. HO*. 2006; 4(11 Suppl 22):1-10; quiz 11-12.
32. Egle A.: Milestones in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Memo*. 2017; 10(1):8–12.
33. Catovsky D, Richards S, Matutes E, Oscier D, Dyer MJS, et al.: Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *The Lancet*. 2007; 370(9583):230–39.
34. Liu JZ, Anderson CA: Genetic studies of Crohn's disease: Past, present and future. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2014; 28(3): 373–386.
35. Wierda W, O'Brien S, Wen S, Faderl S, Garcia-Manero G, Thomas D, et al.: Chemoimmunotherapy with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab for relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2005;23(18):4070–4078.
36. Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, Glide S, Davis ZA, Ibbotson RE, et al.: Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 2002;100:1177–1184.
37. JE C, BS K.: Bendamustine for treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Expert Opin. Pharmacother*. 2012; 13(10):1495–1505.

38. Stilgenbauer S, Eichhorst B, Schetelig J, Coutre S, Seymour JF, et al.: Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2016; 17(6):768–78.
39. Community register of orphan medicinal products. Available at: <http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/html/o1617.htm>. (23.5.2017)
40. Ferrajoli A, Lee B-N, Schlette EJ, O'Brien SM, Gao H, et al.: Lenalidomide induces complete and partial remissions in patients with relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2008; 111(11):5291–97.
41. Chanan-Khan A, Egyed M, Robak T, Martinelli de Oliveira FA, Echeveste MA, et al.: Randomized phase 3 study of lenalidomide versus chlorambucil as first-line therapy for older patients with chronic lymphocytic leukemia (the ORIGIN trial). *Leukemia.* 2017; 31(5):1240–43.
42. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH.: Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2011; 365(8):725–33.
43. Voorhies BN, Stephens DM.: What Is Optimal Front-Line Therapy for Chronic Lymphocytic Leukemia in 2017? *Curr. Treat. Options Oncol.* 2017;18(2):12.
44. Next-Generation Microscopy. “Pharmacoscopy” enables immunomodulatory drug discovery by analyzing immune cell interactions. http://cemm.at/fileadmin/img/News/PR_Pharmacoscopy_English_-_PDF.pdf (1.5.2017)
45. Pepper C, Lin TT, Pratt G, Hewamana S, Brennan P, et al.: Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood.* 2008; 112(9):3807–17.
46. Gobec M, et al.: Chemo-sensitizing effects of EP4 receptor-induced inactivation of nuclear factor- κ B. *Eur J Pharmacol* 2014; 742: 81-88.
47. Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, Glide S, Davis ZA, et al.: Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood.* 2002; 100(4):1177–84.
48. de Graaf AO, van Krieken JH, Tonnissen E: Expression of C-IAP1, C-IAP2 and survivin discriminates different types of lymphoid malignancies. *Br J Haematol.* 2005; pp. 852–59.
49. Škerget M.: Pomen prvega zdravljenja kronične limfocitne levkemije s tremi uveljavljenimi shemami. *Zdrav Vestn* 2012; 81 supl 2: II-92-98.
50. Podgornik H, Gržinič N, Černelč P: Kronična limfatična levkemija. *Farm vestn.* 2013; 64: 354-362.
51. Leglera DF, Bruckner M, Uetz-von Allmena E, Krause P: Prostaglandin E2 at new glance: Novel insights in functional diversity offer therapeutic chances. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2010; 42(2): 198–201.
52. Fujino H: The Roles of EP4 Prostanoid Receptors in Cancer Malignancy Signaling. *Biol Pharm Bull* 2016; 39, 149-155.
53. Prijatelj M, Celhar T, Mlinarič-Raščan I: Prostaglandin EP4 receptor enhances BCR-induced apoptosis of immature B cells. *Prostaglandin and other lipid mediators* 2011; 95: 19-26.
54. Viktoria Konya, Gunther Marsche, Rufina Schuligoi, Akos Heinemann: E-type prostanoid receptor 4 (EP4) in disease and therapy. *Pharmacology & Therapeutics* 2013; 138: 485–502.
55. Murn J, Alibert O, Wu N, Tendil S, Gidrol X.: Prostaglandin E2 regulates B cell proliferation through a candidate tumor suppressor, Ptger4. *J. Exp. Med.* 2008; 205(13):3091–3103.

56. Murn J, Mlinaric-Rascan I, Vaigot P, Alibert O, Frouin V and Gidrol X: A Myc-regulated transcriptional network controls B-cell fate in response to BCR triggering. *BMC Genomics* 2009; 10; 323.
57. Prijatelj M, Celhar T, Gobec M, Mlinaric-Rascan I: EP4 receptor signalling in immature B cells involves cAMP and NF- κ B dependent pathways. *J Pharm Pharmacol* 2012; 64(8):1090-8.
58. Vidmar M: Vrednotenje prostaglandinskega receptorja EP4 kot potencialne tarče za zdravljenje kronične limfocitne levkemije - magistrska naloga. Ljubljana, 2015.
59. Lohse M: Receptor research for the drugs of the future at ECE 2016. European Society of Endocrinology. <https://www.youtube.com/watch?v=H8hGTnul16E&t=1487s> (23.4.2017)
60. Kenakin T, Christopoulos A: Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12(3):205-16.
61. Frank DA, Mahajan S, Ritz J. B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia contain signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 and STAT3 constitutively phosphorylated on serine residues. *J Clin Invest.* 1997; 100:3140–8.
62. Liu Z, Hazan-Halevy I, Harris DM, Li P, Ferrajoli A, Faderl S, et al. STAT-3 activates NF-kappaB in chronic lymphocytic leukemia cells. *Mol Cancer Res.* 2011; 9:507–15.
63. Murray F, Insel PA: Targeting cAMP in chronic lymphocytic leukemia: a pathway-dependent approach for the treatment of leukemia and lymphoma. *Expert Opin Ther Targets* 2013; 17(8): 937-949.
64. D’Auria F, Pietro RD: Role of CREB Protein Family Members in Human Haematological Malignancies. “Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches” 2013; Chapter 23.
65. Meyers JA, Su DW, Lerner A. 2009. Chronic Lymphocytic Leukemia and B and T Cells Differ in Their Response to Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Inhibitors. *J. Immunol.* 182(9):5400–5411.
66. NF- κ B Signaling Pathway | Cell Signaling Technology. <https://www.cellsignal.com/contents/science-pathway-research-immunology-andinflammation/nf-b-signaling-pathway/pathways-nfkb>
67. Rozovski U, Keating JM, Estrov Z: Targeting inflammatory pathways in chronic lymphocytic leukemia. *Oncology/Hematology* 2013; 88: 655-666.
68. Foord SM, Marks B, Stolz M, Bufflier E, Fraser NJ, Lee MG. 1996. The Structure of the Prostaglandin EP4 Receptor Gene and Related Pseudogenes. *Genomics.* 35(1):182–88.
69. Libioulle, et al.: Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4. *PLoS Genet.* 2007;3:e58.
70. Gene: PTGER4 (ENSG00000171522) - Summary - Homo sapiens - Ensembl genome browser 88. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000171522;r=5:40679214-40694019 (12.4.2017)
71. Šaulienė I, Greičiuvienė J, Šukienė L, Juškevičiūtė N, Benner C, et al.: Genetic Loci Associated with Allergic Sensitization in Lithuanians. *PLOS ONE* 2015;10(7):e0134188.
72. Glas J, et al. PTGER4 expression-modulating polymorphisms in the 5p13.1 region predispose to Crohn’s disease and affect NF-kappaB and XBP1 binding sites. *PLoS ONE.* 2012; 7:e52873.
73. Prager M, Büttner J. Büning C: PTGER4 modulating variants in Crohn’s disease. *Int. J. Colorectal Dis.* 2014; 29, 909–915.

74. Markovič T, Gobec M, Gurwitz D, Mlinarič-Raščan I.: Characterization of human lymphoblastoid cell lines as a novel in vitro test system to predict the immunotoxicity of xenobiotics. *Toxicol. Lett.* 2015; 233(1):8–15.
75. Morag A, Kirchheiner J, Rehavi M, Gurwitz D.: Human lymphoblastoid cell line panels: novel tools for assessing shared drug pathways. *Pharmacogenomics.* 2010; 11(3):327–40.
76. Doljak R: Sinergistično delovanje agonista receptorja EP4 in terapevtskih monoklonskih protiteles in vitro - magistrska naloga. Ljubljana, 2014.
77. Dey I, Beck PL, Chadee K: Lymphocytic Colitis Is Associated with Increased Pro-Inflammatory Cytokine Profile and Up Regulation of Prostaglandin Receptor EP4. *PLoS ONE* 2013; 8(4): e61891.
78. Sales KJ, Katz AA, Davis M, Hinz S, Soeters RP, et al.: Cyclooxygenase-2 Expression and Prostaglandin E2 Synthesis Are Up-Regulated in Carcinomas of the Cervix: A Possible Autocrine/Paracrine Regulation of Neoplastic Cell Function via EP2/EP4 Receptors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001; 86(5):2243–49.
79. Catalano RD, Wilson MR, Boddy SC, McKinlay ATM, Sales KJ, Jabbour HN.: Hypoxia and Prostaglandin E Receptor 4 Signalling Pathways Synergise to Promote Endometrial Adenocarcinoma Cell Proliferation and Tumour Growth. *PLOS ONE* 2011; 6(5):e19209.
80. Zhang Y, Purayil HT, Black JB, Fetto F, Lynch LD, et al.: Prostaglandin E2 receptor 4 mediates renal cell carcinoma intravasation and metastasis. *Cancer Lett.* 2017; 391:50–58.
81. Chell SD, Witherden IR, Dobson RR, Moorghen M, Herman AA, et al.: Increased EP4 Receptor Expression in Colorectal Cancer Progression Promotes Cell Growth and Anchorage Independence. *Cancer Res.* 2006; 66(6):3106–13.
82. Pubchem. Open chemistry database.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imgsrv.fcgi?cid=5280360&t=1>. (13.4.2017)
83. Pubchem. Open chemistry database.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imgsrv.fcgi?cid=57340014&t=1>. (13.4.2017)
84. Pubchem. Open chemistry database.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imgsrv.fcgi?cid=9803828&t=1>. (13.4.2017)
85. Štolfa T.: Preučevanje imunomodulatorne vloge agonista prostaglandinskega receptorja EP4. 2017. (v pripravi)
86. Protocolos.
<https://intranet.pasteur.edu.uy/publico/bonilla/Protocolos/Protocolos%20en%20inmuno/Aislamiento%20de%20celulas%20B.pdf>. (7.4.2016)
87. Going Their Separate Ways: A Profile of Products for Cell Separation | The Scientist Magazine®. The Scientist. <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/19557/title/Going-Their-Separate-Ways--A-Profile-of-Products-for-Cell-Separation/> (12.4.2017)
88. RosetteSep™: Cell Isolation Directly From Whole Blood Without Columns or Magnets.
<https://www.youtube.com/watch?v=YSSTZQvzisc#t=82> (7.4.2016)
89. RosetteSep™ HLA Procedure.
<http://www.stemcell.so/images/upload/pdf/527c94e612aae.pdf>. (7.4.2016)
90. RosetteSep™. <http://www.veritastk.co.jp/news.php?id=347> (7.4.2016)
91. Invitrogen: Vanderbilt university.
<http://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf>. (27.4.2017)
92. Cell Counting with Neubauer Chamber. Available at:
<http://www.celeromics.com/en/resources/Technical%20Notes/cover-cell-glass.php>. (24.5.2017)

93. Counting cells using a hemocytometer | Abcam. Available at: <http://www.abcam.com/protocols/counting-cells-using-a-haemocytometer>. (24.5.2017)
94. hemocytometer-corner-square-area.png (718×718). Available at: <https://www.hemocytometer.org/wp-content/uploads/2013/04/hemocytometer-corner-square-area.png>. (24.5.2017)
95. Reduction of resazurin to resorufin in living cells (with NADH). <https://en.wikipedia.org/wiki/Resazurin#/media/File:ResazurinTOresorufin.png> (24.4.2017)
96. Borra RC, Lotufo MA, Gaglioti SM, Barros F de M, Andrade PM.: A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. *Braz. Oral Res.* 2009; 23(3):255–62.
97. Bishop LM, Fody PE, Schoeff EL: *Clinical chemistry: principles, procedures, correlations.* 5 izdaja. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2005: 159-160.
98. Vaje iz Biomedicinske analitike: gradivo za interno uporabo. Biomedicinska analitika: Uporaba pretočne citometrije za preučevanje mehanizmov citotoksičnosti. http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/KB/Gradivo/PC_gradivo_BMA.pdf (26.4.2017)
99. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1998; 16(3):1215.
100. MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit. Epicentre, an Illumina company, California, USA, 6/2012. <http://www.epibio.com/docs/default-source/protocols/masterpure-complete-dna-and-rna-purification-kit.pdf?sfvrsn=6>. (7.4.2016)
101. NanoDrop Microvolume Spectrophotometers and Fluorometer. Available at: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/ultraviolet-visible-visible-spectrophotometry-uv-vis-vis/uv-vis-vis-instruments/nanodrop-microvolume-spectrophotometers.html>. (24.5.2017)
102. Černe D, Ostanek B.: *Biomedicinska analitika I. Učbenik za študente laboratorijske biomedicine.* Ljubljana: Fakulteta za farmacijo. 2012; 108-145 pp.
103. Reed GH, Kent JO, Wittwer CT.: High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics.* 2007; 8(6):597–608.
104. Ha BK, Boerma HR. High-throughput SNP Genotyping by Melting Curve Analysis for Resistance to Southern Root-knot Nematode and Frogeye Leaf Spot in Soybean. *J Crop Sci Biotech* 2008; 11(2): 9–100.
105. Technical Note. http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:uEdmwCnPJMYJ:esilrch1.esi.umontreal.ca/~lampronp/files/assay_formats.pdf+&cd=1&hl=sl&ct=clnk&gl=at (10.5.2017)
106. LightCycler Real-time PCR. https://dna.utah.edu/LightCycler/Top_LightCycler.html (12.4.2016)
107. Genotyping using the LightCycler® 480 System. https://lifescience.roche.com/global_en/articles/genotyping-using-the-lightCycler-480-System.html (12.4.2016)
108. LightCycler FastStart DNA Master HybProbe. Instructions for Use. Version 15. <https://pim-eservices.roche.com/LifeScience/Document/1664bab6-98f5-e311-98a1-00215a9b0ba8> (30.4.2017)
109. PureLink® RNA Mini Kit. For purification of total RNA from a large variety of samples. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink_rna_mini_kit_man.pdf. (8.4.2016)

110. TaqMan Assays vs. SYBR Green Dye for qPCR. Available at: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/taqman-assays-vs-sybr-green-dye-for-qpcr.html>. (24.5.2017)
111. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, et al.: Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J. Biotechnol.* 1999; 75(2–3):291–95.
112. GraphPad Software. Available at: <https://www.graphpad.com/quickcalcs/>. (24.5.2017)
113. Sal.Khan Academy. Hardy-Weinberg Principle. <http://www.khanacademy.org/science/biology/v/hardy-weinberg-principle>. (24.5.2017)
114. Molica S: Sex differences in incidence and outcome of chronic lymphocytic leukemia patients. *Leuk Lymphoma* 2006;47:1477–1480.
115. Sugimoto Y, Narumiya S.: Prostaglandin E Receptors. *J. Biol. Chem.* 2007; 282(16):11613–17.
116. Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS.: Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood* 2006; 107(1):265–76.
117. Galton F: Regression towards mediocrity in hereditary stature. *Journal of the Anthropological Institute of Great Britain and Ireland*, 1886; 15:246–263.
118. Cornejo-García JA, et al.: Pharmacogenomics of Prostaglandin and Leukotriene Receptors. *Front. Pharmacol.* 2016; 7:316.
119. Kurz T, et al.: Fine mapping and positional candidate studies on chromosome 5p13 identify multiple asthma susceptibility loci. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 118:396–402.
120. Kabashima K, Sakata D, Nagamachi M, Miyachi Y, Inaba K, Narumiya S.: Prostaglandin E2–EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells. *Nat. Med.* 2003;9(6):744–49.
121. Yao C, Sakata D, Esaki Y, Li Y, Matsuoka T, et al.: Prostaglandin E2–EP4 signaling promotes immune inflammation through TH1 cell differentiation and TH17 cell expansion. *Nat. Med.* 2009; 15(6):633–40.
122. Mauro FR, Foa R, Giannarelli D, Cordone I, Crescenzi S, et al.: Clinical Characteristics and Outcome of Young Chronic Lymphocytic Leukemia Patients: A Single Institution Study of 204 Cases. *Blood.* 1999; 94(2):448–54.
123. Cartwright RA, Gurney KA, Moorman AV.: Sex ratios and the risks of haematological malignancies. *Br. J. Haematol.* 2002; 118(4):1071–77.
124. Marteau J-B, Rigaud O, Brugat T, Gault N, Vallat L, et al.: Concomitant heterochromatinisation and down-regulation of gene expression unveils epigenetic silencing of RELB in an aggressive subset of chronic lymphocytic leukemia in males. *BMC Med. Genomics.* 2010;3:53.
125. Vlahopoulos SA, Cen O, Hengen N, Agan J, Moschovi M, et al.: Dynamic aberrant NF-κB spurs tumorigenesis: a new model encompassing the microenvironment. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015; 26(4):389–403.
126. Ober C., Loisel D. A., Gilad Y.: Sex-specific genetic architecture of human disease. *Nat. Rev. Genet.* 2008; 9, 911–922. [1038/nrg2415](https://doi.org/10.1038/nrg2415).
127. Bernstein CN, Wajda A, Svenson LW, MacKenzie A, Koehoorn M, et al.: The Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease in Canada: A Population-Based Study. *Am. J. Gastroenterol.* 2006; 101(7):1559–68.
128. Vind I, Riis L, Jess T, Knudsen E, Pedersen N, et al.: Increasing Incidences of Inflammatory Bowel Disease and Decreasing Surgery Rates in Copenhagen City and County, 2003–2005:

A Population-Based Study from the Danish Crohn Colitis Database. *Am. J. Gastroenterol.* 2006;101(6):1274–82.

129. Dorak MT, Karpuzoglu E.: Gender Differences in Cancer Susceptibility: An Inadequately Addressed Issue. *Front. Genet.* 2012;3:268.

7. PRILOGE

Priloga 1: *EC₅₀ vrednosti KLL celic 24 h in 48 h po izpostavitvi PgE₁-OH*

št. vzorca	EC ₅₀ 24 h (μM)	EC ₅₀ 48 h (μM)	analiza	št. vzorca	EC ₅₀ 24 h (μM)	EC ₅₀ 48 h (μM)	analiza
12	ND	11,92	TŠ, KN	114	9,34	9,26	TŠ, KN
13	29,73	ND	TŠ, KN	115	11,82	5,49	TŠ, KN
14	6,50	0,36	TŠ, KN	116	16,45	14,46	TŠ, KN
17	23,41	13,09	TŠ, KN	117	12,05	1,39	TŠ, KN
24	21,82	14,52	TŠ, KN	118	10,09	0,47	TŠ, KN
25	11,89	6,71	TŠ, KN	119	32,85	9,05	TŠ, KN
32	11,83	1,54	TŠ, KN	120	10,40	8,20	TŠ, KN
34	0,97	7,68	TŠ, KN	123	14,13	ND	TŠ, KN
36	25,81	10,28	MV	188	9,47	10,35	TŠ, KN
37	12,45	6,20	MV	125	15,71	7,36	TŠ, KN
38	25,73	11,33	MV	126	11,90	ND	TŠ, KN
39	10,91	4,52	MV	127	4,16	ND	TŠ, KN
41	14,79	4,88	MV	128	6,65	5,46	TŠ, KN
47	5,51	0,16	MV	129	7,27	5,89	TŠ, KN
48	30,07	1,21	MV	130	6,93	5,24	TŠ, KN
50	18,28	0,72	MV	131	10,02	ND	TŠ, KN
51	46,19	12,18	MV	134	12,27	13,27	TŠ, KN
52	47,62	24,44	MV	135	21,35	16,96	TŠ, KN
53	51,44	33,04	MV	136	5,49	ND	TŠ, KN
54	55,07	44,80	MV	137	11,04	9,82	TŠ, KN
58	3,76	1,38	MV	138	13,22	37,90	TŠ, KN
61	9,59	6,49	MV	139	10,05	ND	TŠ, KN
63	10,64	8,45	MV	140	16,62	13,88	TŠ, KN
64	7,41	4,63	MV	141	17,03	5,88	TŠ, KN
65	19,67	11,87	MV	143	9,39	6,62	TŠ, KN
66	7,68	3,60	MV	144	14,11	24,54	TŠ, KN
68	15,91	10,05	MV	145	18,11	11,51	TŠ, KN
69	12,64	6,00	MV	146	16,73	7,23	TŠ, KN
71	13,99	8,10	MV	147	8,80	9,05	TŠ, KN
72	9,58	3,13	MV	148	10,63	6,01	TŠ, KN

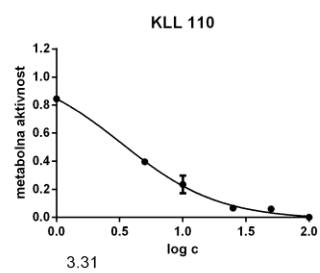
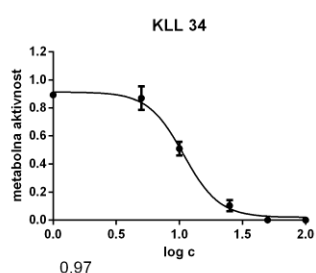
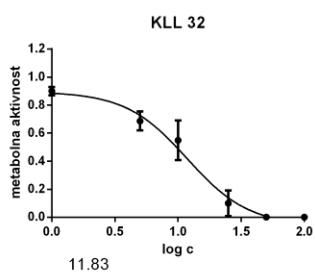
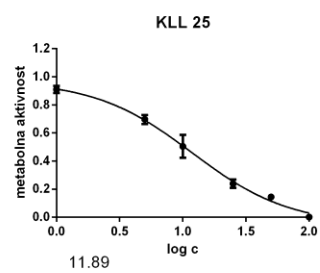
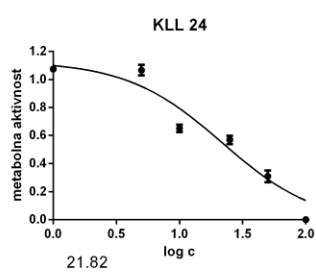
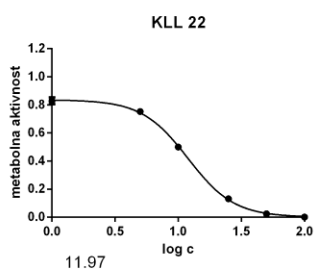
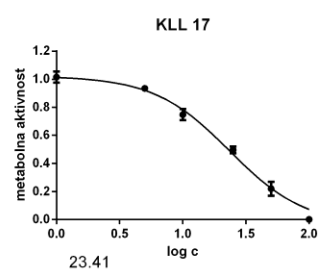
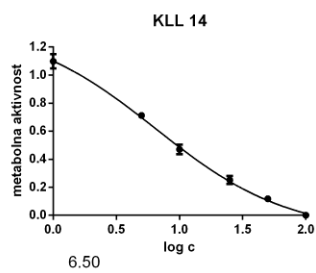
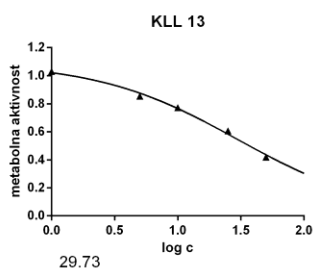
73	9,61	5,77	MV	150	12,24	7,65	TŠ, KN
74	34,59	12,43	MV	152	7,85	6,69	TŠ, KN
76	11,16	6,82	MV	158	12,03	6,99	TŠ, KN
77	53,88	27,22	MV	159	11,36	7,35	TŠ, KN
78	8,22	5,95	MV	160	8,58	6,40	TŠ, KN
80	9,47	7,56	MV	161	18,17	8,10	TŠ, KN
81	12,43	8,12	MV	163	13,43	1,96	TŠ, KN
82	8,58	5,92	MV	166	14,03	6,89	TŠ, KN
83	5,83	5,47	MV	167	6,52	ND	TŠ, KN
84	10,90	1,76	MV	168	11,24	ND	TŠ, KN
85	6,29	5,08	MV	169	9,32	5,87	TŠ, KN
87	29,57	11,86	MV	170	5,38	ND	TŠ, KN
88	7,81	2,93	MV	171	6,81	5,28	TŠ, KN
93	32,67	10,38	MV	172	7,23	5,20	TŠ, KN
94	7,80	6,03	MV	173	6,84	4,44	TŠ, KN
95	7,40	5,72	MV	174	7,55	3,57	TŠ, KN
96	8,02	5,75	MV	175	19,31	4,92	TŠ, KN
97	7,94	6,24	MV	176	11,23	5,86	TŠ, KN
98	10,23	5,68	MV	177	7,92	ND	TŠ, KN
99	26,53	11,40	MV	181	26,34	5,60	TŠ, KN
100	8,69	5,06	MV	182	10,91	4,62	TŠ, KN
101	7,83	2,21	MV	183	9,67	6,64	TŠ, KN
103	6,48	6,00	MV	184	6,00	4,96	TŠ, KN
104	14,33	7,27	MV	186	11,51	1,85	TŠ, KN
105	45,25	15,19	MV	187	9,65	ND	TŠ, KN
107	11,70	7,67	MV	189	11,53	7,04	TŠ, KN
108	12,04	7,56	MV	190	14,28	6,75	TŠ, KN
109	8,43	6,22	MV	192	11,67	5,65	TŠ, KN
110	3,31	0,00	TŠ, KN	193	8,69	0,02	TŠ, KN
111	11,18	0,48	TŠ, KN	194	8,35	6,58	TŠ, KN
112	11,37	6,77	TŠ, KN	196	9,08	5,15	TŠ, KN
113	34,98	12,21	TŠ, KN				

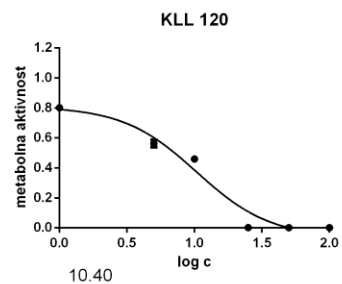
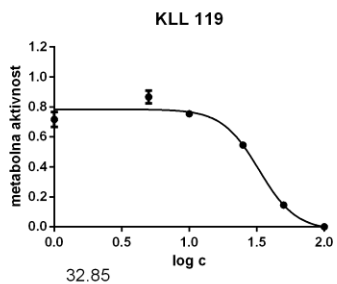
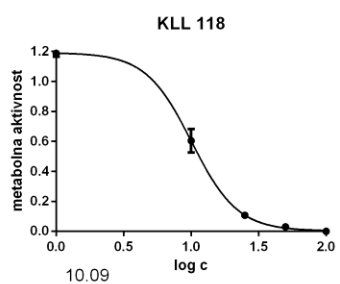
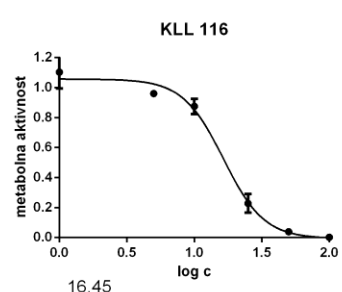
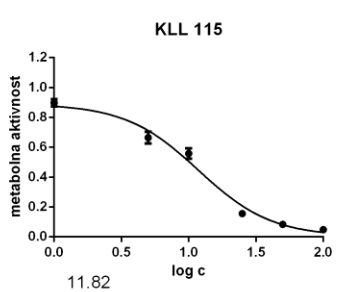
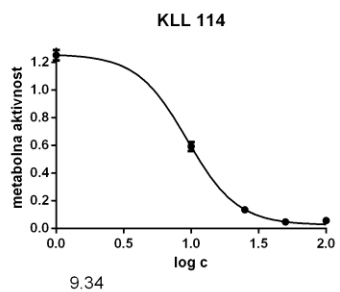
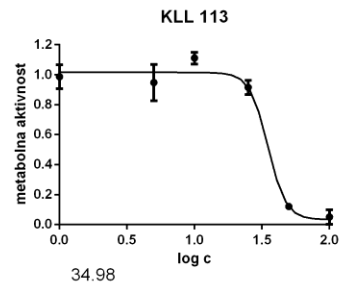
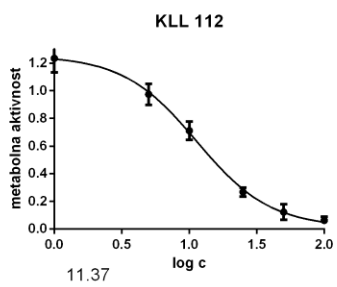
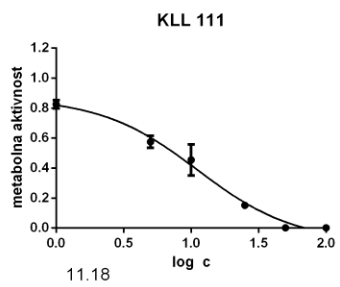
MV - Maša Vidmar (58), TŠ, KN - Tjaša Štolfa (85), Katarina Nemeč.

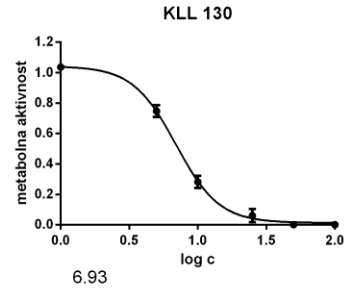
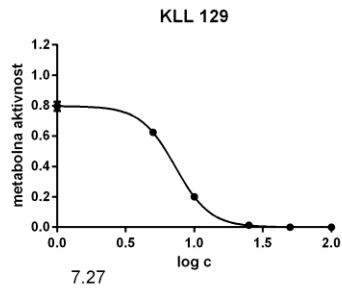
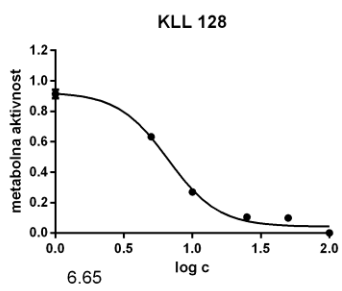
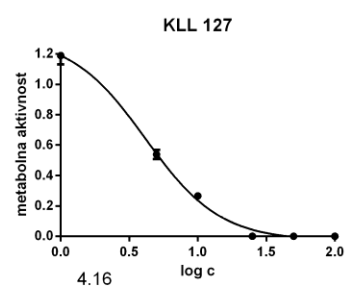
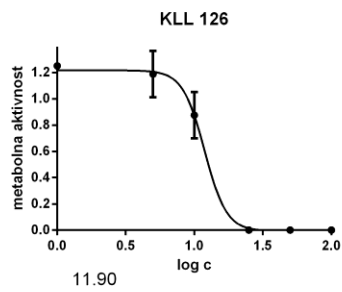
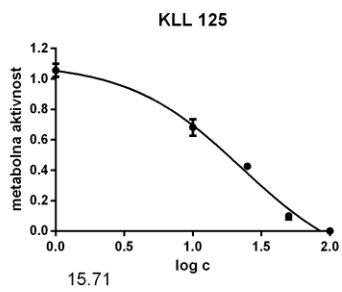
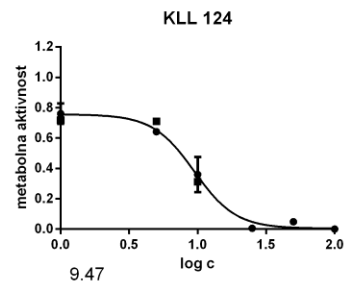
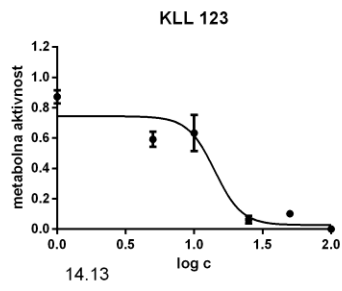
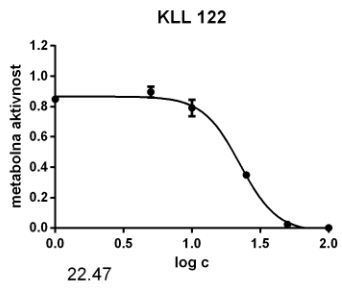
Priloga 2: Preglednica sprememb ekspresije gena *Ptger4* in EC₅₀ vrednosti spojine PgE₁-OH bolnikov, ki so se ponovili

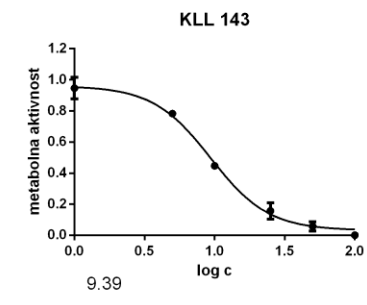
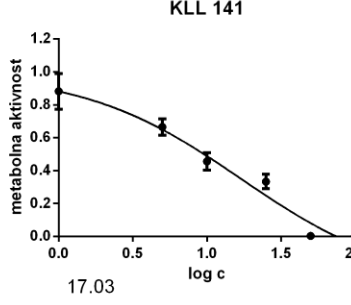
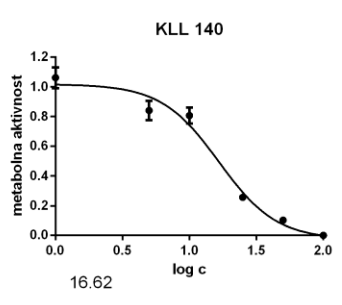
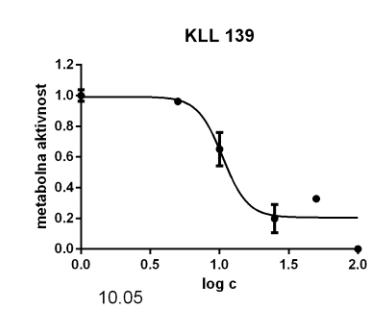
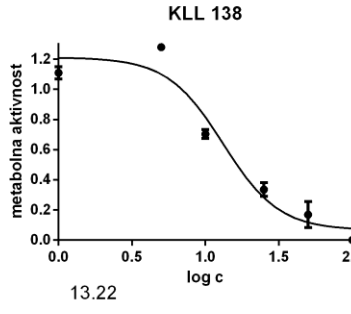
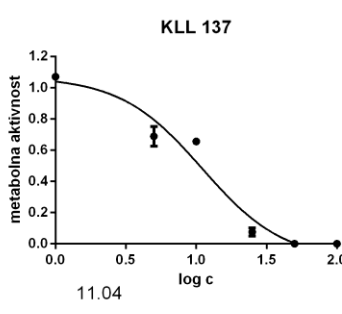
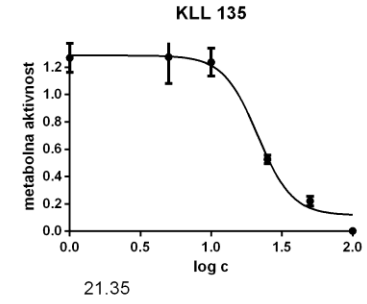
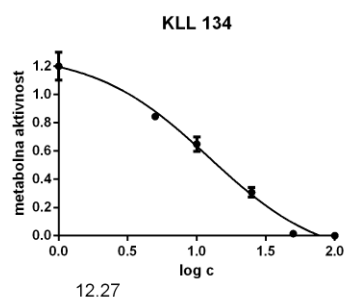
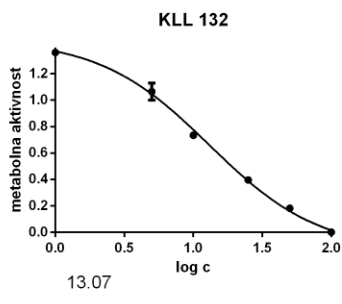
ŠT.VZORCA	SPOL	rs4495224	rs7720838	EC ₅₀ (24 h)	EC ₅₀ (48 h)	<i>Ptger4</i> normirana	sprememba ekspresije
14	M	AC	GT	6,50	0,36	ND	↑
				22,47	15,26	1,89	
				ND	ND	7,12	
18	Ž	CC	GT	ND	ND	1,22	↑
				34,59	12,43	0,78	
				ND	ND	7,13	
22	Ž	AA	GG	11,97	8,62	1,38	↓
				12,45	6,20	0,48	
32	M	AC	GG	11,83	1,54	1,16	↑
				ND	ND	3,57	
48	Ž	AC	GT	30,07	1,21	1,29	↑
				ND	ND	3,64	
51	Ž	AC	GG	46,19	12,18	ND	
				18,17	8,10	0,22	
64	Ž	AC	GT	7,41	4,63	0,80	↓
				13,07	4,35	0,50	
73	M	AC	GT	9,61	5,77	1,77	~
				ND	ND	1,61	
110	M	AC	GT	3,31	0,00048	0,89	↑
				ND	ND	1,17	
124	Ž	AA	TT	9,47	10,35	0,35	↑
				ND	ND	0,70	
				ND	ND	1,30	
125	Ž	AC	GT	15,71	7,36	0,08	↑
				ND	ND	0,19	
168	M	AA	TT	11,24	ND	3,32	↓
				ND	ND	2,14	

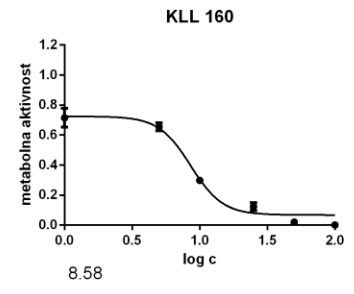
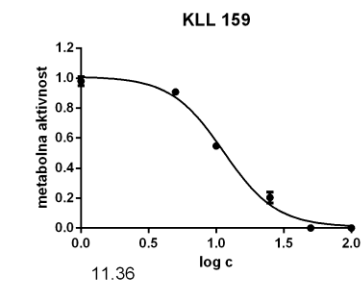
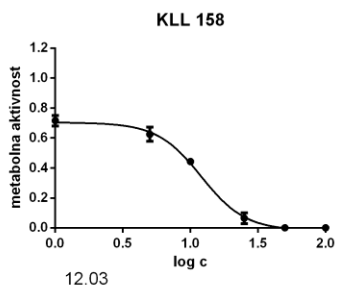
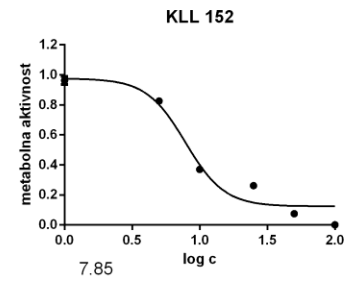
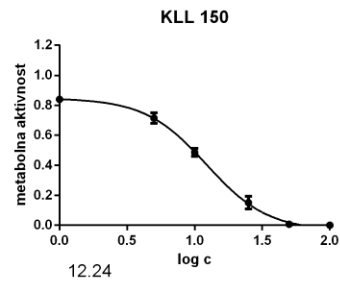
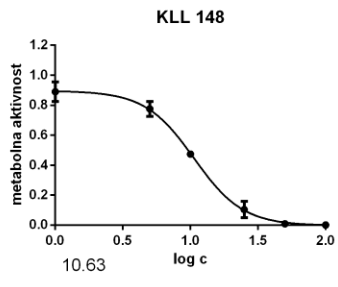
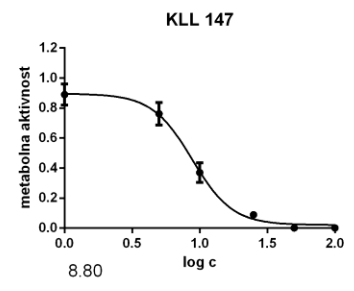
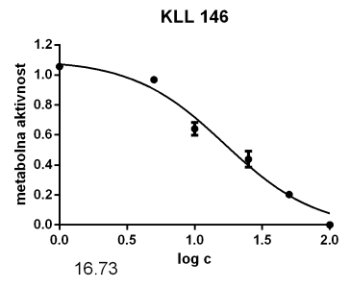
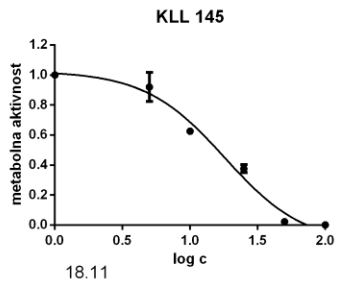
Priloga 3: Grafi EC₅₀ vrednosti po 24 h

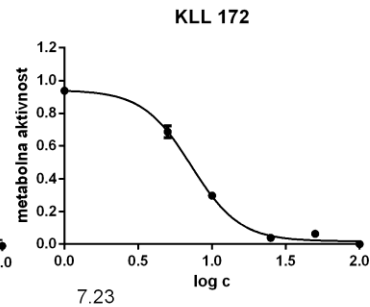
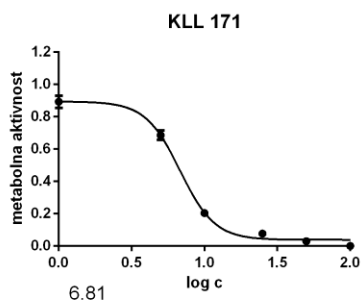
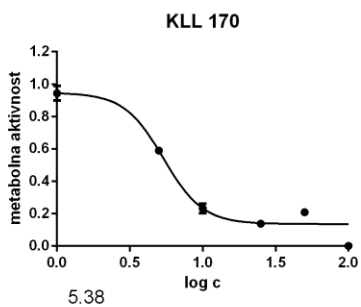
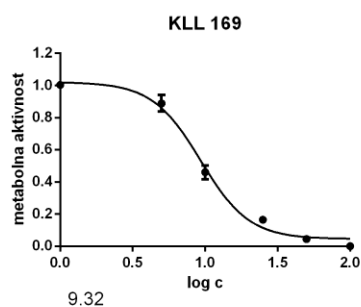
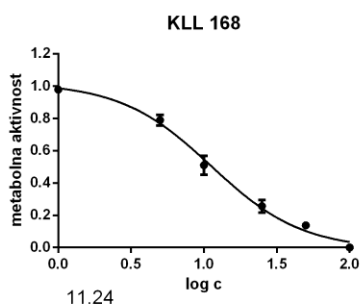
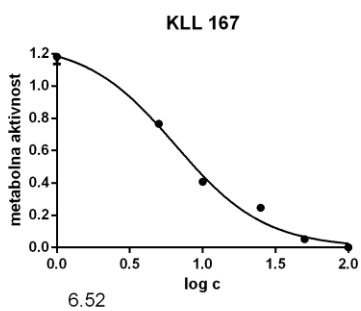
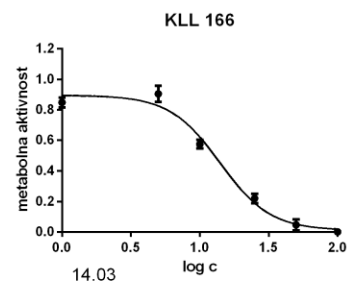
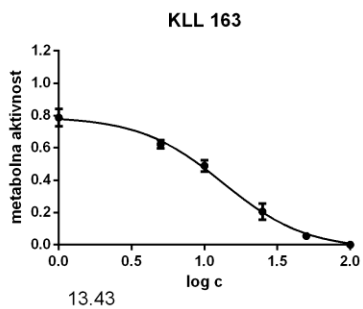
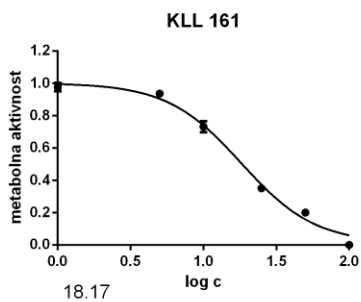


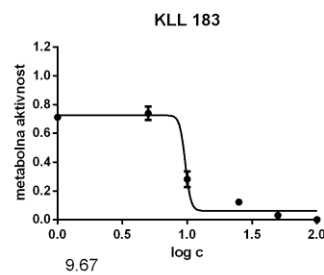
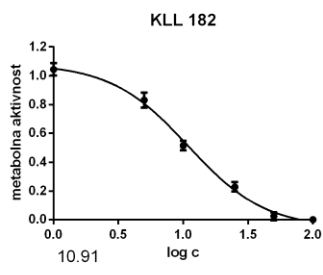
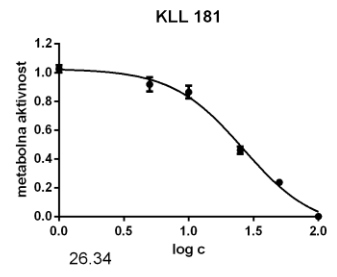
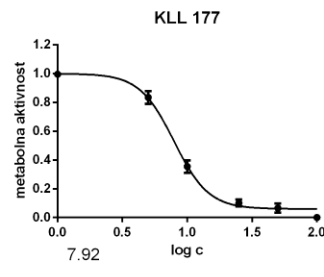
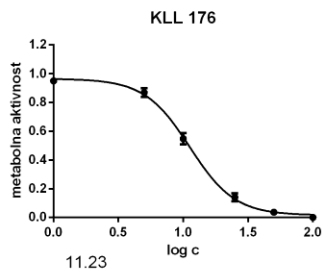
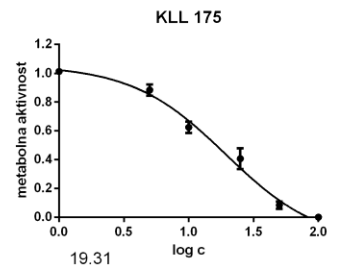
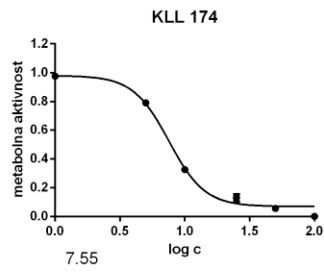
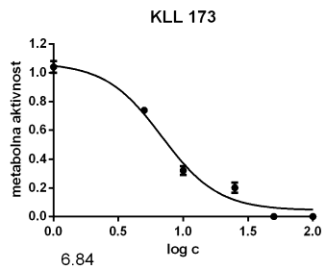












Priloga 4: Podatki bolnikov z določenimi vrednostmi EC₅₀ za PgE1-OH, podatki o polimorfizmih rs4495224 in rs7720838 ter normirana ekspresija gena *Ptger4*

VZOREC	SPOL	STAROST	EC ₅₀ (24 h)	EC ₅₀ (48 h)	rs4495224	rs7720838	<i>Ptger4</i>
2	M	80	ND	ND	CC	GG	ND
3	M	72	ND	ND	AC	GT	ND
4a	Ž	59	ND	ND	AC	GT	ND
5a	Ž	62	ND	ND	AA	TT	ND
6a	Ž	69	ND	ND	AC	GT	ND
7	Ž	61	ND	ND	AA	TT	ND
12	M	75	ND	11,92	AC	GT	ND
13	Ž	60	29,73	ND	CC	GG	0,57
14a	M	74	6,50	0,36	AC	GT	ND
15	M	80	ND	ND	AC	GT	2,07
16	M	55	ND	ND	AA	GT	1,95
17	Ž	85	23,41	13,09	AA	TT	0,70
18a	Ž	58	ND	ND	CC	GT	1,22
19a	M	58	ND	ND	AC	GT	0,00
20	M	75	ND	ND	ND	ND	1,43
21	M	72	ND	ND	ND	ND	2,01
22a	Ž	69	ND	ND	AA	GG	1,38
23a	M	52	ND	ND	AA	GT	0,62
24	M	75	21,82	14,52	ND	ND	0,12
25	Ž	76	11,89	6,71	CC	GG	0,95
26a	M	60	ND	ND	CC	GG	1,18
30	Ž	67	ND	ND	AC	GG	ND
31	Ž	63	ND	ND	AC	GT	ND
32a	M	53	11,83	1,54	AC	GG	1,16
33	M	85	ND	ND	AA	TT	ND
34	Ž	49	0,97	7,68	AC	GT	1,16
35	Ž	75	ND	ND	AC	GT	ND
36	M	76	25,81	10,28	AA	TT	1,13
22b	Ž	69	12,45	6,20	AA	GG	0,47
38	M	75	25,73	11,33	AA	TT	0,91
39	Ž	56	10,91	4,52	CC	GG	0,73
40	Ž	63	ND	ND	AA	GT	ND
41	Ž	48	14,79	4,88	AA	TT	0,96
42	M	56	ND	ND	AC	GT	2,72
43	M	42	ND	ND	AC	GG	3,78
32b	M	53	ND	ND	AC	GG	3,57
45	M	77	ND	ND	CC	GG	0,72
46	Ž	79	ND	ND	AC	GT	1,41
47	M	75	5,51	0,16	CC	GG	4,99
48a	Ž	80	30,07	1,21	AC	GT	1,29
49	Ž	79	ND	ND	CC	GG	ND
50a	M	75	18,28	0,72	AC	GT	ND
51a	Ž	56	46,19	12,18	AC	GG	ND
52	M	60	47,62	24,44	CC	GG	ND
53	Ž	73	51,44	33,04	AC	TT	0,29
54	Ž	81	55,07	44,80	AA	TT	0,43
107	Ž	71	11,70	7,67	AA	TT	ND
5b	Ž	66	12,04	7,56	AA	TT	ND
109a	M	80	8,43	6,22	AA	GT	ND
110a	M	64	3,31	0,00	AC	GT	0,88
111	M	86	11,18	0,48	AA	GT	1,74
112	Ž	77	11,37	6,77	AA	TT	2,03
113	M	59	34,98	12,21	AA	TT	2,00
114	M	65	9,34	9,26	AA	GT	2,23
115	M	68	11,82	5,49	AA	TT	2,98
116	Ž	66	16,45	14,46	AA	TT	0,76
117	M	58	12,05	1,39	AC	GT	1,90
118a	M	63	10,09	0,47	AA	GT	ND
119	Ž	74	32,85	9,05	AA	TT	ND
120a	M	81	10,40	8,20	AA	TT	ND
121a	Ž	73	ND	ND	AC	GT	0,63
14b	M	77	ND	ND	AC	GT	1,90
123	Ž	81	14,13	ND	AC	TT	0,33
124a	Ž	74	9,47	10,35	AA	TT	0,35
125a	Ž	76	15,71	7,36	AC	GT	0,08
126	Ž	66	11,90	ND	AA	GG	ND
127	Ž	75	4,16	ND	AC	GT	ND
128	Ž	67	6,65	5,46	AC	GG	0,39
129	Ž	51	7,27	5,89	AC	GT	1,03
130	M	85	6,93	5,24	AC	GT	0,08
131	Ž	66	10,02	ND	AA	TT	ND
64b	Ž	61	ND	ND	AC	GT	0,50
133a	M	51	ND	ND	CC	GT	ND
134	M	72	12,27	13,27	AC	GG	0,99
135	M	46	21,35	16,96	CC	GG	1,11
67b	Ž	67	5,49	ND	AC	GT	ND
137	Ž	63	11,04	9,82	AA	TT	0,92
138	Ž	78	13,22	37,90	AC	GT	ND
139	M	62	10,05	ND	AC	TT	ND
140	M	61	16,62	13,88	AC	GG	ND
141	Ž	80	17,03	5,88	CC	GG	1,13
142	Ž	64	ND	ND	AC	GG	ND
26b	M	63	9,39	6,62	CC	GG	0,63
144	M	66	14,11	24,54	CC	GT	ND
145	Ž	82	18,11	11,51	CC	TT	ND
146	M	72	16,73	7,23	CC	GT	0,32
147	M	65	8,80	9,05	AA	GT	1,50
148	M	67	10,63	6,01	CC	TT	3,25
18c	Ž	61	ND	ND	CC	GT	ND
150	Ž	56	12,24	7,65	AA	TT	4,86
151	Ž	50	ND	ND	AC	TT	ND
152	M	79	7,85	6,69	AA	TT	2,29

56	Ž	76	ND	ND	AC	GT	ND	120b	M	82	ND	ND	AA	TT	0,71
57a	M	76	ND	ND	AA	TT	ND	121b	Ž	74	ND	ND	AC	GT	ND
58	M	75	3,76	1,38	AC	GT	ND	109b	M	80	ND	ND	AA	GT	4,84
59	M	72	ND	ND	AC	GT	ND	50b	M	75	ND	ND	AC	GT	1,42
60a	M	65	ND	ND	AA	GG	ND	79b	M	58	ND	ND	AC	GT	1,54
61	M	55	9,59	6,49	AA	GT	1,19	158	Ž	72	12,03	6,99	AA	TT	0,97
62	Ž	71	ND	ND	AC	GG	0,70	159	Ž	75	11,36	7,35	AC	TT	0,22
63	M	64	10,64	8,45	AC	GT	0,80	160	M	63	8,58	6,40	AC	GT	1,38
64a	Ž	61	7,41	4,63	AC	GT	0,11	51b	Ž	56	18,17	8,10	AC	GG	0,22
23b	M	55	19,67	11,87	AA	GT	1,81	124b	Ž	74	ND	ND	AA	TT	0,70
66	Ž	71	7,68	3,60	AA	TT	ND	79c	M	58	13,43	1,96	AC	GT	ND
67a	Ž	67	ND	ND	AC	GT	ND	76b	Ž	77	ND	ND	AC	GT	2,27
68	Ž	57	15,91	10,05	AC	GT	ND	133b	M	51	ND	ND	CC	GT	3,07
69	M	72	12,64	6,00	AC	GT	0,84	57b	M	76	14,03	6,89	AA	TT	ND
70	M	64	ND	ND	AC	GT	ND	167	Ž	47	6,52	ND	AC	GT	1,05
71	M	65	13,99	8,10	CC	GT	ND	168a	M	73	11,24	ND	AA	TT	3,32
72	M	79	9,58	3,13	AA	TT	ND	169	M	49	9,32	5,87	AA	TT	3,02
73a	M	63	9,61	5,77	AC	GT	1,77	170	M	67	5,38	ND	AA	TT	1,22
18b	Ž	61	34,59	12,43	CC	GT	0,78	171	Ž	78	6,81	5,28	AA	GT	0,72
19b	M	61	ND	ND	AC	GT	ND	172	Ž	77	7,23	5,20	AC	GT	0,80
76a	Ž	77	11,16	6,82	AC	GT	ND	6b	Ž	73	6,84	4,44	AC	GT	1,95
77	M	68	53,88	27,22	AA	GT	0,99	174	M	72	7,55	3,57	AC	GT	0,54
78	M	61	8,22	5,95	AA	TT	ND	175	Ž	61	19,31	4,92	AC	GT	0,97
79a	M	58	ND	ND	AC	GT	ND	176	Ž	72	11,23	5,86	AC	GT	3,53
80	M	81	9,47	7,56	CC	GG	0,95	60b	M	65	7,92	ND	AA	GG	8,38
81	Ž	80	12,43	8,12	AA	GT	ND	110b	M	64	ND	ND	AC	GT	1,17
82	M	64	8,58	5,92	AC	TT	1,17	125b	Ž	76	ND	ND	AC	GT	0,19
83	Ž	84	5,83	5,47	AA	TT	1,12	73b	M	63	ND	ND	AC	GT	1,61
84	M	61	10,90	1,76	AA	GT	0,80	181	M	52	26,34	5,60	CC	GG	1,68
85	Ž	70	6,29	5,08	AC	GT	ND	182	M	52	10,91	4,62	AC	GT	2,66
4b	Ž	63	ND	ND	AC	GT	ND	183	Ž	67	9,67	6,64	AC	GG	ND
87	M	73	29,57	11,86	AC	GT	0,59	184	M	79	6,00	4,96	CC	GG	1,60
88	M	63	7,81	2,93	AA	TT	ND	48b	Ž	80	ND	ND	AC	GT	3,64
89	M	68	ND	ND	AA	TT	ND	186	M	87	11,51	1,85	AC	GT	0,74
90	Ž	87	ND	ND	AA	TT	0,74	187	M	62	9,65	ND	AC	GT	ND
91	M	73	ND	ND	AC	GT	0,66	124c	Ž	74	ND	ND	AA	TT	1,30
92	Ž	69	ND	ND	AC	GT	ND	189	M	83	11,53	7,04	AA	TT	0,76
55b	M	70	32,67	10,38	AC	TT	ND	190	M	71	14,28	6,75	AC	GT	0,43
94	M	75	7,80	6,03	AA	TT	0,50	191	M	86	ND	ND	AC	GG	1,04
95	M	91	7,40	5,72	AA	TT	0,66	192	Ž	82	11,67	5,65	CC	GT	0,57
96	M	57	8,02	5,75	AC	GT	0,36	193	M	72	8,69	0,02	AC	GG	1,57
97	M	64	7,94	6,24	AC	GT	0,54	194	M	84	8,35	6,58	AA	GT	2,84
98	M	55	10,23	5,68	AC	GT	ND	118b	M	63	ND	ND	AA	GT	2,24
99	M	76	26,53	11,40	AC	GG	2,02	196	M	75	9,08	5,15	AA	TT	ND
100	Ž	65	8,69	5,06	AA	TT	2,43	197	M	67	ND	ND	AA	GT	6,46
101	M	67	7,83	2,21	AC	GT	2,99	198	Ž	64	ND	ND	AA	TT	8,94
102	M	68	ND	ND	AA	GT	ND	18d	Ž	61	ND	ND	CC	GT	7,13
103	M	66	6,48	6,00	AA	TT	ND	14c	M	77	ND	ND	AC	GT	2,14
104	M	74	14,33	7,27	AA	TT	ND	133c	M	51	ND	ND	CC	GT	ND
105	Ž	79	45,25	15,19	AC	GT	ND	168b	M	74	ND	ND	AA	TT	5,26
106	M	77	ND	ND	AC	GT	ND	203	M	72	ND	ND	AC	GT	5,46