

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA TEMELJOTOV

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



ANA TEMELJOTOV

**VLOGA IMUNOPROTEASOMA V CELICAH
KRONIČNE LIMFOCITNE LEVKEMIJE**

**THE ROLE OF THE IMMUNOPROTEASOME IN
CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA CELLS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

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. Tijane Markovič, mag. farm..

ZAHVALA

Rada bi se zahvalila vsem, ki ste me podpirali skozi študijska leta ali na kakršenkoli način pripomogli k nastanku te magistrske naloge.

Za mentorstvo se iskreno zahvaljujem prof. dr. Ireni Mlinarič-Raščan. Hvala za usmerjanje, vzpodbudo in strokovne nasvete. Hvala somentorici, asist. Tijani Markovič, za ves vložen trud in čas, vodenje ter prijazne nasvete. Poleg tega bi se rada zahvalila doc. dr. Martini Gobec za ideje, prijaznost in usmerjanje pri raziskovanju. Asist. dr. Alenki Šmid se zahvaljujem za pomoč pri analizi in vrednotenju rezultatov izražanja genov. Rada bi se zahvalila sošolcema Damjanu in Veroniki, s katerima je bilo delo v laboratoriju bolj zabavno in enostavno. Hvala tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo, ki so v laboratoriju vedno z veseljem priskočili na pomoč.

Ne nazadnje bi se rada zahvalila svoji družini – Darji, Aleksandru in Alešu –, fantu Filipu ter prijateljem, ki so me skozi študijska leta podpirali in mi stali ob strani v vseh lepih in malo manj lepih trenutkih.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič-Raščan, mag. farm. in somentorstvom asist. Tijane Markovič, mag. farm.. Naloga je del projektov CEA BINAL (BI-FR/CEA/16-18-006) in CEA NOBIL (BI-FR/CEA/18-20-004), pod vodstvom prof. dr. Irene Mlinarič-Raščan.

Ana Temeljotov

Komisija za zagovor:

Predsednik komisije: prof. dr. Stanislav Gobec

Mentorica: prof. dr. Irena Mlinarič-Raščan

Somentorica: asist. Tijana Markovič

Član komisije: doc. dr. Bojan Doljak

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	I
KAZALO SLIK	III
KAZALO PREGLEDNIC	IV
POVZETEK.....	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1 UVOD	1
1.1 KRONIČNA LIMFOCITNA LEVKEMIJA.....	1
1.1.1 DIAGNOZA IN PROGNOZA KLL	2
1.1.2 TERAPIJA KLL	4
1.2 PROTEASOM IN INHIBITORJI PROTEASOMA.....	6
1.2.1 PROTEASOM.....	6
1.2.2 IMUNOPROTEASOM	7
1.2.3 INHIBITORJA PROTEASOMA BORTEZOMIB IN KARFILZOMIB	9
1.2.4 INHIBITORJA IMUNOPROTEASOMA ONX-0914 IN DPLG-3	10
2 NAMEN DELA	12
3 MATERIALI IN METODE	13
3.1 MATERIALI.....	13
3.1.1 METODE DE LA S CELICAMI, IZOLACIJA LIMFOCITOV B, DOLOČANJE EC ₅₀ IN PRETOČNA CITOMETRIJA	13
3.1.2 ANALIZA IZRAŽANJA GENOV	14
3.1.3 PUFRI	15
3.1.4 GOJIŠČA IN SESTAVA.....	15
3.2 METODE DE LA S CELICAMI.....	16
3.2.1 CELIČNI LABORATORIJ IN KOMORA Z LAMINARNIM PRETOKOM ZRAKA.....	16
3.2.2 ZBIRANJE VZORCEV	16
3.2.3 CELIČNE KULTURE	16
3.2.4 ŠTETJE CELIC	17
3.2.5 ZAMRZOVANJE CELIČNIH KULTUR	18
3.2.6 ODMRZOVANJE CELIČNIH KULTUR.....	18
3.3 IZOLACIJA LIMFOCITOV B IZ POLNE KRVI.....	18
3.4 DOLOČANJE VREDNOSTI EC₅₀.....	20
3.4.1 IZPOSTAVITEV CELIC SPOJINAM	20
3.4.2 TEST METABOLNE AKTIVNOSTI	21
3.5 PRETOČNA CITOMETRIJA.....	22
3.5.1 DOLOČITEV DELEŽA APOPTIČNIH IN MRTVIH CELIC.....	23

3.6 ANALIZA IZRAŽANJA GENOV	25
3.6.1 IZOLACIJA RNA.....	25
3.6.2 MERJENJE KONCENTRACIJE IN ČISTOSTI IZOLATA RNA.....	26
3.6.3 OBRATNO PREPISOVANJE	26
3.6.4 KVANTITATIVNI PCR V REALNEM ČASU (qPCR).....	27
3.6.5 STANDARDIZACIJA NA REFERENČNI GEN.....	29
3.7 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	29
4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	31
4.1 IN VITRO VREDNOTENJE INHIBITORJA IMUNOPROTEASOMA ONX-0914	31
4.1.1 INHIBITOR IMUNOPROTEASOMA ONX-0914 IZRAŽA KONCENTRACIJSKO IN ČASOVNO ODVISNO DELOVANJE NA CELIČNI LINIJI MEC1 IN MEC2.....	32
4.1.2 INHIBITORJA PROTEASOMA BORTEZOMIB IN KARFILZOMIB DELUJETA CITOTOKSIČNO NA CELIČNI LINIJI MEC1 IN MEC2 V NIŽJIH KONCENTRACIJAH KOT ONX-0914	33
4.1.3 IBRUTINIB DELUJE CITOTOKSIČNO V MIKROMOLARNIH KONCENTRACIJAH, IDELALIZIB PA IMA NIZKO CITOTOKSIČNO DELOVANJE NA CELIČNO LINIJO MEC1	34
4.1.4 INHIBITOR IMUNOPROTEASOMA ONX-0914 DELUJE CITOTOKSIČNO V NANOMOLARNIH KONCENTRACIJAH NA PRIMARNE CELICE KLL.....	36
4.1.5 INHIBITORJA PROTEASOMA BORTEZOMIB IN KARFILZOMIB DELUJETA INHIBITORNO NA PRIMARNE CELICE KLL V NIŽJIH KONCENTRACIJAH KOT ONX-0914	38
4.1.6 VISOKO SELEKTIVEN INHIBITOR IMUNOPROTEASOMSKE PODENOTE B5i, DPLG-3, JE MANJ CITOTOKSIČEN V PRIMERJAVI Z ONX-0914.....	41
4.1.7 MEHANIZEM CELIČNE SMRTI CELIC KLL, POVZROČENE Z ONX-0914, JE APOPTOZA... 42	
4.1.8 ONX-0914 DELUJE SELEKTIVNO NA PRIMARNE CELICE KLL.....	43
4.2 ANALIZA IZRAŽANJA PODENOT B5C IN B5i (IMUNO)PROTEASOMA	48
4.2.1 MED VSOTO IZRAŽANJA PROTEASOMSKIH PODENOT B5C IN B5i TER CITOTOKSIČNIM DELOVANJEM ONX-0914 OBSTAJA KORELACIJA	49
4.3 PRIHODNOST UPORABE (IMUNO)PROTEASOMSKIH INHIBITORJEV V TERAPIJI KLL	52
5 SKLEP	54
6 LITERATURA.....	56
7 PRILOGE.....	I

KAZALO SLIK

Slika 1: Razmaz krvi bolnika s KLL.	2
Slika 2: Sestava proteasoma.	7
Slika 3: Nastanek in sestava imunoproteasoma.	8
Slika 4: Možne kombinacije imunoproteasomskega jedra z regulatornimi enotami.	9
Slika 5: Strukturni formuli bortezomiba (levo) in karfilzomiba (desno).	10
Slika 6: Strukturni formuli ONX-0914 (levo) in DPLG-3 (desno).	11
Slika 7: Hemocitometer.	17
Slika 8: Postopek izolacije limfocitov B.	19
Slika 9: Redukcijska pretvorba reagenta MTS v obarvan produkt formazan.	21
Slika 10: Redukcijska pretvorba resazurina v fluorescenten produkt resorufin.	22
Slika 11: Shematski prikaz pretočnega citometra.	23
Slika 12: Citotoksično delovanje inhibitorja imunoproteasoma ONX-0914 na celični liniji MEC1 in MEC2.	33
Slika 13: Citotoksično delovanje ibrutiniba in idelaliziba na celično linijo MEC1.	35
Slika 14: Koncentracijsko odvisno delovanje ONX-0914 na primarne celice KLL.	36
Slika 15: Vrednosti EC_{50} celic bolnikov po 24 in 48 urah inkubacije z ONX-0914.	37
Slika 16: Časovno in koncentracijsko odvisno delovanje bortezomiba in karfilzomiba na primarne celice KLL.	39
Slika 17: Primerjava citotoksičnih učinkov DPLG-3 in ONX-0914 na celično linijo MEC1.	41
Slika 18: Ovrednotenje mehanizma celične smrti na celicah KLL po 24-urni inkubaciji z ONX-0914.	43
Slika 19: Selektivnost delovanja ONX-0914 na primarne celice KLL.	44
Slika 20: Primerjava citotoksičnih učinkov bortezomiba in karfilzomiba na celice KLL in LCL.	46
Slika 21: Relativno izražanje genov za podenoti $\beta 5c$ in $\beta 5i$ v primarnih celicah KLL in v stabilno transformiranih celicah MEC in LCL.	48
Slika 22: Korelacija med obratno vrednostjo vsote izražanja genov za podenoti $\beta 5c$ in $\beta 5i$ in citotoksičnim delovanjem ONX-0914.	50

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Sistema razvrščanja stadijev bolezni pri bolnikih s KLL.....	3
Preglednica II: Pregled terapevtskih skupin zdravil in učinkovin, ki so v uporabi za terapijo KLL.	5
Preglednica III: Seznam materialov in aparatur, potrebnih za delo s celicami.	13
Preglednica IV: Seznam kemikalij, potrebnih za delo s celicami.	14
Preglednica V: Seznam materialov in aparatur, potrebnih za analizo izražanja genov.....	14
Preglednica VI: Seznam kemikalij in kompletov reagentov, potrebnih za analizo izražanja genov.	15
Preglednica VII: Sestava pufra 10 x PBS in priprava pufra 1x PBS.	15
Preglednica VIII: Sestava medijev za gojenje celičnih linij in primarnih celic KLL.....	15
Preglednica IX: Koncentracije spojin, s katerimi smo tretirali posamezne celične linije. ..	20
Preglednica X: Sestava mešanice reagentov za obraten prepis 1 vzorca.	27
Preglednica XI: Pogoji reakcije prepisa RNA v cDNA.	27
Preglednica XII: Sestava reakcijske zmesi za PCR analizo za 1 reakcijo.	28
Preglednica XIII: Program izvedbe kvantitativne PCR analize s SYBR® Select MM (izražanje genov RPLP0, GUSB, LMP7).	29
Preglednica XIV: Program izvedbe kvantitativne PCR analize z EvaGreen® MM (izražanje gena PSMB5).	29
Preglednica XV: Vrednosti EC ₅₀ 24 in 48 ur po inkubaciji celic MEC1 in MEC2 z bortezomibom in karfilzomibom.	34
Preglednica XVI: Vrednosti EC ₅₀ 24 in 48 ur po inkubaciji celic KLL z ONX-0914, bortezomibom in karfilzomibom.	38

POVZETEK

Kljub velikim napredkom na področju terapije kronične limfocitne levkemije (KLL), ki smo jim bili priča v zadnjem desetletju, KLL še vedno ostaja neozdravljiva bolezen. Zato iščemo nove učinkovine in pristope, s katerimi bi lahko dosegli bolj učinkovito terapijo. Proteasom je encimski kompleks, ki ga najdemo v vseh celicah, imunoproteasom pa je izooblika proteasoma, ki se nahaja predvsem v celicah imunskega sistema. Inhibitorji imunoproteasoma tako predstavljajo možnost za tarčno terapijo bolezni, kjer gre za prekomerno kopičenje imunskih celic.

V našem delu smo raziskovali vlogo imunoproteasoma v celicah KLL in ga ovrednotili kot tarčo za zdravljenje KLL. V prvem delu smo ovrednotili *in vitro* citotoksičnost inhibitorja imunoproteasoma ONX-0914. Najprej smo s testom metabolne aktivnosti MTS določili srednjo učinkovito koncentracijo (EC_{50}) ONX-0914 na stabilno transformiranih celicah KLL, MEC1 ($EC_{50, 24 h} = 301 \text{ nM}$) in MEC2 ($EC_{50, 24 h} = 658 \text{ nM}$). Za primerjavo smo na istih celicah določili EC_{50} inhibitorjev proteasoma bortezomiba in karfilzomiba. Te so bile nižje v primerjavi z EC_{50} ONX-0914, kar bi lahko nakazovalo na dejstvo, da je za citotoksično delovanje inhibitorjev imunoproteasoma potrebno sočasno zaviranje več katalitskih podenot. Z ovrednotenjem citotoksičnosti DPLG-3, ki je visoko selektiven inhibitor imunoproteasomske podenote $\beta 5i$, smo to potrdili. K razlikam v EC_{50} bi lahko pripomogla tudi potencialno nižja akumulacija inhibitorjev imunoproteasoma v tarčnih celicah.

V naslednjem koraku smo določili citotoksičnost ONX-0914, bortezomiba in karfilzomiba na primarnih celicah KLL (test PrestoBlue) in celičnih linijah LCL (test MTS), ki izvirajo iz limfocitov zdravih darovalcev. Celice KLL smo izolirali iz vzorcev polne krvi 8 bolnikov z diagnozo KLL, ki so privolili v sodelovanje v raziskavi št. 93/12/10. ONX-0914 je izkazal koncentracijsko in časovno odvisno citotoksično delovanje na celice KLL že v nanomolarnih koncentracijah ($EC_{50, 24 h} = 22 \text{ nM}$, $EC_{50, 48 h} = 9 \text{ nM}$). Bortezomib ($EC_{50, 24 h} = 7 \text{ nM}$, $EC_{50, 48 h} = 3 \text{ nM}$) in karfilzomib ($EC_{50, 24 h} = 4 \text{ nM}$, $EC_{50, 48 h} = 1 \text{ nM}$) sta na celice KLL delovala citotoksično v nižjih koncentracijah kot ONX-0914. Nadalje smo s pretočno citometrijo pokazali, da je mehanizem celične smrti, povzročene z ONX-0914, apoptoza. S primerjavo citotoksičnih učinkov na celicah LCL in KLL smo ugotovili, da je bilo delovanje ONX-0914 selektivno za maligne limfocite B ($p = 0,0121$).

Nazadnje smo v preiskovanih celicah na nivoju mRNA določili izražanje proteasomske podenote $\beta 5c$ in imunoproteasomske podenote $\beta 5i$. V celicah KLL je bilo izražanje podenote $\beta 5i$ 2-krat višje kot izražanje podenote $\beta 5c$. Obstajala je korelacija med obratno vrednostjo vsote izražanja podenot $\beta 5c$ in $\beta 5i$ ter citotoksičnim delovanjem ONX-0914, kar podpira ugotovitev, da je za citotoksično delovanje potrebna sočasna inhibicija podenot $\beta 5c$ in $\beta 5i$.

Naša raziskava je bila prva, ki je ovrednotila *in vitro* delovanje inhibitorja imunoproteasoma na celicah KLL. Inhibitor imunoproteasoma ONX-0914 se je *in vitro* izkazal kot obetavna spojina za doseganje protirakavih učinkov na primarnih celicah KLL. Naši rezultati spodbujajo k nadaljnemu raziskovanju imunoproteasoma kot tarče v terapiji KLL.

Ključne besede: kronična limfocitna levkemija (KLL), inhibitorji imunoproteasoma, inhibitorji proteasoma, ONX-0914 (PR-957)

ABSTRACT

Over the last decade there have been major advances in chronic lymphocytic leukemia (CLL) treatment. Despite that, CLL still remains an incurable disease. For that reason a great effort is put in exploring new approaches for treating CLL patients. Proteasome is an enzyme complex that is found in all human cells, while its isoform - immunoproteasome is present mainly in the cells of the immune system. We reasoned that immunoproteasome inhibitors could therefore represent a possibility for targeted therapy of diseases where excessive accumulation of immune-cells occurs.

In this work we evaluated the role of immunoproteasome in CLL cells. We evaluated immunoproteasome as a potential target for treating CLL. In the first part *in vitro* cytotoxicity of immunoproteasome inhibitor ONX-0914 was evaluated. First metabolic assay MTS was used to determine half maximal effective concentration (EC_{50}) of ONX-0914 on CLL cell lines - MEC1 cells ($EC_{50, 24 h} = 301$ nM) and MEC2 cells ($EC_{50, 24 h} = 658$ nM). For comparison, the EC_{50} of proteasome inhibitors bortezomib and carfilzomib were determined. EC_{50} for proteasome inhibitors on MEC1 and MEC2 cells were lower in comparison to the EC_{50} of ONX-0914. That could indicate that inhibition of more catalytic subunits is needed to achieve cytotoxic effects of (immuno)proteasome inhibitors. Evaluation of cytotoxicity of highly selective immunoproteasome subunit $\beta 5i$ inhibitor DPLG-3, supported this possibility. Potentially lower cellular accumulation of immunoproteasome inhibitors could also contribute to EC_{50} variations.

In the next step, cytotoxicity of ONX-0914, bortezomib and carfilzomib on primary CLL cells (PrestoBlue assay) and LCL cell lines (MTS assay), was determined. LCL cell lines originate from healthy donor lymphocytes. Primary CLL cells were isolated from whole blood samples of 8 CLL patients, who had agreed to take part in the clinical study (no. 93/12/10). ONX-0914 exhibited concentration- and time-dependent cytotoxic effects on CLL primary cells in nanomolar concentrations ($EC_{50, 24 h} = 22$ nM, $EC_{50, 48 h} = 9$ nM). Cytotoxic effects of bortezomib ($EC_{50, 24 h} = 7$ nM, $EC_{50, 48 h} = 3$ nM) and carfilzomib ($EC_{50, 24 h} = 4$ nM, $EC_{50, 48 h} = 1$ nM) were achieved at lower concentrations compared to ONX-0914. Using flow cytometry we showed that the cell death mechanism caused by ONX-0914 was apoptosis. Comparing cytotoxic effects of ONX-0914 on CLL and LCL cells showed the effects of ONX-0914 were selective for malignant B-cells ($p = 0,0121$).

In the last part the mRNA expression of constitutive subunit $\beta 5c$ and immunoproteasome subunit $\beta 5i$ was determined. We found that in the CLL cells the expression of subunit $\beta 5i$ was 2-times higher compared to the expression of subunit $\beta 5c$. There was a statistically significant correlation between reciprocal values of the sum of the expression of the subunits $\beta 5c$ and $\beta 5i$. This correlation supports the possibility, that for the cytotoxic effects, the simultaneous inhibition of both catalytic subunits is needed.

Our study was the first one to evaluate the effects of immunoproteasome inhibitor on CLL cells *in vitro*. Immunoproteasome inhibitor ONX-0914 was found to be a promising substance for achieving antitumor effect in primary CLL cells. Our results encourage further investigation of immunoproteasome as a therapeutic target in CLL.

Key words: chronic lymphocytic leukemia (CLL), immunoproteasome inhibitor, proteasome inhibitor, ONX-0914 (PR-957)

SEZNAM OKRAJŠAV

ALL	akutna limfoblastna levkemija
AML	akutna mieloblastna levkemija
BCL-2	B-celični limfom-2
CD	celični označevalec (<i>angl. cluster of differentiation</i>)
cDNA	komplementarna DNA
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EC₅₀	srednja efektivna koncentracija
FBS	fetalni goveji serum (<i>angl. fetal bovine serum</i>)
FCR	fludarabin, ciklofosfamid, rituksimab
IFN-γ	interferon gama
IGHV	variabilno področje težke verige imunoglobulinov
KE	katlitska enota
KLL	kronična limfocitna levkemija
KP	kimotripsinu podobno
LCL	limfoblastoidne celične linije (<i>angl. lymphoblastoid cell lines</i>)
MM	osnovna zmes (<i>angl. master mix</i>)
MHC	poglavitni histokompatibilni kompleks (<i>angl. major histocompatibility complex</i>)
NF-κB	jedrni dejavnik κ B
PBMC	periferna mononuklearna celica (<i>angl. peripheral blood mononuclear cell</i>)
PBS	fosfatni pufer
PCR	verižna reakcija s polimerazo (<i>angl. polymerase chain reaction</i>)
PE	fikoeritrin (<i>angl. phycoerythrin</i>)
PI3K	fosfatidilinozitol-3-kinaza
qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času
RE	regulatorna enota
RNA	ribonukleinska kislina
RNAza	encim, ki katalizira hidrolizo RNA
TNF-α	tumor nekrotizirajoči dejavnik α
UV	ultravijolična svetloba

1 UVOD

1.1 KRONIČNA LIMFOCITNA LEVKEMIJA

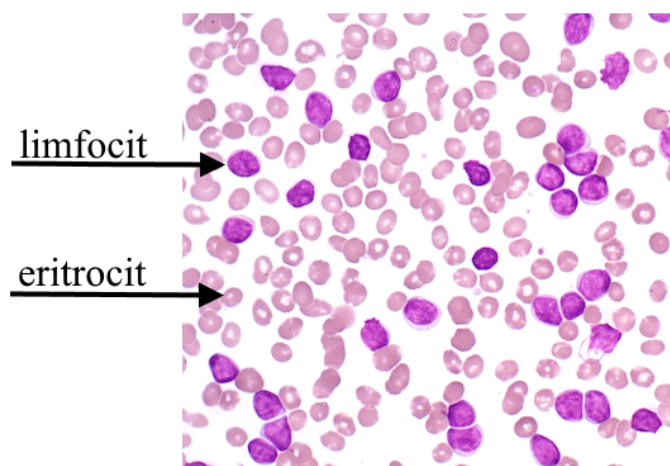
Rakasta ali maligna obolenja so vzrok za skoraj vsako 6. smrt na svetu in tako predstavljajo 2. najpogostejši vzrok smrti na svetu. Ta obolenja predstavljajo veliko skupino bolezni, katerim sta skupna pretirana rast in kopičenje nenormalnih celic, ki lahko vdirajo v sosednja ali migrirajo v oddaljena tkiva. Maligna obolenja lahko prizadenejo skoraj katerikoli del telesa (1).

Najpogostejše hematološko maligno obolenje pri odraslih v zahodnem svetu je kronična limfocitna levkemija (KLL), ki predstavlja 11 % vseh rakavih krvnih bolezni pri odraslih (2). KLL je bolezen, pri kateri pride do nenadzorovanega pomnoževanja in kopičenja zrelih, a nefunkcionalnih limfocitov B (3). Inicijacija kopičenja limfocitov B je bolj kot posledica nenadzorovanega pomnoževanja posledica podaljšanja preživetja limfocitov B, in sicer zaradi nedelovanja signalnih poti, ki vodijo v apoptozo (4, 5). Največkrat prizadene starejšo populacijo, 85–90 % bolnikov je ob postavitvi diagnoze starejših od 50 let. Maligni limfociti B nastajajo v kostnem mozgu, nato pa preidejo v kri. Ob napredovanju bolezni se levkemične celice lahko razširijo po telesu in se začnejo kopičiti tudi v bezgavkah, vranici in jetrih (6). Značilni simptomi za KLL so nepojasnjena izguba teže, povišana telesna temperatura z neznanim vzrokom, nočno potenje in utrujenost (7).

Mehanizmi nastanka in poteki KLL so pri posameznih bolnikih zelo različni. Bolezen je lahko že od začetka agresivna in hitro napredujoča. Večkrat pa je potek KLL indolenten, bolezen se razvija postopoma in je lahko več let prisotna brez simptomov (8, 9). Z napredovanjem bolezni so simptomi pogostejši, kopičenje levkemičnih celic pa lahko vodi v odpoved kostnega mozga in nepravilno delovanje imunskega sistema. Po postavitvi diagnoze je pričakovana življenjska doba od nekaj mesecev do več deset let. KLL je za zdaj neozdravljiva bolezen, vendar pa lahko v številnih primerih s terapijo njen potek upočasnimo (9).

1.1.1 Diagnoza in prognoza KLL

Kriterij za diagnozo KLL je prisotnost ≥ 5000 monoklonskih limfocitov B v 1 μL periferne krvi, in sicer vsaj tri zaporedne mesece (9). Kot je prikazano na Sliki 1, so v krvnem razmazu bolnika s KLL opazni številni limfociti, ki so morfološko podobni zrelim limfocitom. Limfociti KLL so majhni, imajo gosto jedro, ki je obkroženo s tanko plastjo citoplazme, v jedru pa je slabo vidno jedrce (10).



Slika 1: Razmaz krvi bolnika s KLL.

V krvi bolnika s KLL so prisotni številni monoklonski limfociti B, ki so morfološko podobni zrelim limfocitom. Slika, povzeta po (11).

Da je povečanje limfocitov B posledica KLL, potrdimo z imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom, s katerim preverimo izražanje celičnih označevalcev in klonalnost limfocitov B (12). Klonalnost limfocitov pomeni, da vsi izvirajo iz iste celice in so nastali z nenadzorovanim pomnoževanjem točno določene populacije limfocitov B (4, 13). Za diferencialno diagnostiko določamo še izražanje značilnih celičnih označevalcev (CD, angl. *cluster of differentiation*). Celice KLL izražajo B-celične označevalce CD19, CD20 in CD23. Hkrati pa izražajo tudi T-celični označevalec CD5, ki je pomemben marker za potrditev KLL. Izražanje površinskih imunoglobulinov CD20 in CD79b na celicah KLL je značilno nižje v primerjavi z izražanjem na normalnih limfocitih B (4).

Za opredelitev razširjenosti bolezni sta v uporabi dva sistema klasifikacije stadijev KLL, razvrstitev po Binetu in stopnjevanje po Raiju. Oba sistema razvrščata bolezen v različne stadije glede na klinično sliko, ki temelji na izsledkih krvne slike in kliničnega pregleda. Uporabljata se za napovedovanje poteka bolezni in odločanje o začetku zdravljenja (9,10). Sistema razvrščanja KLL po Binetu in po Raiju sta predstavljena v Preglednici I.

Preglednica I: Sistema razvrščanja stadijev bolezni pri bolnikih s KLL.

Stadij <i>Razvrstitev po Binetu</i>	Definicija	Mediana preživetja*
Binet A	normalno število eritrocitov in trombocitov, < 3 območja s povečanimi bezgavkami	13 let
Binet B	normalno število eritrocitov in trombocitov, ≥ 3 območja s povečanimi bezgavkami	8 let
Binet C	zmanjšano število eritrocitov in/ali trombocitov	2 leti
Stopnjevanje po Raiju		
<u>Nizko tveganje</u>		13 let
Rai 0	povečano število limfocitov ($>15 \times 10^9/l$)	
<u>Srednje tveganje</u>		8 let
Rai I	povečano število limfocitov in povečanje bezgavk	
Rai II	povečano število limfocitov in povečana jetra in/ali povečana vranica brez ali s povečanjem bezgavk	
<u>Visoko tveganje</u>		2 leti
Rai III	povečano št. limfocitov in zmanjšano št. eritrocitov brez ali s povečanjem bezgavk	
Rai IV	povečano št. limfocitov in zmanjšano št. trombocitov brez ali s povečanjem bezgavk ali organov	

Mediana preživetja se je skozi zadnjih 30 let spreminjala. V tabeli so navedene prilagojene vrednosti, ki se nekoliko razlikujejo od prvotnih, ko sta bila sistema zasnovana. Tabela je povzeta po (10, 14).

Z razvojem molekularne genetike in novih učinkovin, ki imajo bolj specifično delovanje, so se poleg razvrščanja KLL v stadije uveljavili novi prognostični dejavniki za napoved kliničnega poteka bolezni in izbiro primerne terapije. Prognostične dejavnike lahko razdelimo v tri kategorije, in sicer na genetske spremembe, serumske označevalce (biokemijski in celični površinski označevalci) in karakteristike bolnika (spol, starost in fizično stanje bolnika) (15). V Sloveniji se rutinsko izvajajo citogenetske preiskave (9).

Eden najpomembnejših genetskih prognostičnih dejavnikov je delecija 17p, s katero pride do delecije tumor supresorskega gena TP53. Za bolnike z del(17p) sta značilna agresiven potek bolezni in rezistenca na kemoimunoterapijo. Za potek in zdravljenje KLL so pomembne tudi mutacije genskih segmentov variabilnega področja težke verige imunoglobulinov (IGHV, angl. *immunoglobulin heavy-chain variable region*). Potek bolezni pri bolniki z mutacijo genov IGHV je manj agresiven in povezan z večjim preživetjem kot pri bolnikih brez mutacije genov IGHV. Ostali pomembni prognostični dejavniki so izražanje ZAP-70, CD38 in CD49d ter serumske koncentracije timidin kinaze

in β_2 -mikroglobulina. Z manjšim preživetjem bolnikov s KLL so povezane še mutacije ali delecije v genih NOTCH1 in SF3B1 (16).

1.1.2 Terapija KLL

KLL je zelo heterogena bolezen in posledično so raznoliki tudi pristopi za zdravljenje posameznih bolnikov (10). Mnogokrat je bolezen odkrita v začetni fazi, ko je povečano število monoklonskih limfocitov B, simptomi pa še niso prisotni (9). V predhodnih kliničnih študijah so ugotovili, da ob odsotnosti simptomov zdravljenje KLL bolnikom ne prinaša koristi. Zato se z zdravljenjem prične pri napredovanih oblikah bolezni (Rai III, IV ali Binet C) oziroma ob pojavu bolezenskih simptomov, pred tem pa se le redno spremlja zdravstveno stanje bolnika (8).

Dolga leta je bil zlati standard zdravljenja KLL **alkilirajoči citostatik** klorambucil. Tega danes zaradi slabe učinkovitosti predpisujejo mnogo manj. Še vedno pa se zaradi redkih neželenih učinkov uporablja pri terapiji starejših bolnikov, ki imajo pridružena druga bolezenska stanja. Poleg klorambucila so za zdravljenje KLL dalj časa v uporabi tudi **nukleozidni analogi**. Najpogosteje predpisan nukleozidni analog za zdravljenje KLL je fludarabin. Lahko se uporablja v obliki monoterapije, a se večkrat kombinira z drugimi zdravili. KLL danes največkrat zdravimo s kombinacijo zdravil, ki imajo različne mehanizme delovanja. S tem lahko povečamo učinkovitost zdravljenja in zmanjšamo pojavnost neželenih učinkov. Pogosta je kombinacija fludarabina z alkilirajočim citostatikom ciklofosfamidom, ki znatno poveča učinkovitost terapije (9, 16).

Med novejšie učinkovine za zdravljenje KLL spadajo **monoklonska protitelesa**. Izmed teh se najpogosteje uporabljata rituksimab in ofatumumab, ki oba delujeta proti antigenu CD20. Kot učinkovit se je izkazal tudi novejši obinutuzumab, ki je prav tako monoklonsko protitelo proti CD20 in se je pred kratkim začel uporabljati v terapiji KLL. Trenutno je najpogosteje predpisana terapija za zdravljenje KLL **kemoimunoterapija**, ki je terapija s kombinacijo citostatikov in monoklonskih protiteles. Terapija izbora za začetno zdravljenje KLL je **kombinacija fludarabina, ciklofosfamida in rituksimaba (FCR)**. Omenjena kombinacija je prav tako učinkovita kot zdravljenje drugega reda, se pravi za bolnike, ki so pred tem že prejeli drugačno terapijo. Shema zdravljenja FCR je primerna za bolnike iz vseh prognostičnih skupin, razen za bolnike, ki imajo mutacijo p53.

Alternativna začetna terapija za bolnike starejše od 65 let je kombinacija alkilirajočega citostatika bendamustina in rituksimaba. Izkazalo se je, da ima terapija s kombinacijo bendamustina in rituksimaba manj neželenih učinkov, a je hkrati manj učinkovita v primerjavi s terapijo FCR.

Z uvedbo **kinaznih inhibitorjev**, ibrutiniba in idelaliziba, v terapijo KLL se je zdravljenje bolnikov z mutacijo gena TP53 močno izboljšalo. Ibrutinib zavira delovanje Brutonove tirozinske kinaze, idelalizib pa je inhibitor fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K). Ibrutinib je terapija izbora za začetno zdravljenje vseh bolnikov z mutacijo p53, če ni prisotnih kontraindikacij. Idelalizib v kombinaciji z rituksimabom ali ofatumumabom pa je priporočljiv za bolnike z mutacijo p53, za katere druge oblike začetnega zdravljenja niso sprejemljive (16).

Od leta 2017 je za terapijo KLL registrirana tudi učinkovina venetoklaks, ki je **zaviralec proteina Bcl-2** (17). Venetoklaks je registriran za zdravljenje bolnikov z delecijo 17p ali mutacijo TP53, ki imajo kontraindikacije za zdravljenje s kinaznimi inhibitorji ali pri katerih zdravljenje s kinaznimi inhibitorji po kemoimunoterapiji ni bilo uspešno (16,18). V Preglednici II je predstavljen sistematičen pregled terapevtskih skupin zdravil in učinkovin, ki so v uporabi za zdravljenje KLL (9).

Preglednica II: Pregled terapevtskih skupin zdravil in učinkovin, ki so v uporabi za terapijo KLL.

Terapevtska skupina zdravil	Učinkovine
alkilirajoči citostatiki	klorambucil, ciklofosfamid in bendamustin
nukleozidni analogi	fludarabin in kladribin
monoklonska protitelesa	rituksimab, ofatumumab, obinutuzumab,
kinazni zaviralci	idelalizib, ibrutinib
zaviralci receptorja Bcl-2	venetoklaks

Razvoj terapije KLL je zelo dinamično področje, na katerem je prišlo v zadnjih 10 letih do velikega napredka. Kljub vsem možnim načinom zdravljenja pa KLL še vedno ostaja neozdravljiva bolezen. Zato iščemo nove tarče, mehanizme in kombinacije učinkovin s katerimi bi lahko dosegli bolj učinkovito in varno terapijo.

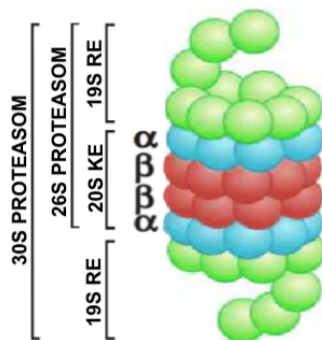
1.2 PROTEASOM IN INHIBITORJI PROTEASOMA

1.2.1 Proteasom

Proteasomi so veliki znotrajcelični encimski kompleksi, ki imajo proteolitsko delovanje in so konstitutivno prisotni v vseh celicah ter tkivih. Lahko se nahajajo v citoplazmi in v celičnem jedru, kjer razgrajujejo znotrajcelične proteine (5, 19). Predstavljajo poglavitni del ubikvitin proteasomskega sistema, ki je najpomembnejši nelizosomski proteolitični sistem za razgradnjo nenormalnih in poškodovanih proteinov v celici. Proteasomi so hkrati vključeni tudi v razgradnjo mnogih proteinov, ki regulirajo celični cikel, apoptozo in transkripcijske dejavnike. Napake v delovanju ubikvitin proteasomskega sistema lahko vodijo v spremenjeno rast celic in tako lahko pripomorejo k nastanku rakavih celic. Zato je postala inhibicija proteasoma pomembna tarča za razvoj novih protirakavih terapij. Rakave celice so mnogokrat bolj dovzetne za sprožitev apoptoze ob inhibiciji proteasoma kot zdrave celice, kljub temu pa je delovanje proteasomskih inhibitorjev neselektivno. Posledica neselektivnega delovanja so številni neželeni učinki, ki omejujejo uporabnost inhibitorjev proteasoma (20, 21).

Proteasom je sestavljen iz katalitske enote, ki predstavlja jedrni del in ene ali dveh 19S regulatornih enot, ki se vežeta vsaka na eno stran katalitske enote (Slika 2). Regulatorni enoti omogočata prepoznavanje in razvitje proteinov, ki sta potrebna za vstop proteinov v katalitski del. Proteasomski kompleks iz jedrnega dela in ene regulatorne enote imenujemo 26S proteasom, kompleks iz jedrnega dela in dveh regulatornih enot imenujemo 30S proteasom, samo jedrni del pa imenujemo 20S proteasom. Imena izvirajo iz Svedbergovega sedimentacijskega koeficienta za posamezno enoto oziroma kompleks (22, 23).

Jedrni del oz. 20S proteasom je kompleks v obliki soda, sestavljen iz dveh zunanjih α - in dveh notranjih β -obročev. Zunanja α -obročja sta sestavljena iz 7 α -podenot in predstavljata vhodno mesto za proteine, notranja β -obročja pa sta sestavljena iz 7 β -podenot in imata proteolitsko funkcijo (Slika 2). Katalitsko aktivne podenote so β 1c (PSMB6), ki ima kaspazam podobno delovanje, β 2c (PSMB7), ki ima tripsinu podobno delovanje ter β 5c (PSMB5), ki ima kimotripsinu podobno delovanje (20).



Slika 2: Sestava proteasoma.

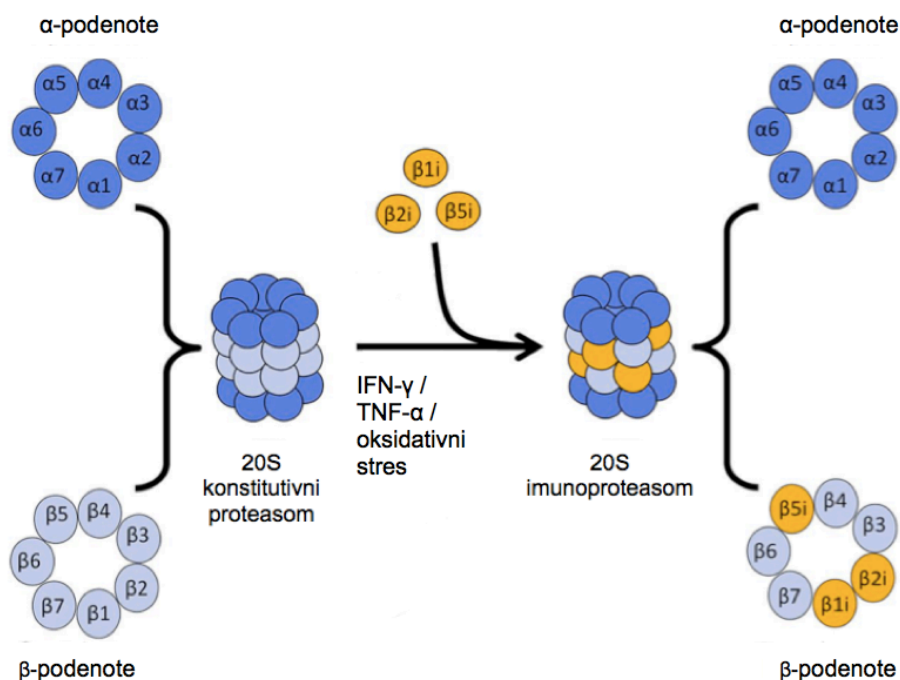
Proteasom je proteolitični kompleks, ki je sestavljen iz katalitske enote (KE) ali 20S proteasoma in iz ene ali dveh 19S regulatornih enot (RE), ki se vežeta na katalitsko enoto. 20S proteasom je sestavljen iz štirih heptamernih obročev. Notranja obroča sta sestavljena iz beta, zunanja pa iz alfa podenot. Slika, povzeta po (24).

1.2.2 Imunoproteasom

Poleg konstitutivnega proteasoma, ki je prisoten v vseh evkariontskih celicah, obstajajo še tri tkivno specifične izooblike proteasoma – spermatoproteasom, timoproteasom in imunoproteasom (25). Spermatoproteasom se nahaja v testisih, timoproteasom najdemo v kortikalnih epiteljskih celicah priželjca, imunoproteasom pa najdemo predvsem v monocitih in limfocitih (20). Imunoproteasom je ključen za delovanje celične imunosti. S proteolizo znotrajceličnih proteinov omogoča nastajanje antigenih peptidov s hidrofobnim C-koncem. Ti lahko tvorijo komplekse z molekulami poglobitnega histokompatibilnega kompleksa tipa I (MHC I), ki so odgovorne za predstavitev citosolskih proteinov na površini celic. Kompleksi med MHC I in peptidnimi antigeni se vežejo na zunanjo stran celične membrane, tam pa jih prepoznajo citotoksični limfociti T (26, 27). Tvorba peptidov za predstavitev antigenov pa ni edina vloga imunoproteasoma. Novejše študije so pokazale, da ima delovanje imunoproteasoma pomembno vlogo tudi pri nastajanju citokinov, regulaciji celičnega cikla in apoptozi (19).

Imunoproteasom nastane iz konstitutivnega 20S proteasoma, in sicer ob stimulaciji z vnetnim mediatorjem interferonom gama (IFN- γ). Ob prisotnosti IFN- γ se konstitutivno izražene podenote β 1c, β 2c in β 5c zamenjajo z inducibilnimi podenotami β 1i (LPM2), β 2i (MECL-1) in β 5i (LMP7) (26). Tako nastali 20S imunoproteasom (i20S) predstavlja katalitsko jedro imunoproteasoma. Inducibilne beta podenote lahko nastanejo tudi pod

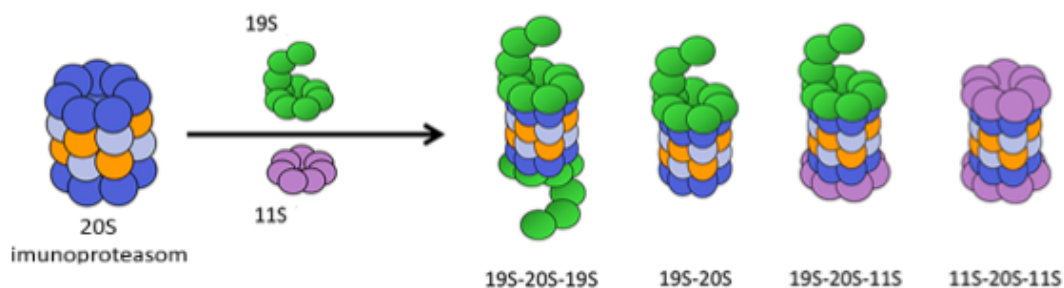
vplivom tumor nekrotizirajočega dejavnika α (TNF- α) in oksidativnega stresa (28, 29). Podenoti $\beta 1i$ in $\beta 5i$ imata kimotripsinu podobno delovanje, podenota $\beta 2i$ pa ima tripsinu podobno delovanje (26). Na Sliki 3 je predstavljen shematski prikaz nastanka in sestave imunoproteasoma.



Slika 3: Nastanek in sestava imunoproteasoma.

Imunoproteasom nastane iz 20S konstitutivnega proteasoma; sestavljen je iz 2 α -obročev in 2 β -obročev. Ob prisotnosti IFN- γ se konstitutivno izražene podenote $\beta 1c$, $\beta 2c$ in $\beta 3c$ zamenjajo z inducibilnimi podenotami $\beta 1i$ (LPM2), $\beta 2i$ (MECL-1) in $\beta 5i$ (LMP7) ter tako tvorijo imunoproteasom. Slika, povzeta po (30).

Na vrh in/ali na dno katalitske enote se veže še regulatorni del. Regulatorni del imunoproteasoma lahko predstavlja 19S (PA700) regulatorna enota ali inducibilna 11S (PA28) regulatorna enota, ki nastane pod vplivom IFN- γ (30). Možne so različne kombinacije vezav regulatornih enot, ki vodijo v nastanek različnih imunoproteasomskih kompleksov, ki imajo posledično tudi različne katalitske lastnosti. Imunoproteasom ima lahko eno ali dve regulatorni enoti, ti dve sta lahko enakega ali različnega tipa (19S/11S) (26, 30). Možne kombinacije imunoproteasomskega jedra z regulatornimi enotami so prikazane na Sliki 4.



Slika 4: Možne kombinacije imunoproteasomskega jedra z regulatornimi enotami.

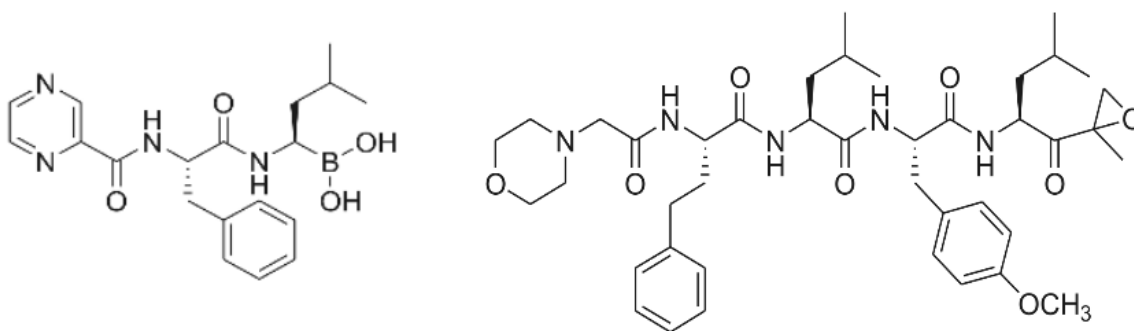
Na jedrni del imunoproteasoma, 20S proteasom, se lahko vežeta 11S in 19S regulatorni enoti. Lahko se veže le ena regulatorna enota, lahko se vežeta na obe strani enaki, lahko pa se veže na vsako stran druga regulatorna enota. Tako nastanejo imunoproteasomski kompleksi z različnimi katalitskimi aktivnostmi. Slika, povzeta po (30).

Poleg proteasomov in imunoproteasomov obstajajo tudi t.i. hibridni proteasomi, ki jih sestavljajo tako proteasomske kot imunoproteasomske podenote. Te so odkrili v različnih celicah in tkivih, med drugim v hepatičnih, črevesnih in skeletnih ter srčnih mišičnih celicah (26). Hibridni proteasomi, ki vsebujejo različne kombinacije konstitutivnih in inducibilnih katalitskih podenot, se med seboj razlikujejo tudi po proteolitski kapaciteti in specifičnosti. Različne proteolitske sposobnosti omogočajo nastanek bolj raznolikih peptidov za predstavitev antigenov v kompleksu z molekulami MHC I. Ta raznolikost pa podpira širok odgovor citotoksičnih limfocitov T, kar pripomore k učinkovitemu delovanju celične imunosti (31, 32).

1.2.3 Inhibitorja proteasoma bortezomib in karfilzomib

Bortezomib (Slika 5) je bil prvi inhibitor proteasoma, ki je bil odobren za klinično uporabo (21). V Sloveniji je trenutno registriran za zdravljenje diseminiranega plazmocitoma in limfoma plaščnih celic (33). Bortezomib deluje zaviralno na vse tri katalitske podenote proteasoma in na vse tri katalitske podenote imunoproteasoma. Na tarčo se veže reverzibilno, a je njegova uporaba zaradi neselektivnega delovanja povezana s številnimi neželenimi učinki, med njimi s periferno nevropatijo in srčnimi motnjami. Poleg tega se pri bolnikih, ki se zdravijo z bortezomibom, pogosto razvije rezistenca nanj, kar njegovo uporabo še dodatno omejuje (20, 28). Kljub temu pa bortezomib predstavlja možnost za izboljšanje ali zdravljenje številnih težko ozdravljivih obolenj. Trenutno poteka mnogo kliničnih študij z bortezomibom, kjer ga preučujejo kot učinkovino za zdravljenje malignih in avtoimunskih obolenj, samostojno ali v kombinaciji z drugimi zdravili (34).

Karfilzomib (Slika 5) je inhibitor proteasoma druge generacije. Proteasomski inhibitorji druge generacije so bili zasnovani, da bi zmanjšali pojavnost in resnost neželenih učinkov ter da bi premagali rezistenco, ki se je pojavljala pri terapiji z bortezomibom. Karfilzomib je ireverzibilni inhibitor proteasoma, ki v nanomolarnih koncentracijah deluje inhibitory na proteasomsko podenoto $\beta 5c$ in imunoproteasomsko podenoto $\beta 5i$, z nekoliko večjo afiniteto do proteasomske podenote (20, 35). Trenutno je v Sloveniji registriran za terapijo diseminiranega plazmocitoma (33). Hkrati je vključen v številne klinične študije, za zdravljenje diseminiranega plazmocitoma in drugih malignih obolenj (36).



Slika 5: Strukturni formuli bortezomiba (levo) in karfilzomiba (desno).

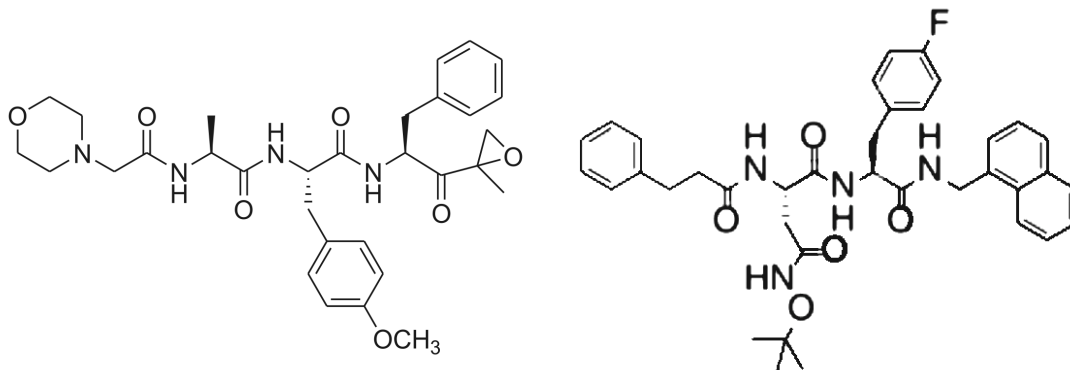
Bortezomib je inhibitor proteasoma 1. generacije, karfilzomib je inhibitor proteasoma 2. generacije. Oba delujeta nespecifično in inhibirata tako proteasomske kot imunoproteasomske podenote (20).

Diseminiran plazmocitom je maligno obolenje, pri katerem pride do nenadzorovane proliferacije in kopičenja plazmatk, te pa nastanejo ob dozorevanju limfocitov B (37). Na podlagi učinkovitosti bortezomiba in karfilzomiba pri zdravljenju bolnikov z diseminiranim plazmocitomom so v predhodnih študijah preizkušali bortezomib in karfilzomib kot učinkovini za terapijo KLL. Bortezomib in karfilzomib sta *in vitro* inducirala apoptozo celic KLL že v nanomolarnih koncentracijah (5, 38). V sledečih kliničnih študijah za zdravljenje KLL pa nista izkazovala zadostnega učinka (21).

1.2.4 Inhibitorja imunoproteasoma ONX-0914 in DPLG-3

Imunoproteasom se nahaja predvsem v celicah imunskega sistema, zato inhibitorji imunoproteasoma predstavljajo možnost za tarčno terapijo bolezni, za katere je značilno prekomerno nastajanje ali kopičenje imunskih celic, kot so hematološka maligna obolenja. Poleg tega so povečano aktivnost imunoproteasoma opazili tudi pri različnih avtoimunskih in vnetnih obolenjih. Uporaba inhibitorjev imunoproteasoma tako hkrati predstavlja tudi obetavne možnosti za razvoj novih strategij zdravljenja teh obolenj (20).

ONX-0914 ali PR-957 je epoksiketon, ki je bil prvi identificiran selektivni inhibitor imunoproteasomske podenote $\beta 5i$ (Slika 6). Njegova afiniteta do imunoproteasomske podenote $\beta 5i$ je približno 10-krat večja v primerjavi z afiniteto do konstitutivne podenote $\beta 5c$ (20). ONX-0914 se na tarčo veže ireverzibilno (39).



Slika 6: Strukturni formuli ONX-0914 (levo) in DPLG-3 (desno).

ONX-0914 in DPLG-3 sta selektivna inhibitorja imunoproteasoma, ki zavirata delovanje katalitske podenote $\beta 5i$. ONX-0914 ima 10-krat nižjo afiniteto za konstitutivno podenoto $\beta 5c$. DPLG-3 je več kot 7000-krat bolj selektiven za podenoto $\beta 5i$ v primerjavi s podenoto $\beta 5c$ (20).

V nedavni predklinični študiji na miškah je ONX-0914 učinkovito zmanjšal vnetje in zavrl nastanek ter napredovanje raka debelega črevesja in danke (40). Čeprav je bil sprva zasnovan kot protitumorna učinkovina, se je izkazalo, da ima ONX-0914 dobre možnosti tudi za uporabo pri zdravljenju avtoimunskih obolenj (41). V predkliničnih študijah na živalskih modelih je upočasnil napredovanje številnih avtoimunskih bolezni. Izkazal je učinkovito delovanje pri zaviranju revmatoidnega artritisa, diabetesa, kolitisa, lupusa, multiple skleroze, Hashimotovega tiroiditisa in nevritisa (19, 42). ONX-0914 je v predkliničnih študijah na miškah z induciranim revmatoidnim artritism zmanjšal vnetje, izražanje citokinov in znižal serumske koncentracije protiteles ter se tako izkazal kot obetavna potencialna učinkovina (43).

DPLG-3 je visoko selektiven, nekovalenten inhibitor podenote $\beta 5i$ (Slika 6). Njegovo delovanje je več kot 7000-krat bolj selektivno za podenoto $\beta 5i$ v primerjavi s podenoto $\beta 5c$. Zaradi izrazito visoke selektivnosti je DPLG-3 lahko pomembno sredstvo za ugotavljanje vloge imunoproteasomske podenote $\beta 5i$ pri vnetnih in malignih obolenjih ali drugih stanjih, kjer je ključno delovanje imunskega sistema. Do sedaj je bila objavljena ena raziskava z uporabo DPLG-3, kjer so ugotovili, da je kratkotrajna terapija z njim na poskusnih miškah izboljšala uspešnost avtologne presaditve srca (44).

2 NAMEN DELA

Namen dela bo ovrednotiti imunoproteasom kot potencialno tarčo za zdravljenje KLL in na ta način doprinesti k razumevanju vloge imunoproteasoma v celicah KLL.

Najprej bomo ovrednotili citotoksičen učinek inhibitorja imunoproteasoma ONX-0914 na celičnih linijah MEC1 in MEC2. Citotoksično delovanje bomo določili z merjenjem živosti celic s testom metabolne aktivnosti MTS 24 ur in 48 ur po tretiranju celic z naraščajočimi koncentracijami (25 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM) ONX-0914. Nadalje bomo na celičnih linijah MEC1 in/ali MEC2 za primerjavo določili citotoksičnost inhibitorjev proteasoma bortezomiba in karfilzomiba, kinaznih inhibitorjev ibrutiniba in idelaliziba ter visoko selektivnega inhibitorja imunoproteasomske podenote $\beta 5i$, DPLG-3.

Nato bomo določili citotoksične učinke ONX-0914, bortezomiba in karfilzomiba na primarnih celicah KLL. Primarne celice KLL bomo izolirali iz polne krvi bolnikov s KLL, ki bodo privolili v sodelovanje v raziskavi (odločba KME, št. 93/12/10). Citotoksično delovanje bomo določili z merjenjem živosti celic z metabolnim testom PrestoBlue 24 in 48 ur po tretiranju celic z različnimi koncentracijami učinkovine. Nadalje bomo s pretočno citometrijo določili mehanizem celične smrti, povzročene z inhibitorjem imunoproteasoma ONX-0914 v celicah KLL.

V naslednjem koraku bomo z namenom določitve selektivnosti delovanja ONX-0914, bortezomiba in karfilzomiba na celice KLL, ovrednotili citotoksične učinke le-teh na celičnih linijah LCL, ki izvirajo iz limfocitov B zdravih darovalcev. Citotoksičnost na celičnih linijah LCL bomo primerjali s citotoksičnostjo na celicah KLL.

V drugem delu bomo v celicah KLL, LCL in MEC na nivoju mRNA določili izražanje imunoproteasomske katalitske podenote $\beta 5i$ in proteasomske katalitske podenote $\beta 5c$, ki sta tarči preiskovanih inhibitorjev (imuno)proteasoma. Najprej bomo iz proučevanih celic izolirali RNA in jo z obratnim prepisovanjem prepisali v komplementarno DNA. Izražanje podenot $\beta 5i$ in $\beta 5c$ bomo nato določili s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo (qPCR). Na koncu bomo ovrednotili potencialno korelacijo med citotoksičnimi učinki ONX-0914, bortezomiba in karfilzomiba ter izražanjem katalitskih podenot $\beta 5i$ in $\beta 5c$.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Metode dela s celicami, izolacija limfocitov B, določanje EC₅₀ in pretočna citometrija

Preglednica III: Seznam materialov in aparatur, potrebnih za delo s celicami.

Material/Aparatura	Proizvajalec
96-jamične sterilne črne mikrotitrne plošče	Nunclon™ Delta Surface, Nemčija
6-, 12-, 24- in 96-jamične sterilne mikrotitrne plošče za gojenje celičnih kultur	TPP, Švica
avtoklav A-21	Kambič laboratorijska oprema, Slovenija
avtomatska multikanalna pipeta	Eppendorf, Nemčija
BD Microlacne™ 3 igle	Becton Dickinson, Španija
BD Plastipak™ brizgalke	Becton Dickinson, Španija
CellTiter 96® AQueous One Solution (MTS)	Promega, ZDA
centrifuga Centrifuge 5430 R	Eppendorf, Nemčija
centrifugirke (15 in 50 mL)	TPP, Švica
centrifugirke za pretočno citometrijo (Flowtubes)	Invitrogen, ZDA
hemocitometer	Brand Neubauer, Nemčija
hladilnik z zamrzovalnikom	Gorenje, Slovenija
inkubator	Heraus Holding GmbH, Nemčija
invertni svetlobni mikroskop (Olympus CK40)	Olympus optical, Nemčija
komora z laminarnim pretokom zraka (LAF komora)	Siemens, ZDA
krioviale	Sarstedt, Nemčija
krovnna stekla	Assistent, Nemčija
mikrocentrifugirke (epice)	Eppendorf, Nemčija
volumni: 0,5 mL, 1,5 mL in 2 ml	Eppendorf, Nemčija
mikrotitrski čitalec (BioTek Synergy HT)	Biotek, ZDA
multikanalna pipeta (100 µL)	Eppendorf, Nemčija
pipete 0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf, Nemčija
posode T-flask za gojenje celičnih kultur	TPP, Švica
pretočni citometer Attune NxT	Invitrogen, ZDA
programska oprema FlowJo®	FlowJo, LLC, Ashland, Oregon, ZDA
programska oprema Gen5	BioTek
programska oprema GraphPad Prism 7	GraphPad Software, CA, ZDA
serološke pipete za enkratno uporabo (volumni: 5, 10, 25, 50 mL)	TPP, Švica
sterilni nastavki za pipete	Sarstedt, Nemčija
Thermo Scientific™ Mr. Frosty™ zamrzovalna posoda	Thermo Fisher, ZDA
vibracijski mešalnik (Vortex GENIE 2)	Scientific industries, ZDA
zamrzovalnik - 80 °C	Forma scientific, Kanada
zaščitne rokavice iz lateksa	Kimberly-Clark, ZDA

Preglednica IV: Seznam kemikalij, potrebnih za delo s celicami.

Kemikalija	Proizvajalec
Annexin V, PE conjugate (R-PE Annexin V)	Molecular Probes™, ZDA
avtoklavirana ultra čista voda	FFA
bortezomib	Selleck Chemicals, ZDA
DMSO	Sigma-Aldrich, ZDA
DPLG-3	FFA
FBS (10% fetalni goveji serum)	Gibco, ZDA
Ficoll-Paque® reagent	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Švedska
ibrutinib	Cayman Chemical, ZDA
idelalizib (CAL-101)	Cayman Chemical, ZDA
karfilzomib	Selleck Chemicals, ZDA
L-glutamin	Sigma-Aldrich, ZDA
ONX-0914	FFA
penicilin, streptomycin	Sigma-Aldrich, ZDA
PrestoBlue™ cell viability reagent	Invitrogen, ZDA
raztopina tripanskega modrila	Sigma-Aldrich, ZDA
RosetteSep® obogatitvena mešanica za humane limfocite B	StemCell Technologies, Kanada
RPMI-1640 medij	Sigma-Aldrich, ZDA
SYTOX™ Blue Dead Cell Stain	Molecular Probes™, ZDA

3.1.2 Analiza izražanja genov**Preglednica V: Seznam materialov in aparatur, potrebnih za analizo izražanja genov.**

Material/ Aparatura	Proizvajalec
centrifuga Centric 322A	Tehtnica, Železniki
centrifuga Centrifuge 5430 R	Eppendorf, Nemčija
ciklični termostat peqSTAR	Peqlab brand, Nemčija
delovna komora z UV lučko	Biosan, Latvija
folija Lightcycler® za zaščito	Roche, Švica
mikrocentrifugirke (epice) volumni: 0,5 mL, 1,5 mL in 2 ml	Invitrogen, ZDA
minicentrifuga Mini Centrifuge MCF-2360	LMS, Japonska
Nanodrop ND-1000 Spektrofotometer	NanoDrop Technologies Inc., ZDA
PCR analizator Lightcycler® 480 II	Roche, Švica
384-jamične PCR plošče Lightcycler® 480 multiwell	Roche, Švica
pipete 0,1 µl-2,5 µl, 0,5 µl-10 µl, 20 µl-200 µl, 100 µl-1000 µl	Eppendorf, Nemčija
sterilni nastavki za pipete	Sarstedt, Nemčija
vibracijski mešalnik Bio Vortex V1	Biosan, Latvija
zaščitne rokavice iz lateksa	Kimberly-Clark

Preglednica VI: Seznam kemikalij in kompletov reagentov, potrebnih za analizo izražanja genov.

Kemikalija/ Komplet reagentov	Proizvajalec
70-% etanol (z avtoklavirano ultračisto vodo razredčimo 96 % etilni alkohol)	ECP, d.o.o., Trzin, Slovenija
EvaGreen® qPCR Mix Plus	Solis BioDyne, ZDA
kloroform	Ph. Eur za analizo
komplet reagentov High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, ZDA
komplet reagentov Pure Link™ RNA Micro-to-Midi Kit	Invitrogen, ZDA
oligonukleotidna začetnika za gen <i>GUSB</i>	Sigma-Aldrich, ZDA
oligonukleotidna začetnika za gen <i>LMP7</i> ($\beta 5i$)	Sigma-Aldrich, ZDA
oligonukleotidna začetnika za gen <i>PSMB5</i> ($\beta 5c$)	Sigma-Aldrich, ZDA
oligonukleotidna začetnika za gen <i>RPLP0</i>	Sigma-Aldrich, ZDA
SYBR® Select Master Mix	Thermo Fisher, ZDA
Trizol® reagent	Thermo Fisher, ZDA
voda brez RNaz	Sigma-Aldrich, ZDA

3.1.3 Pufri

Preglednica VII: Sestava pufra 10 x PBS in priprava pufra 1x PBS.

10 x PBS	Sestava
	80 g NaCl
	2 g KCl
	36,3 g Na ₂ HPO ₄ *12H ₂ O
	2,4 g KH ₂ PO ₄
	ultra čista voda; dopolnimo do 1,0 L
1 x PBS (pH 7,4)	Priprava
	10 x PBS smo redčili 1:10 z ultra čisto vodo, uravnali pH in avtoklavirali.

3.1.4 Gojišča in sestava

Preglednica VIII: Sestava medijev za gojenje celičnih linij in primarnih celic KLL.

Gojišče	Sestava
RPMI medij za KLL, MEC1 in MEC2	500 ml RPMI-1640 50 ml HD FBS 5,5 ml mešanice penicilina in streptomicina 5,5 ml L-glutamina
RPMI medij za LCL	500 ml RPMI-1640 50 ml HD FBS 5,5 ml mešanice penicilina in streptomicina 11 ml L-glutamina

3.2 METODE DELA S CELICAMI

3.2.1 Celični laboratorij in komora z laminarnim pretokom zraka

Celični laboratorij je namenjen delu s celičnimi kulturami, za kar so potrebni aseptični pogoji. V celični laboratorij vstopamo le v za to namenjeni čisti laboratorijski halji in obutvi, na rokah pa moramo vedno nositi zaščitne rokavice. Pred in po delu s celičnimi kulturami moramo delovno površino, vso uporabljeno opremo, materiale in rokavice razkužiti s 70-% etanolom. Delo s celičnimi kulturami izvajamo v komorah z laminarnim pretokom zraka (LAF komora), saj tam veliko lažje dosežemo aseptične pogoje. LAF komora ima vgrajen HEPA (angl. *high efficiency particle*) filter, skozi katerega je vzpostavljen konstanten pretok zraka brez delcev, ki bi lahko kontaminirali celične kulture. Komora je opremljena z UV-lučko, s katero vsakič pred in po delu steriliziramo delovno površino. Pred pričetkom dela moramo UV-lučko prižgati za vsaj 20 minut (45, 46).

3.2.2 Zbiranje vzorcev

Vzorci krvi bolnikov s potrjeno diagnozo KLL je zbirala asist. Tijana Markovič, mag. farm., v okviru klinične študije z dovoljenjem Komisije RS za medicinsko etiko (odločba št. 93/12/10). Bolniki so bili povabljeni k sodelovanju v študiji med pregledom na Kliničnem oddelku za hematologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Pred podpisom pristanka na sodelovanje so bili podrobno seznanjeni s cilji in potekom raziskave. Sledil je odvzem majhnega volumna krvi (~ 5 mL). Vzorce smo zaradi varstva osebnih podatkov označili z internimi oznakami.

3.2.3 Celične kulture

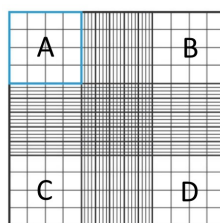
Pri izvajanju poskusov smo uporabljali celični liniji MEC1 in MEC2, primarne celice KLL ter celične linije LCL4, LCL9 in LCL1516. Celični liniji MEC1 in MEC2 smo pridobili iz Leibniz-inštituta DSMZ v Braunschweigu. Gojili smo ju v RPMI mediju za KLL, MEC1 in MEC2. Primarne celice KLL so primarni limfociti B, ki smo jih izolirali iz vzorcev krvi bolnikov s potrjeno diagnozo KLL. Celice KLL smo izolirali po postopku, opisanem v Poglavju 3.3. Gojili smo jih v RPMI mediju za KLL, MEC1 in MEC2. Humane celične linije LCL so bile pridobljene v nacionalnem izraelskem genetskem laboratoriju na Univerzi v Tel Avivu. Gojili smo jih v RPMI mediju za LCL.

Vse celične linije smo gojili v inkubatorju pri 37 °C v navlaženi atmosferi in 5 % CO₂. Celične linije smo gojili v ležečih 25- ali 75-mL “T-flaskih”. Celičnim gojiščem smo trikrat tedensko dodali svež medij, da smo vzdrževali optimalno koncentracijo za rast celic (2 x 10⁵ – 2 x 10⁶ celic/mL za MEC1 in MEC2, 1 x 10⁶ – 2 x 10⁶ celic/mL za LCL). Od tega smo enkrat tedensko celične suspenzije centrifugirali (1200 rpm, 5 minut), sprali s PBS-om (resuspendirali celice v PBS-ju, ponovno centrifugirali 5 minut pri 1200 rpm in odstranili supernatant) in nazadnje resuspendirali v svežem mediju ter prenesli v svež “T-flask”. Medije, ki smo jih hranili v hladilniku, smo vsakič pred uporabo segreti na 37 °C.

3.2.4 Štetje celic

Koncentracijo celic v gojišču smo določali z invertnim mikroskopom, s štetjem celic, ki smo jim dodali tripansko modrilo. Tripansko modrilo je barvilo, ki mrtve celice obarva modro. V žive, nepoškodovane, celice pa ne vstopa in jih pod mikroskopom vidimo kot bele lise na modrem ozadju. To omogoča določitev deleža živih in mrtvih celic (47).

Najprej smo s serološko pipeto dobro premešali celično suspenzijo, nato smo 10 µL te suspenzije prenesli v mikrocentrifugirko. 10 µL celične suspenzije smo dodali 10 µL tripanskega modrila in premešali z uporabo vorteksa. 10 µL pripravljene zmesi smo prenesli na hemocitometer, ki je pripomoček za štetje celic (Slika 7).



Slika 7: Hemocitometer.

Hemocitometer je pripomoček za določanje koncentracije celic z vizualnim štetjem celic. Slika, povzeta po (48).

Prešteli smo mrtve in žive celice v 4 mrežastih območjih hemocitometra (A, B, C, D), ki so med seboj razdeljena z gostejšo mrežo. Nato smo po Enačbi 1 izračunali koncentraciji mrtvih in živih celic v suspenziji (4, 5).

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

Enačba 1

A, B, C, D število živih/mrtvih celic v posameznem območju hemocitometra

DF..... faktor redčenja

Za nadaljnje delo smo uporabili celične kulture z živostjo $\geq 90\%$.

3.2.5 Zamrzovanje celičnih kultur

Celične linije in izolirane celice KLL, ki jih nismo takoj porabili za poskuse, smo shranjevali v kriovialah v zamrzovalniku pri temperaturi $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za čim boljšo ohranitev živosti celic je bistvenega pomena hitrost zamrzovanja. Optimalna hitrost ohlajanja za ohranjanje nepoškodovanih celic je $\sim -1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ (50).

V svežo centrifugirko smo odpipetirali alikvot celične suspenzije, ki je vseboval 5×10^6 celic celične linije ali 20×10^6 primarnih celic KLL. Suspenzijo smo 5 minut centrifugirali pri 1200 rpm. Odstranili smo supernatant in celice resuspendirali v 1 mL svežega medija za zamrzovanje, ki je poleg RPMI medija vseboval 10 % DMSO-ja in 40 % FBS-ja. Suspenzijo smo prenesli v kriovialo. Kriovialo smo dali v hladilno posodo *Mr. Frosty*, ki omogoča kontrolirano ohlajanje celic s hitrostjo $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$. Hladilno posodo smo nato postavili v zamrzovalnik na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.6 Odmrzovanje celičnih kultur

Ko smo potrebovali celice, smo jih odmrznili na sobni temperaturi. Medij za zamrzovanje je vseboval 10 % DMSO-ja, ki je deloval kot krioprotektant pri zamrzovanju. DMSO pa na odmrznjene celice v takšnih koncentracijah deluje toksično. Da smo znižali koncentracijo DMSO-ja, smo celično suspenzijo takoj, ko je odmrznila, prenesli v ustrezen svež medij (glej 3. 1. 4.). Nato smo suspenzijo centrifugirali (1200 rpm, 5 minut), odstranili supernatant in peletu ponovno resuspendirali v svežem mediju, da smo odstranili večino DMSO-ja. Celice KLL smo uporabili za poskuse takoj po odmrznitvi. Celične linije smo odmrznili, nato pa smo jih nekaj tednov gojili, da so si opomogle po odmrznitvi. Šele ko so se celice začele normalno razmnoževati in so imele primerno visoko živost, smo jih uporabili za izvajanje poskusov.

3.3 IZOLACIJA LIMFOCITOV B IZ POLNE KRVI

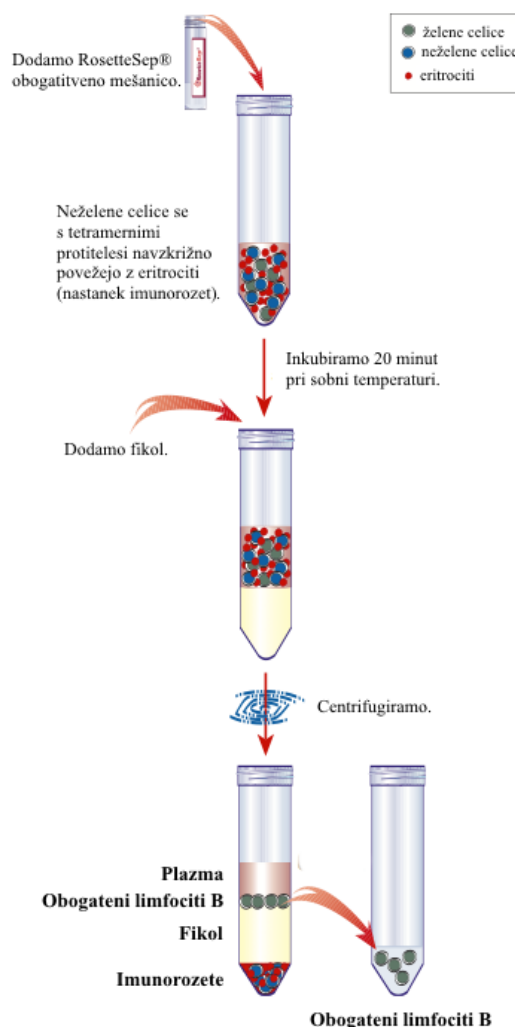
Limfocite B smo iz polne krvi izolirali z uporabo RosettesepTM obogatitvene mešanice za humane limfocite B (angl. *human B cell enrichment cocktail*). To je mešanica tetramernih protiteles, ki navzkrižno med seboj povežejo rdeče krvničke in neželene celice (celice v vzorcu polne krvi, ki niso limfociti B). Tako nastanejo imunski kompleksi – imunorozete. Po tvorbi imunorozet mešanici dodamo medij z gradientno gostoto (npr. fikol) in vse skupaj centrifugiramo. Imunorozete se skupaj z rdečimi krvničkami posedejo na dno.

Limfociti B, na katere se protitelesa niso vezala, pa ostanejo nad gradientnim medijem in jih lahko izoliramo iz mešanice (51). Na Sliki 8 je predstavljen shematski prikaz, zraven pa je opisan natančen postopek izolacije.

Postopek izolacije limfocitov B iz polne krvi

Pred postopkom smo reagente, centrifugo in vzorce ogreli na sobno temperaturo.

1. Vzorcju polne krvi (~ 5 mL) smo dodali RosetteSep® obogatitveno mešanico za humane limfocite B (50 µL mešanice/1 ml polne krvi) in 20 minut inkubirali na sobni temperaturi.
2. Redčili smo z enakim volumnom raztopine 2 % FBS/PBS in nežno premešali.
3. Razredčen vzorec smo prenesli v epruveto, v katero smo že prej, z brizgo in iglo (zaradi viskoznosti) dodali ~ 5 mL fikola. Pri tem smo pazili, da ni prišlo do mešanja plasti.
4. Centrifugirali smo 20 minut na 200 g pri sobni temperaturi brez zavore.
5. S pipeto smo previdno odstranili zgornjo plast (plazmo) do približno 1 cm nad plastjo limfocitov B. Plast limfocitov B smo previdno krožno pobrali in celice prenesli v epruveto s ~ 13 mL svežega medija. Pazili smo, da smo prenesli le celice in ne fikola, ki je toksičen za celice.
6. Centrifugirali smo 7 minut pri 1700 rpm, na sobni temperaturi.
7. Odstranili smo supernatant, dodali svež medij in resuspendirali celično pelet.
8. Prešteli smo celice, jih redčili na konc. 1×10^6 /mL ter jih uporabili za poskuse.



Slika 8: Postopek izolacije limfocitov B.

Limfocite B smo izolirali z uporabo Rosettesep™ obogatitvene mešanice za humane limfocite B. Slika, povzeta po (51).

Celice KLL smo izolirali v sodelovanju z Damjanom Avscem in Veroniko Rotnik, ki sta v okviru svojih magistrskih nalog prav tako potrebovala primarne celice KLL.

3.4 DOLOČANJE VREDNOSTI EC₅₀

3.4.1 Izpostavitvev celic spojinam

Pripravili smo suspenzijo celic določene celične linije s koncentracijo $3,0 \times 10^5$ celic/mL oz. suspenzijo primarnih celic KLL s koncentracijo $1,0 \times 10^6$ celic/mL. Suspenzijo smo dobro premešali s serološko pipeto. V vdolbine na mikrotitrskih ploščicah z 12 vdolbinami smo napipetirali 1 mL celične suspenzije. V vsako vdolbino smo dodali določeno količino raztopin preučevanih spojin, da smo dosegli različne koncentracije v suspenziji. Imena in koncentracije spojin, s katerimi smo tretirali posamezne celične linije oz. celice KLL so predstavljeni v Preglednici IX.

Preglednica IX: Koncentracije spojin, s katerimi smo tretirali posamezne celične linije.

Celična linija/Celice	Spojina	Koncentracija
MEC1	ONX-0914	25 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM
	bortezomib	1 nM, 5 nM, 7,5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM
	karfilzomib	1 nM, 2,5 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM
	ibrutinib	0,01 μM, 0,1 μM, 0,25 μM, 1 μM, 5 μM, 10 μM, 25 μM, 50 μM, 100 μM
	idelalizib	1 μM, 5 μM, 10 μM, 25 μM, 50 μM, 100 μM
	DPLG-3	0,25 μM, 0,5 μM, 1 μM, 5 μM, 10 μM, 25 μM
MEC2	ONX-0914	10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM
	bortezomib	1 nM, 5 nM, 7,5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM
	karfilzomib	1 nM, 2,5 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM
LCL4, LCL9, LCL1516	ONX-0914	25 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM, 5000 nM
	bortezomib	1 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM
	karfilzomib	1 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM
celice KLL	ONX-0914	5nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM
	bortezomib	1 nM, 5 nM, 7,5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM
	karfilzomib	1 nM, 2,5 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM

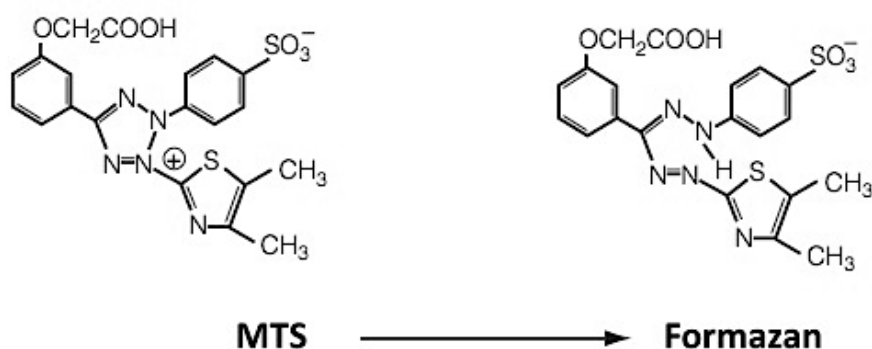
V dve vdolbinici nismo dodali spojine. V eno nismo dodali ničesar, ta je predstavljala netretirano kontrolo. V drugo smo dodali 1 μL DMSO-ja, ta je predstavljala netretirano kontrolo topila, saj so bile spojine raztopljene v DMSO-ju. Iz vsake vdolbine smo nato z multikanalno pipeto prenesli po 100 μL alikvota na dve 96-jamični mikrotitrski plošči. Vsak alikvot smo prenesli v trojniku (triplikatu). Alikvote smo prenašali z multikanalno pipeto. Alikvote v trojniku smo prenesli na 2 mikrotitrski plošči, saj smo opazovali

delovanje učinkovin na celice po 24 in 48 urah. Za poskuse na celicah celičnih linij MEC in LCL smo uporabili prozorne mikrotitrne plošče, za poskuse na primarnih celicah KLL pa smo uporabili črne mikrotitrne plošče. Na mikrotitrski plošči smo vedno nanesti tudi medij, v katerem smo gojili posamezne celice (100 μ L medija v eno vdolbinico, v triplicatu). Tako pripravljene mikrotitrne plošče smo nato postavili v inkubator (37 $^{\circ}$ C, 5 % CO_2), eno za 24 in drugo za 48 ur.

3.4.2 Test metabolne aktivnosti

Citotoksičnost spojin smo določali s testom metabolne aktivnosti. Testi metabolne aktivnosti temeljijo na merjenju presnove substratov. Ko celice umrejo, zelo hitro izgubijo možnost presnavljanja substratov, zato zmanjšanje metabolne aktivnosti dobro korelira s številom viabilnih celic (52). Test metabolne aktivnosti smo izvajali z reagentoma MTS in PrestoBlue.

MTS je tetrazolijeva sol 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol, ki prehaja celično membrano. V živih celicah ga nato encimi reducirajo v formazan (Slika 9), v mrtvih celicah pa do redukcije ne pride. Količina nastalega formazana je tako sorazmerna številu živih celic. Določamo jo kolorimetrično z merjenjem absorbanca pri 490 nm (52, 53).

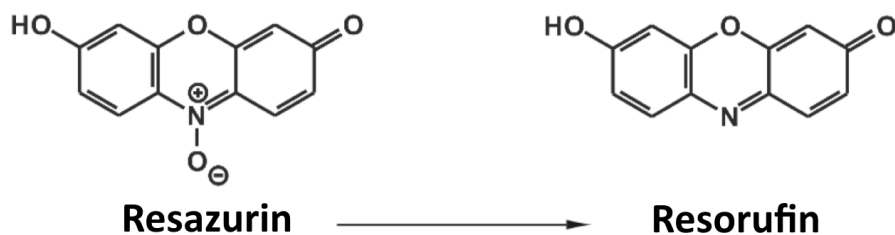


Slika 9: Redukcijska pretvorba reagenta MTS v obarvan produkt formazan.

Slika, povzeta po (53).

Reagent PrestoBlue vsebuje modro barvilo resazurin (7-hidroksi-3H-fenoksazin-3-on-10-oksidi), ki se v živih celicah prav tako reducira. Z redukcijo resazurina nastane resorufin, ki fluorescira (Slika 10). Ekscitacijska valovna dolžina resorufina je 560 nm, emisijska valovna dolžina pa 590 nm. Pri testu metabolne aktivnosti z reagentom PrestoBlue je torej

jakost fluorescence sorazmerna številu presnovno aktivnih živih celic (45, 47).



Slika 10: Redukcijska pretvorba resazurina v fluorescenten produkt resorufin.

Slika, povzeta po (55).

Test redukcije resazurina je nekoliko bolj občutljiv kot test redukcije tetrazola (52). Primarne celice KLL so metabolno manj aktivne v primerjavi s celicami MEC in LCL. Zato smo metabolni test na celičnih linijah izvajali z reagentom MTS, na primarnih celicah pa z reagentom PrestoBlue. Po 21 in 45 urah inkubacije celic s spojinami smo v vsako vdolbinico dodali 10 μ L reagenta MTS ali PrestoBlue, nato pa smo po 3 urah z mikrotitrskim čitalcem merili jakost absorbance oz. fluorescence. Po Enačbi 2 smo izračunali relativno živost celic.

$$\text{Relativna živost celic (\%)} = ((J_{\text{vzorec}} - J_{\text{slepa}}) / (J_{\text{kontrola}} - J_{\text{slepa}})) \times 100$$

Enačba 2

J_{vzorec}jakost absorbance ali fluorescence vzorca tretiranih celic

J_{kontrola}jakost absorbance ali fluorescence vzorca celic z dodatkom DMSO-ja

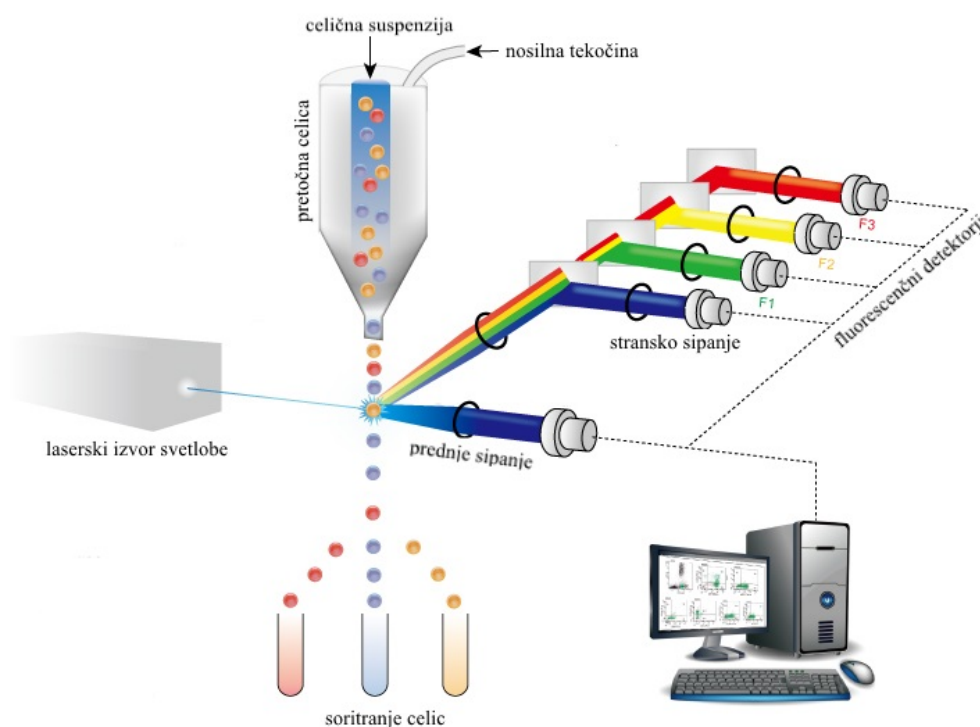
J_{slepa} jakost absorbance ali fluorescence medija

Določili smo relativno živost celic v vsaki vdolbinici. Nato smo s programom GraphPad Prism izračunali srednjo efektivno koncentracijo (EC_{50}) posamezne spojine po 24 in po 48 urah.

3.5 PRETOČNA CITOMETRIJA

Pretočna citometrija je zelo pogosto uporabljena metoda za štetje in določanje lastnosti posameznih celic v heterogeni celični suspenziji. Pretočni citometer omogoča hkratno določanje večih fizikalnih in kemijskih parametrov. Celice v suspenziji posamično potujejo skozi laserski snop svetlobe. Glede na sipanje svetlobe pretočni citometer določi velikost in granuliranost posamezne celice. Na Sliki 11 je prikazan shematski prikaz pretočnega citometra. Prednje sipanje, ki ga zaznava detektor, ki je v ravnini snopa svetlobe, je sorazmerno velikosti celice. Stransko sipanje zaznava detektor, ki je postavljen pravokotno

na snop svetlobe. To je posledica sipanja svetlobe na celičnih organelih in je tako sorazmerno granuliranosti celic. S spreminjanjem nastavitvev, specifičnim markiranjem ali barvanjem celic lahko s pretočnim citometrom določamo še številne druge biokemijske lastnosti celic. Pogosto celice označujemo s fluorokromi. Pravokotno na snop svetlobe so tako postavljeni še detektorji, ki zaznavajo fluorescenco različnih valovnih dolžin. Pogosto pa lahko že samo z analizo prednjega in stranskega sipanja razlikujemo med različnimi populacijami celic (56).



Slika 11: Shematski prikaz pretočnega citometra.

Slika, povzeta po (57).

3.5.1 Določitev deleža apoptičnih in mrtvih celic

S pomočjo pretočne citometrije smo s hkratnim označevanjem celic z reagentoma R-PE Annexin V in SYTOX™ Blue določili delež mrtvih in apoptičnih celic KLL po tretiranju z ONX-0914. Reagent SYTOX™ Blue se veže na nukleinske kisline. SYTOX™ Blue ne prehaja skozi celično membrano, zato lahko vstopa le v mrtve celice, ki nimajo intaktnih celičnih membran. Ob vezavi na nukleinske kisline se njegova fluorescenca ojača za več kot 500-krat. To nam omogoča, da s pretočnim citometrom preko fluorescenčnih signalov med seboj ločimo populaciji živih in mrtvih celic (58). Za določanje deleža apoptičnih celic smo celice obarvali z reagentom R-PE Annexin V. To je protein aneksin V,

konjugiran s fluorokromom R-fikoeritriinom (R-PE). Aneksin V se ob prisotnosti kalcija veže na fosfatidil serin. To je fosfolipid, ki sestavlja celično membrano in se pri živih celicah nahaja na intracelularni strani membrane. Ker R-PE Annexin V ne prehaja celične membrane, se torej ne more vezati v membrano živih celic. V zgodnjih fazah apoptoze pride do sprememb v celični membrani, vključno s premestitvijo fosfatidil serina na ekstracelularno stran membrane. To omogoči vezavo aneksina, kar pretočni citometer zazna kot oranžno fluorescenco z emisijskim maksimumom pri > 575 nm. R-PE Annexin V tako označi zgodnje in pozno apoptične celice (59).

Postopek označevanja celic z reagentoma R-PE Annexin V in SYTOX™ Blue

Pred pripravo celične suspenzije za indukcijo apoptoze smo celice 2-krat sprali s pufrom PBS (5 min pri 1000 rpm). Nato smo jih resuspendirali v svežem mediju. Celične suspenzije za analizo apoptoze s pretočnim citometrom smo nato pripravili po sledečem postopku:

1. Inducirali smo apoptozo na celicah, v negativno kontrolo smo dodali le topilo (0,1 % DMSO v RPMI mediju).
2. Celice smo inkubirali v inkubatorju (37 °C, 5 % CO₂).
3. Po 24 urah smo celice sprali s hladnim pufrom PBS.
4. Sprane celice smo centrifugirali (1200 rpm, 5 min), odstranili smo supernatant in celice resuspendirali v "annexin-binding buffer". Določili smo koncentracijo pripravljene suspenzije in jo redčili z "annexin-binding buffer" na koncentracijo $1,0 \times 10^6$ celic/mL.
5. V 100 µL vzorca smo dodali 2,5 µL reagenta R-PE Annexin V in 1 µL 10 x razredčenega reagenta SYTOX™ Blue in inkubirali 15 minut na sobni temperaturi.
6. Po končani inkubaciji smo dodali 200 µL "annexin-binding buffer", rahlo premešali in postavili vzorce na led.
7. Pripravljene vzorce smo takoj analizirali s pretočnim citometrom.

Določanje deleža mrtvih in apoptičnih celic je potekalo v sodelovanju s sošolcem Damjanom Avscem, ki je opravljal podobne raziskave v okviru svoje magistrske naloge.

3.6 ANALIZA IZRAŽANJA GENOV

3.6.1 Izolacija RNA

RNA iz celičnih linij in primarnih celic KLL smo izolirali z uporabo trizola in kompleta reagentov "PureLink™ RNA Micro-to-Midi Kit". Delo je potekalo v čisti komori RNA, ki smo jo predhodno očistili s 3-% hipokloritom in jo izpostavili UV svetlobi za 15 min. Izolacijo smo izvedli po sledečem postopku (60):

1. 5×10^6 celicam smo v digestoriju dodali 1 mL trizola.
2. Suspenzijo smo dobro premešali s pipeto (pipetiranje gor-dol) in takoj zamrznili na -80°C .
3. Vzorec smo odmrznili na sobni temperaturi in inkubirali 5 minut.
4. V digestoriju smo vzorcu dodali 0,2 mL kloroforma, nato smo epico močno stresali (ročno) vsaj 15 sekund in inkubirali 3 minute na sobni temperaturi.
5. Centrifugirali smo pri $12\,000 \times g$ 15 minut pri 4°C .
6. 400 μL zgornje vodne faze smo prenesli v svežo epico in dodali enak volumen 70-% etanola. Vse skupaj smo z vorteksiranjem in obračanjem epice dobro premešali, da so se dispergirali vsi vidni delci.
7. Na "RNA Spin Cartridge" smo nanegli 700 μL vzorca, centrifugirali pri $12\,000 \times g$ 15 sekund pri sobni temperaturi, zavrgli eluat in kolono ponovno vstavili v epico.
8. Na kolono smo nanegli še preostanek vzorca in ponovili korak 7.
9. Na kolono smo nanegli 700 μL "Wash Buffer I", centrifugirali na $12\,000 \times g$ 15 sekund pri sobni temperaturi in zavrgli eluat.
10. Kolono smo prenesli v čisto epico, dodali 500 μL "Wash Buffer II", centrifugirali na $12\,000 \times g$ 15 sekund pri sobni temperaturi, zavrgli eluat in vstavili kolono v epico.
11. Ponovili smo korak 10.
12. Centrifugirali smo na $12\,000 \times g$ 1 minuto pri sobni temperaturi, da smo osušili membrano z RNA.
13. Zavrgli smo epico in vstavili kolono v "RNA Recovery Tube".
14. Na sredino kolone smo dodali 30 μL vode brez nukleaz in 1 minuto inkubirali pri sobni temperaturi. Nato smo centrifugirali pri $12\,000 \times g$ 2 minuti pri sobni temperaturi.
15. Na sredino kolone smo dodali 10 μL vode brez nukleaz in 1 minuto inkubirali pri sobni temperaturi. Nato smo centrifugirali na $12\,000 \times g$ 2 minuti pri sobni temperaturi.
16. Kolono smo odstranili, eluat, ki je vseboval izolirano RNA, smo shranili na -80°C .

3.6.2 Merjenje koncentracije in čistosti izolata RNA

Preden smo izolirano RNA zamrznili, smo v posebno epico odpipetirali 3 μL vzorca za meritve na spektrofotometriškem merilniku NanoDrop® ND-1000. NanoDrop® ND-1000 je izmeril koncentracijo in čistost izolatov RNA. To nam je omogočilo pripravo vzorcev z željeno koncentracijo in oceno kakovosti izolirane RNA.

Na NanoDrop® ND-1000 smo nanесли 1,5 μL vzorca. Spektrofotometer je izmeril absorbanco pri 230 nm, 260 nm in 280 nm. Iz absorbance pri 260 nm spektrofotometer izračuna koncentracijo RNA s pomočjo Beer-Lambertove enačbe (enačba 3).

$$A = \varepsilon \times C \times l$$

Enačba 3

A..... absorbanca pri 260 nm

ε molarni ekstinkcijski koeficient, ki za RNA znaša 40 ng*cm/ μL

l..... dolžina poti v cm

Čistoto izolata smo ocenili z razmerjem absorbance pri 260 nm in 280 nm (A_{260}/A_{280}) in razmerjem absorbance pri 260 nm in 230 nm (A_{260}/A_{230}). Razmerje A_{260}/A_{280} nam poda oceno kontaminacije vzorca s proteini in je za čisto raztopino RNA $\sim 2,0$. Razmerje A_{260}/A_{230} pa nam poda oceno kontaminacije vzorca z reagenti in je za čisto raztopino med 1,8 in 2,2 (61).

Vpliv ozadja smo izničili z merjenjem absorbance slepe raztopine. Mi smo za slepo raztopino uporabili vodo brez nukleaz. Za nadaljnje delo smo vzorce redčili z vodo brez nukleaz na koncentracijo 30 ng/ μL .

3.6.3 Obratno prepisovanje

Izolirano RNA smo prepisali v komplementarno cDNA. DNA je bolj stabilna in jo lahko uporabimo za PCR v realnem času, s katerim lahko kvantificiramo izražanje posameznega gena (62).

Za obratno prepisovanje smo uporabili reagente iz kompleta "High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit". Delo je potekalo v čisti komori RNA, ki smo jo predhodno očistili s 3-% hipokloritom in jo izpostavili UV-svetlobi za 15 min. Mešanico reagentov za obratno prepisovanje smo pripravili, kot je prikazano v Preglednici X.

Preglednica X: Sestava mešanice reagentov za obraten prepis 1 vzorca.

Komponenta	Volumen za 1 reakcijo (μL)
pufer reverzne transkriptaze	2
raztopina dNTP-jev (deoksiribonukleotid trifosfatov)	0,8
naključni oligonukleotidni začetniki	2
reverzna transkriptaza (Multiscribe™)	1
inhibitor RNAz	1
destilirana voda brez nukleaz	3,2

V epico smo odpipetirali 10 μL vzorca in dodali 10 μL mešanice reagentov, vse skupaj smo narahlo premešali s pipeto in centrifugirali 1 minuto pri 600 rpm. Epice smo nato inkubirali v cikličnem termostatu peqSTAR, in sicer pri pogojih, ki jih prikazuje Preglednica XI. Po končanem prepisu smo nastale vzorce cDNA shranili v zamrzovalnik na -20°C.

Preglednica XI: Pogoji reakcije prepisa RNA v cDNA.

Faza	Temperatura (°C)	Čas
prileganje	25	10 min
prepisovanje	37	120 min
prekinitvev reakcije	85	5 min
ohlajanje	4	∞

3.6.4 Kvantitativni PCR v realnem času (qPCR)

Obratno prepisovanje v kombinaciji s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo (qPCR) omogoča natančno, visoko občutljivo in hitro določanje izražanja genov. Zato je danes to najpogostejša metoda za določanje ekspresije (63). Postopek lahko izvedemo v enem koraku ali pa v dveh, kot smo naredili mi, da smo najprej prepisali RNA v cDNA in nato izvedli qPCR (64). Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je metoda specifičnega pomnoževanja določenega odseka DNK. Kvantitativni PCR predstavlja nadgradnjo klasične metode PCR, ki omogoča sprotno spremljanje koncentracije produkta PCR v vsakem ciklu. To omogoča enostavnejšo in natančnejšo določitev začetnega števila kopij specifičnega nukleotidnega zaporedja v vzorcu. Sprotno merjenje količine produkta PCR temelji na merjenju fluorescence po vsakem ciklu pomnoževanja (65). Obstajajo specifične in nespecifične metode detekcije količine nastale DNA. Pri specifičnih metodah se uporabljajo fluorescenčno označene sonde, ki se specifično prilegajo preiskovanemu

zaporedju. Pogosteje se uporabljajo nespecifične metode detekcije, kjer se barvila nespecifično vgradijo v nastajajočo dvoverižno DNA. Po vezavi se ojača njihova fluorescenca in tako lahko kvantificiramo količino novonastale DNA. Mi smo uporabili barvili SYBRGreenER® (del mešanice SYBR® Select MM) in EvaGreen®, ki se obe nespecifično vgradita v dvoverižno DNA (65, 66).

Postopek izvedbe qPCR

Najprej smo pripravili standarde. V sterilno epico smo dodali 5 µL vsakega preiskovanega vzorca, da smo pripravili zbir (angl. *pool*) vzorcev. Zbir smo nato razredčili na koncentracijo 10 ng/µL. Nato smo s serijskim redčenjem na polovico pripravili 10 standardov s koncentracijami od 10 ng/µl do 0,0195 ng/µl.

Za določanje izražanja vsakega gena smo pripravili mešanico reagentov, kot je prikazano v Preglednici XII.

Preglednica XII: Sestava reakcijske zmesi za PCR analizo za 1 reakcijo.

RPLP0		GUSB	
Komponenta	Volumen (µL)	Komponenta	Volumen (µL)
SYBR® Select MM	5	SYBR® Select MM	5
F primer (20 µM) TCTACAACCCTGAAGTAAGTGCTTGAT	0,05	F primer (20 µM) GGCTCCGAATCACTATCGCC	0,05
R primer (20 µM) GAATCTGCAGACAGACACTGG	0,05	R primer (20 µM) CCTGGGATACTGGAGGTGT	0,05
ultra čista voda	1,9	ultra čista voda	1,9
LMP7 (β5i)		PSMB5 (β5c)	
Komponenta	Volumen (µL)	Komponenta	Volumen (µL)
SYBR® Select MM	5	EvaGreen® MM	2
F primer (20 µM) ACCACACTCGCCTTCAAGTTC	0,1	F primer (20 µM) GTGAATCAGCACGGGTTTT	0,2
R primer (20 µM) GCCAAGCAGTAAGGGTTAATC	0,1	R primer (20 µM) AATCCGGTGCAACAATGACT	0,2
ultra čista voda	1,8	ultra čista voda	4,6

V Preglednici XII so prikazani volumni za 1 reakcijo. Izračunali smo, koliko PCR reakcij bomo izvedli (2 x (število analiziranih standardov + število vzorcev)) za posamezni gen. Nato smo pripravili mešanico reagentov za vse reakcije za posamezni gen v eni epici. V sterilne 384-jamične plošče (PCR ploščice Lightcycler® microwell 480) smo v vsako vdolbinico odpipetirali 7 µl mešanice reagentov in 3 µl vzorčne cDNA s koncentracijo 1,25 ng/µl oz. 3 µl standardnih raztopin. Vsako reakcijo smo izvedli v dvojniku.

Ko smo dodali mešanico reagentov in vzorce oz. standardne raztopine v vse vdolbinice, smo ploščo prekrili s samolepilno folijo in jo centrifugirali 3 minute pri 1900 rpm. Nato smo ploščo vstavili v aparat LightCycler® 480 System in zagnali program za analizo izražanja določenega gena. Po vsaki končani reakciji je bil izveden talilni protokol, kjer smo ob prisotnosti krivulj z istim vrhom lahko potrdili, da je nastal le en produkt. Programa izvedbe analiz sta predstavljena v Preglednici XIII in XIV.

Preglednica XIII: Program izvedbe kvantitativne PCR analize s SYBR® Select MM (izražanje genov RPLP0, GUSB, LMP7).

Faza	Temperatura (°C)	Čas	Število ciklov
začetna denaturacija	50	2 min	
aktivacija polimeraze	95	2 min	
denaturacija	95	15 sek	45
prileganje/podaljševanje	60	1 min	

Preglednica XIV: Program izvedbe kvantitativne PCR analize z EvaGreen® MM (izražanje gena PSMB5).

Faza	Temperatura (°C)	Čas	Število ciklov
začetna denaturacija	95	15 min	
denaturacija	95	15 sek	45
prileganje	58	20 sek	
podaljševanje	72	20 sek	

3.6.5 Standardizacija na referenčni gen

Rezultate izražanja genov smo normalizirali na izražanje referenčnih genov. Referenčni geni (angl. *housekeeping genes*) so geni, za katere je značilno konstantno izražanje v vseh preučevanih celicah in jih lahko uporabimo kot interni standard. Normalizacija na referenčne gene nam omogoča kvantifikacijo izražanja preiskovanih genov. Tako lahko izničimo razlike, ki so posledica različne začetne količine cDNA ali drugih različnih pogojev med posameznimi poskusi (65, 67).

V naših poskusih smo za relativno določitev izražanja genov uporabili referenčna gena *RPLP0* in *GUSB*. Rezultate izražanja genov *LMP7* in *PSMB5* smo normalizirali tako, da smo dobljene vrednosti delili z geometrijsko sredino izražanja genov *RPLP0* in *GUSB*.

3.7 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Podatke smo statistično ovrednotili s programoma Excel in GraphPad Prism. Pred

izvajanjem statističnih testov smo preverili, če se numerične spremenljivke (vrednosti EC_{50} , ekspresija genov) porazdeljujejo normalno. To smo testirali s testoma Shapiro-Wilk in D'Agostino-Pearson. Na osnovi rezultata testov normalnosti, velikosti vzorca in odvisnosti spremenljivk smo izbrali ustrezen test. Časovno odvisnost in razlike v ekspresiji genov smo testirali s parnim t-testom, selektivnost pa z Mann-Whitney U testom. Za analize korelacije smo vzorce, ki se niso porazdeljevali normalno, pretvorili v logaritmične ali obratne vrednosti in ponovno preverili normalnost porazdeljevanja. Recipročna transformacija je bila potrebna pri vrednostih vsote izražanja podenot $\beta 5c$ in $\beta 5i$. S spremenljivkami, ki so se porazdeljevale normalno, smo nato izvedli analizo korelacije. Kot statistično značilne rezultate smo privzeli tiste, kjer je bila vrednost $p < 0,05$.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 IN VITRO VREDNOTENJE INHIBITORJA IMUNOPROTEASOMA ONX-0914

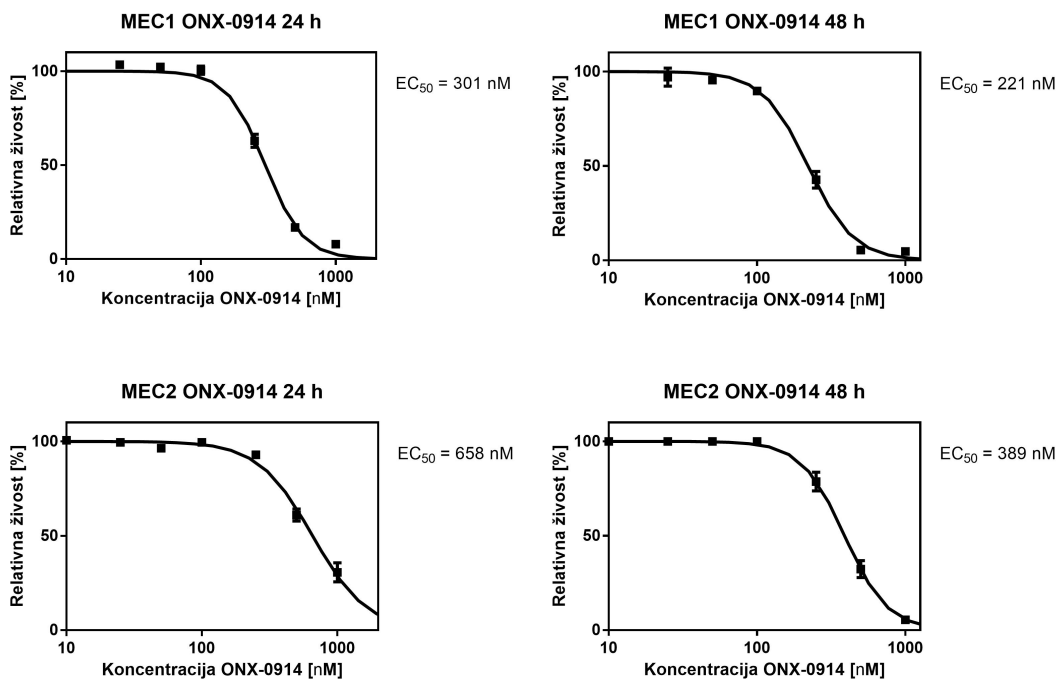
Za zdravljenje KLL obstaja mnogo različnih terapij, vendar nobena ne vodi v trajno ozdravitev. Mediana preživetja brez napredovanja bolezni po shemi FCR, ki je trenutno standardna terapija KLL, je 6–7 let. Mnogo bolnikov zaradi starosti, slabega fizičnega stanja, pridruženih bolezenskih stanj ali neugodnih citogenetskih faktorjev (delecija 17p, nemutirani geni IGHV) ni primernih za zdravljenje s terapijo FCR. Z razvojem novih tarčnih učinkovin so se v zadnjih letih izboljšale možnosti za zdravljenje na druge načine. Tako standardna terapija kot novejšje oblike terapije pa so ob dolgotrajni uporabi pogosto povezane s hudimi stranskimi učinki, ki lahko celo onemogočijo nadaljevanje zdravljenja (68). Ena izmed novejših tarčnih učinkovin je ibrutinib (69). Ibrutinib se zaradi učinkovitega delovanja danes pogosto predpisuje za zdravljenje KLL. Kljub temu pa je v kliničnih študijah 4–10 % bolnikov moralo prekiniti z zdravljenjem z ibrutinibom zaradi pojava hudih neželenih učinkov. Najpogostejši vzroki za prekinitve zdravljenja so bili pljučnica, krvavitve, atrijska fibrilacija, izpuščaji in nevtropenija (70). Poleg pogostih neželenih učinkov se ob dolgotrajnem zdravljenju KLL lahko razvije tudi neodzivnost na terapijo. Zaradi vseh naštetih razlogov je nesporno, da so potrebne nove učinkovine za zdravljenje KLL, ki bi bile varnejše in učinkovitejše.

V predhodnih študijah so ugotovili, da inhibitorja proteasoma bortezomib in karfilzomib *in vitro* delujeta citotoksično na celice KLL (5,38). Pri malignih obolenjih limfocitov B so izmerili povečano izražanje imunoproteasomskih podenot v primerjavi z izražanjem konstitutivnih podenot proteasoma (28). Predvidevali smo, da bi imunoproteasom tako lahko predstavljal dobro tarčo za zdravljenje malignih obolenj limfocitov B, kot je na primer KLL. Z namenom iskanja novih terapij smo ovrednotili *in vitro* citotoksično delovanje inhibitorja imunoproteasoma ONX-0914 na celice KLL.

4.1.1 Inhibitor imunoproteasoma ONX-0914 izraža koncentracijsko in časovno odvisno delovanje na celični liniji MEC1 in MEC2

Do sedaj ni znanih študij o delovanju inhibitorja imunoproteasoma ONX-0914 na celice KLL. Zanimalo nas je, ali ONX-0914 deluje citotoksično na celice KLL in v kakšnem koncentracijskem območju je ta učinek dosežen. Najprej smo določili EC_{50} na celičnih linijah MEC1 in MEC2, ki sta celični liniji, ki izvirata iz celic KLL. Obe celični liniji izvirata iz levkemičnih celic istega bolnika v dveh različnih stadijih napredovanja bolezni. Celice MEC1 so izolirali iz polne krvi bolnika s KLL v zgodnji prolimfocitni fazi, pred pojavom agresivne klinične faze. Celična linija MEC2 izvira iz celic v diseminirani fazi bolezni, eno leto po nastanku celične linije MEC1. Takrat je bolnik že prešel v prolimfocitno obliko bolezni ter imel znatno povišano število limfocitov v krvi, kar pomeni nastanek agresivne in težko ozdravljive bolezni. Celični liniji MEC1 in MEC2 sta nastali *in vitro* s spontanim razrastom limfocitov B v prolimfocitni transformaciji, ki so bili predhodno okuženi z virusom Epstein-Barr. Celični liniji izvirata iz celic, ki niso bile tipične celice KLL, kljub temu pa predstavljata dobra *in vitro* modela za raziskovanje celičnih mehanizmov pri KLL (71, 72).

Za oceno citotoksičnega delovanja smo določili vrednosti EC_{50} . Vrednost EC_{50} ali srednja efektivna koncentracija je koncentracija učinkovine, pri kateri je dosežen učinek enak 50 % maksimalnega učinka (73). V našem primeru je bila to koncentracija učinkovine, pri kateri je bila metabolna aktivnost celic zmanjšana za 50 %. Celice smo tretirali z naraščajočimi koncentracijami ONX-0914. Po 24 in 48 urah inkubacije smo pomerili metabolno aktivnost celic s testom MTS in določili vrednosti EC_{50} . ONX-0914 je na obe celični liniji deloval citotoksično v nanomolarnih koncentracijah (Slika 12). Vrednost EC_{50} za celično linijo MEC1 je bila 301 nM po 24 urah in 221 nM po 48 urah. Celična linija MEC2 je bila manj občutljiva na ONX-0914, vrednosti EC_{50} sta bili 658 nM po 24 urah in 389 nM po 48 urah. To je v skladu z dejstvom, da celice MEC2 predstavljajo model za napredovano obliko bolezni, ki je bolj agresivna in slabše odzivna na terapijo (72). Kot vidimo z grafov na Sliki 12 so bili citotoksični učinki ONX-0914 na celični liniji MEC1 in MEC2 koncentracijsko in časovno odvisni. Ti dve lastnosti sta zaželjeni z vidika terapije, saj omogočata predvidevanje terapevtskega odmerka in učinka zdravila.



Slika 12: Citotoksično delovanje inhibitorja imunoproteasoma ONX-0914 na celični liniji MEC1 in MEC2.

Celice MEC1 in MEC2 smo tretirali z naraščajočimi koncentracijami ONX-0914 (10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM). Presnovno aktivnost celic smo določili s testom MTS po 24 in 48 urah. Rezultat smo normirali na kontrolo (0,1 % DMSO v RPMI mediju). Poskus smo izvedli v trojniku. Vrednosti EC₅₀ smo izračunali s programom GraphPad Prism na podlagi meritev vsaj dveh bioloških ponovitev.

Dosedanje študije o delovanju ONX-0914 pri hematoloških malignih obolenjih niso številne. Niewerth in sodelavci so *in vitro* dokazali citotoksično delovanje ONX-0914 na celice akutne limfoblastne levkemije (ALL) in celice akutne mieloblastne levkemije (AML) (74). V drugi raziskavi so ovrednotili delovanje ONX-0914 na celične linije diseminiranega plazmocitoma (8226), T-celične levkemije (CCRF-CEM) in mieloične levkemije (THP1) (28). Mulder in sodelavci pa so ugotovili, da ONX-0914 *in vitro* inhibira proliferacijo aktiviranih limfocitov B (75). Naša študija je bila prva, ki je ovrednotila citotoksične učinke ONX-0914 na celičnih linijah MEC1 in MEC2.

4.1.2 Inhibitorja proteasoma bortezomib in karfilzomib delujeta citotoksično na celični liniji MEC1 in MEC2 v nižjih koncentracijah kot ONX-0914

Z namenom ovrednotenja imunoproteasoma kot potencialne tarče v celicah KLL nas je zanimalo, ali ima inhibicija imunoproteasoma v primerjavi z inhibicijo proteasoma manj

ali bolj citotoksične učinke na celice KLL. Zato smo primejali citotoksično delovanje ONX-0914 s citotoksičnim delovanjem inhibitorjev proteasoma bortezomibom in karfilzomibom. Najprej smo citotoksičnost bortezomiba in karfilzomiba določili na celičnih linijah MEC1 in MEC2. Celice smo tretirali z naraščajočimi koncentracijami bortezomiba in naraščajočimi koncentracijami karfilzomiba. Po 24 in 48 urah inkubacije celic z učinkovino smo pomerili metabolno aktivnost s testom MTS in s programom GraphPad Prism izračunali vrednosti EC_{50} . Vrednosti EC_{50} so prikazane v Preglednici XV.

Preglednica XV: Vrednosti EC_{50} 24 in 48 ur po inkubaciji celic MEC1 in MEC2 z bortezomibom in karfilzomibom.

celična linija	MEC1				MEC2			
	bortezomib [nM]		karfilzomib [nM]		bortezomib [nM]		karfilzomib [nM]	
spojina	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
EC_{50}	15	11	7	5	47	20	36	17
	14	9	7	4	46	20	35	15
povprečje	14	10	7	4	47	20	35	16
relSTD %	8	9	6	12	2	0	1	7

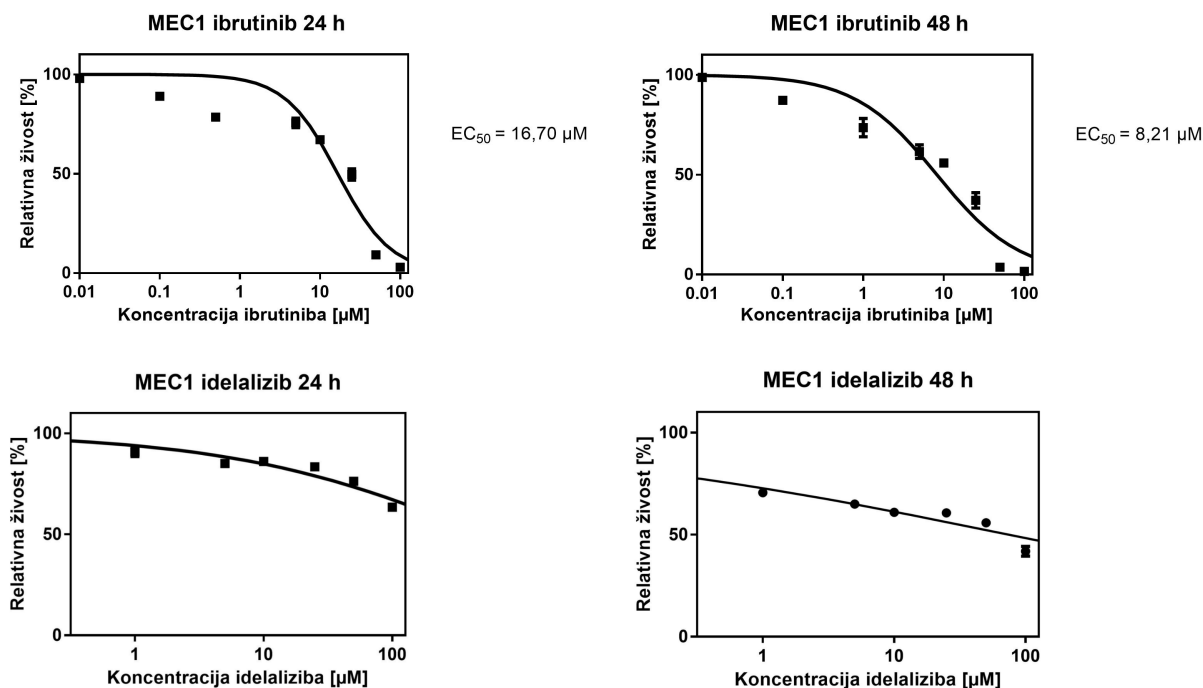
Ugotovili smo, da imata bortezomib in karfilzomib v primerjavi z ONX-0914 znatno višje citotoksično delovanje na celični liniji MEC1 in MEC2. Po 24 urah je bila vrednost EC_{50} na celicah MEC1 ~ 20-krat manjša za bortezomib in ~ 45-krat manjša za karfilzomib kot za ONX-0914.

4.1.3 Ibrutinib deluje citotoksično v mikromolarnih koncentracijah, idelalizib pa ima nizko citotoksično delovanje na celično linijo MEC1

V nadaljevanju nas je zanimala primerjava citotoksičnosti ONX-0914 na celicah KLL v primerjavi s citotoksičnostjo ibrutiniba in idelaliziba, ki se uporabljata v terapiji KLL. Ibrutinib in idelalizib sta kinazna inhibitorja, ki sta v Sloveniji registrirana za zdravljenje KLL od leta 2014. Uporabljata se predvsem za zdravljenje bolnikov z mutacijo gena TP53, ki se na druge terapije pogosto slabo odzivajo (16).

Celice MEC1 smo tretirali z naraščajočimi koncentracijami ibrutiniba in idelaliziba. Po 24 in 48 urah smo pomerili metabolno aktivnost celic s testom MTS in določili vrednosti EC_{50} . Na Sliki 13 so prikazani citotoksični učinki ibrutiniba in idelaliziba na celično linijo MEC1. Za doseg citotoksičnih učinkov preiskovanih kinaznih inhibitorjev na celicah

MEC1 so bile potrebne občutno višje koncentracije v primerjavi z ONX-0914. Vrednost EC_{50} za ibrutinib je bila $16,70 \mu\text{M}$ po 24 urah in $8,21 \mu\text{M}$ po 48 urah. Na idelalizib so bile celice MEC1 manj občutljive. Pri inkubaciji z idelalizibom s koncentracijo $10 \mu\text{M}$ je bilo metabolno aktivnih $86,1 \%$ celic po 24 urah in $60,9 \%$ celic po 48 urah. Pri inkubaciji z idelalizibom s koncentracijo $100 \mu\text{M}$ je bilo metabolno aktivnih $63,4 \%$ celic po 24 urah in $44,6 \%$ celic po 48 urah.



Slika 13: Citotoksično delovanje ibrutiniba in idelaliziba na celično linijo MEC1.

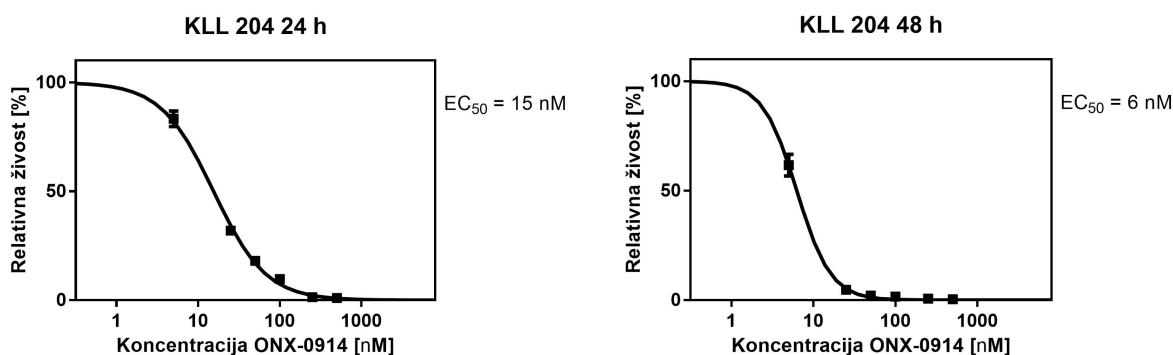
Celice MEC1 smo tretirali z naraščajočimi koncentracijami ($0,01 \mu\text{M}$, $0,1 \mu\text{M}$, $0,25 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $25 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$) ibrutiniba in idelaliziba. Presnovno aktivnost celic smo določili s testom MTS po 24 in 48 urah. Rezultat smo normirali na kontrolo ($0,1 \%$ DMSO v RPMI mediju). Poskusa smo izvedli v trojniku. Vrednosti EC_{50} smo izračunali s programom GraphPad Prism na podlagi meritev treh bioloških ponovitev.

Naši rezultati so skladni s predhodnimi raziskavami na celični liniji MEC1, kjer je bila EC_{50} za ibrutinib po 72 urah $3 \mu\text{M}$ in kjer je inkubacija celic z $10 \mu\text{M}$ idelalizibom po 24 urah sprožila smrt 20% celic (76). Glede na to, da sta idelalizib in ibrutinib učinkovini za zdravljenje KLL, ki se redno uporabljata v terapiji, so nižje vrednosti EC_{50} obetavne za nadaljnje raziskovanje ONX-0914 na celicah KLL.

4.1.4 Inhibitor imunoproteasoma ONX-0914 deluje citotoksično v nanomolarnih koncentracijah na primarne celice KLL

Ugotovili smo, da ONX-0914 deluje citotoksično na celični liniji MEC1 in MEC2, zato smo nadaljevali z raziskavami na primarnih celicah KLL. Izvedli smo preliminarno študijo na vzorcih celic, izoliranih iz polne krvi 8 bolnikov z diagnozo KLL. Celice smo tretirali z ONX-0914 ter po 24 in 48 urah inkubacije pomerili metabolno aktivnost s testom PrestoBlue. Ugotovili smo, da je ONX-0914 deloval citotoksično na celice vseh preiskovanih bolnikov. Citotoksični učinki so bili doseženi v nanomolarnih koncentracijah, povprečne vrednosti EC_{50} po 24 urah je bilo 22 nM (razpon od 5 nM do 49 nM), po 48 urah pa 9 nM (razpon od 1 nM do 19 nM).

Celice smo tretirali z naraščajočimi koncentracijami ONX-0914. Z višanjem koncentracij ONX-0914 je citotoksični učinek naraščal, iz česar lahko sklepamo, da je delovanje ONX-0914 koncentracijsko odvisno. Na Sliki 14 je predstavljen reprezentativen graf za vzorec KLL, kjer lahko opazimo zmanjševanje relativne živosti v odvisnosti od koncentracije ONX-0914. Ostali grafi so priloženi v Prilogi 1.

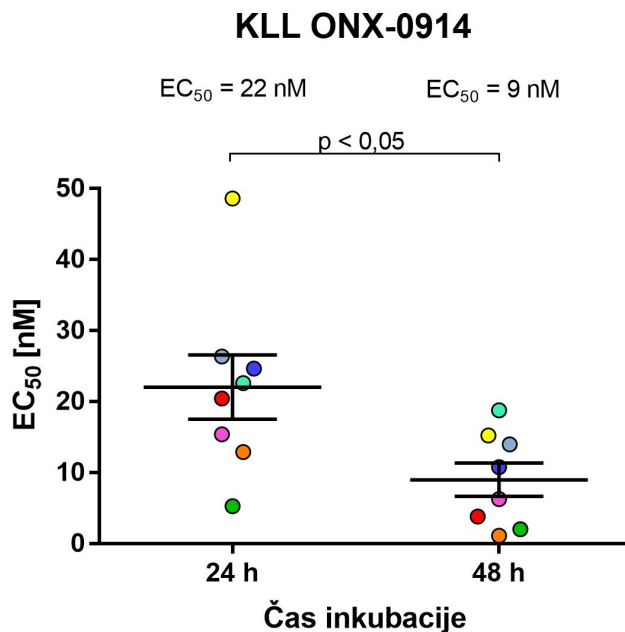


Slika 14: Koncentracijsko odvisno delovanje ONX-0914 na primarne celice KLL.

Izolirane celice KLL smo tretirali z naraščajočimi koncentracijami ONX-0914 (5 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM). Presnovno aktivnost celic smo določili s testom PrestoBlue po 24 in 48 urah. Rezultat smo normirali na kontrolo (0,1 % DMSO v RPMI mediju) in izračunali relativno živost.

Nadalje smo opazili, da je metabolna aktivnost celic KLL upadala s časom inkubacije celic z ONX-0914. Vrednost EC_{50} po 48 urah je bila nižja od EC_{50} po 24 urah pri vseh 8 vzorcih, v povprečju se je znižala za 60 % (Slika 15). Razlika med EC_{50} po 24 in 48 urah je

bila statistično značilna ($p = 0,0059$), kar dokazuje, da ima ONX-0914 na celice KLL časovno odvisno delovanje.



Slika 15: Vrednosti EC_{50} celic bolnikov po 24 in 48 urah inkubacije z ONX-0914.

Primarne celice, izolirane iz krvi 8 bolnikov s KLL, smo tretirali z ONX-0914. Po 24 in 48 urah inkubacije z učinkovino smo izmerili njihovo metabolno aktivnost in s programom GraphPad Prism izračunali EC_{50} . Na grafu so predstavljene vrednosti EC_{50} po 24 in 48 urah, ena barva predstavlja en vzorec primarnih celic KLL.

Med posameznimi vzorci so bile opazne velike interindividualne razlike v odzivu na ONX-0914 (Preglednica XVI). Variabilen odziv celic različnih bolnikov je v skladu z dejstvom, da je KLL zelo heterogena bolezen z različnimi vzroki in poteki bolezni (77). V predhodnih študijah so opazili heterogene odzive celic KLL tudi na delovanje inhibitorjev proteasoma (5,38). Kelley in sodelavci so predlagali, da je heterogenost odzivov posledica različno spremenjenih signalnih poti med različnimi klonskimi populacijami celic KLL (5), kar bi lahko bil tudi vzrok za interindividualne razlike v odzivu na ONX-0914. Lamothe in sodelavci so raziskovali vzroke za različno odzivnost celic KLL na karfilzomib (38). Identificirali so biološki označevalec, z določevanjem katerega bi lahko predvideli občutljivost celic na karfilzomib. To je transkripcijski faktor CHOP, ki ob manjšem izražanju korelira z manjšo občutljivostjo celic KLL na karfilzomib. Da bi razumeli variabilnost v odzivu celic KLL na ONX-0914, bi bile potrebne podrobnejše raziskave mehanizma citotoksičnega delovanja ONX-0914 na celice KLL.

Preglednica XVI: Vrednosti EC_{50} 24 in 48 ur po inkubaciji celic KLL z ONX-0914, bortezomibom in karfilzomibom.

št. vzorca KLL	24 h			48 h		
	ONX-0914 [nM]	bortezomib [nM]	karfilzomib [nM]	ONX-0914 [nM]	bortezomib [nM]	karfilzomib [nM]
204	15	7	4	6	3	2
207	25	1	1	11	2	1
210	13	5	3	1	2	0
219	26	18	4	14	9	1
246	23	8	6	19	6	3
247	49	nd*	nd*	15	nd*	nd*
248	20	15	4	4	4	1
249	5	0**	0**	2	0**	0**
povprečje	22	8	3	9	4	1
relSTD %	58	86	63	74	79	91
mediana	22	7	4	9	3	1

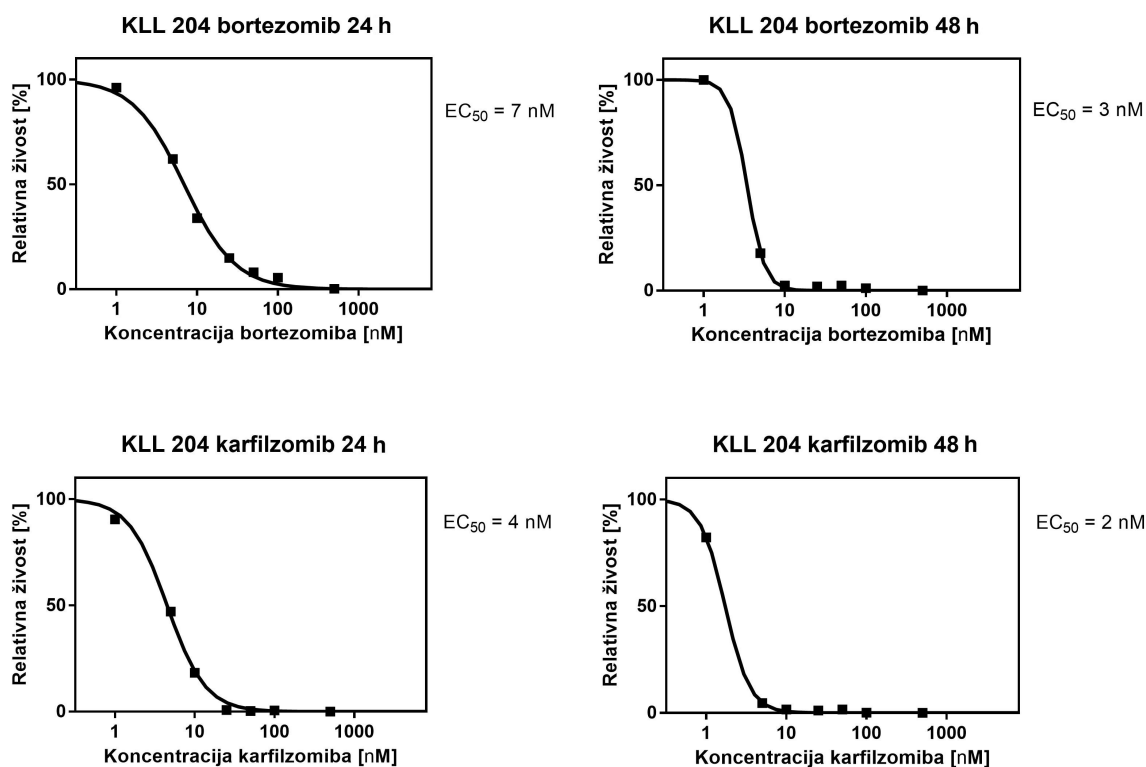
nd* – ni določeno, 0** – določena vrednost EC_{50} je bila manjša od 0,5 nM

4.1.5 Inhibitorja proteasoma bortezomib in karfilzomib delujeta inhibitorno na primarne celice KLL v nižjih koncentracijah kot ONX-0914

Na celičnih linijah MEC1 in MEC2 sta inhibitorja proteasoma bortezomib in karfilzomib dosegla citotoksične učinke pri znatno nižjih koncentracijah kot ONX-0914. Celične linije predstavljajo dober model, ne morejo pa nadomestiti rezultatov, pridobljenih na primarnih celicah. Zato nas je nadalje zanimala primerjava citotoksičnega delovanja ONX-0914 s citotoksičnim delovanjem bortezomiba in karfilzomiba na primarnih celicah KLL.

Primarne celice istih bolnikov s KLL, kot smo jih uporabili za določitev citotoksičnosti ONX-0914, smo tretirali z bortezomibom in karfilzomibom. Po 24 in 48 urah inkubacije smo določili njihovo metabolno aktivnost s testom PrestoBlue in izračunali vrednosti EC_{50} . Obe učinkovini sta delovali citotoksično na celice KLL v nanomolarnem območju. Povprečje vrednosti EC_{50} za bortezomib je bilo $8 \text{ nM} \pm 7 \text{ nM}$ po 24 urah in $4 \text{ nM} \pm 3 \text{ nM}$ po 48 urah. Povprečje vrednosti EC_{50} za karfilzomib je bilo $3 \text{ nM} \pm 2 \text{ nM}$ po 24 urah in $1 \text{ nM} \pm 1 \text{ nM}$ po 48 urah. Opazili smo, da so bili citotoksični učinki bortezomiba in karfilzomiba na primarne celice KLL koncentracijsko in časovno odvisni. Na Sliki 16 so prikazani reprezentativni grafi relativne živosti celic KLL v odvisnosti od koncentracije

bortezomiba in karfilzomiba po 24 in 48 urah. Ostali grafi so priloženi v Prilogi 2 in Prilogi 3.



Slika 16: Časovno in koncentracijsko odvisno delovanje bortezomiba in karfilzomiba na primarne celice KLL.

Izolirane celice KLL smo tretirali z naraščajočimi koncentracijami (1 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM) bortezomiba in karfilzomiba. S testom PrestoBlue smo po 24 urah merili metabolno aktivnost. Fluorescenco smo normirali na kontrolo (0,1 % DMSO v RPMI mediju) in izračunali relativno živost. Poskus smo izvedli v trojniku.

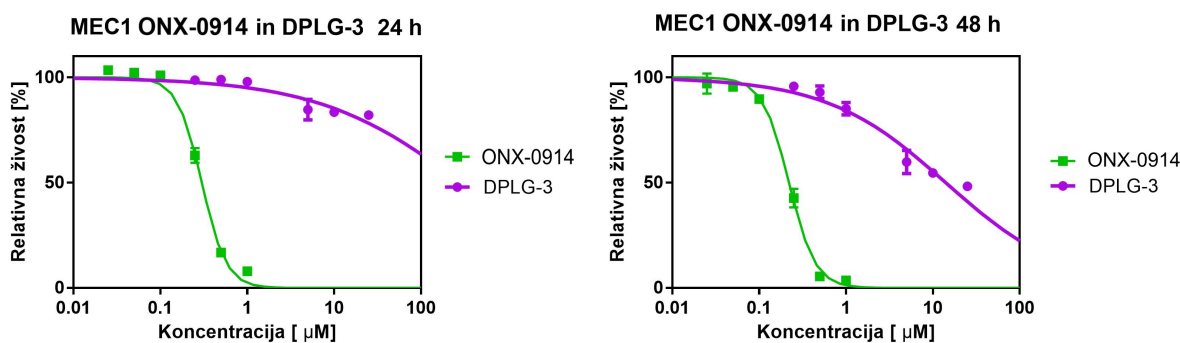
Med posameznimi vzorci so bile opazne velike interindividualne razlike v odzivnosti na bortezomib in na karfilzomib, kar je skladno z rezultati predhodnih raziskav (5,38). Opazili smo trend, da je bila večina primarnih celic, ki so bile manj občutljive na ONX-0914, manj občutljiva tudi na bortezomib in karfilzomib ter obratno. Za ugotavljanje zanesljivejših korelacij med učinki različnih (imuno)proteasomskih inhibitorjev bi bile potrebne raziskave na večjem številu vzorcev. Naše opažanje podpira možnost, da so za občutljivost na različne inhibitorje (imuno)proteasoma odgovorni podobni dejavniki.

Oba inhibitorja proteasoma sta delovala citotoksično na celice KLL v nižjih koncentracijah kot ONX-0914 (Preglednica XVI), vendar so bile razlike v vrednostih EC_{50} občutno manjše kot na celičnih linijah MEC. Na primarnih celicah KLL so bile vrednosti EC_{50} za bortezomib ~ 3-krat nižje, za karfilzomib pa ~ 8-krat nižje kot za ONX-0914. Glede na dejstvo, da je v celicah KLL izražanje imunoproteasoma višje od izražanja proteasoma, bi pričakovali nižje vrednosti EC_{50} za inhibitor imunoproteasoma ONX-0914 v primerjavi z bortezomibom in karfilzomibom, ki sta inhibitorja proteasoma. Naši rezultati so v skladu s predhodnimi študijami Niewertha in sodelavcev na celicah bolnikov z ALL in AML. Ugotovili so, da je bilo v celicah ALL in AML izražanje imunoproteasomskih podenot višje v primerjavi z izražanjem proteasomskih podenot, hkrati pa je imel ONX-0914 višje EC_{50} v primerjavi z bortezomibom in karfilzomibom (74). Parlati in sodelavci so ugotovili, da je za citotoksično delovanje inhibitorjev proteasoma na rakavih krvnih celicah potrebna hkratna inhibicija proteasomskih in imunoproteasomskih podenot (78). Ugotovili so, da je za citotoksično delovanje ključnega pomena inhibicija podenot $\beta 5c$ in $\beta 5i$, ki imata kimotripsinu podobno delovanje (KP-delovanje). To bi lahko bil možen vzrok tudi za višje vrednosti EC_{50} ONX-0914 v primerjavi z bortezomibom in karfilzomibom na celicah KLL. Bortezomib ima primerljivo delovanje na podenoti $\beta 5c$ in $\beta 5i$, karfilzomib ima ~ 5-krat močnejše delovanje na konstitutivno podenoto $\beta 5c$, ONX-0914 pa ima ~ 10-krat močnejše delovanje na podenoto $\beta 5i$ (20).

Razlike v potrebnih koncentracijah (imuno)proteasomskih inhibitorjev za delovanje na celicah KLL bi lahko izvirale tudi iz razlik v akumulaciji učinkovin znotraj tarčnih celic. Zato bi bilo smiselno določiti permeabilnost celične membrane in vlogo celičnih transporterjev pri vstopu in izstopu ONX-0914 v celice KLL in te primerjati z lastnostmi bortezomiba in karfilzomiba. Čeprav so bile za citotoksično delovanje ONX-0914 na celicah KLL potrebne višje koncentracije kot za bortezomib in karfilzomib, pa so bili njegovi citotoksični učinki še vedno doseženi v nanomolarnih koncentracijah.

4.1.6 Visoko selektiven inhibitor imunoproteasomske podenote $\beta 5i$, DPLG-3, je manj citotoksičen v primerjavi z ONX-0914

Ugotovili smo, da imata bortezomib in karfilzomib, ki imata manj selektivno delovanje za določeno (imuno)proteasomsko podenoto, bolj citotoksično delovanje na celice KLL v primerjavi z ONX-0914. Nadalje nas je zanimalo, ali je zgolj selektivno zaviranje podenote $\beta 5i$ zadostno za doseg citotoksičnega učinka. S tem namenom smo primerjali citotoksične učinke ONX-0914 in visoko selektivnega inhibitorja imunoproteasomske podenote $\beta 5i$, DPLG-3, ki je več kot 7000-krat bolj selektiven za podenoto $\beta 5i$ v primerjavi s podenoto $\beta 5c$ (44). Celice MEC1 smo tretirali z naraščajočimi koncentracijami DPLG-3. Po 24 in 48 urah inkubacije celic z učinkovino smo pomerili metabolno aktivnost celic s testom MTS. Kot je razvidno s Slike 17, je imel DPLG-3 znatno nižje citotoksične učinke na celice MEC1 v primerjavi z ONX-0914. Pri inkubaciji z DPLG-3 s koncentracijo $0,5 \mu\text{M}$ je bilo metabolno aktivnih 99,9 % celic po 24 urah in 92,9 % celic po 48 urah, medtem ko je bilo pri inkubaciji z ONX-0914 z isto koncentracijo po 24 urah metabolno aktivnih le 16,8 % in po 48 urah 5,5 % celic. Citotoksičen učinek DPLG-3 je naraščal s časom in višanjem koncentracije. Kljub temu pa je bilo pri najvišji koncentraciji DPLG-3, s katero smo tretirali celice ($25 \mu\text{M}$), po 24 urah metabolno aktivnih 82,1 % celic in po 48 urah 48,3 % celic.



Slika 17: Primerjava citotoksičnih učinkov DPLG-3 in ONX-0914 na celično linijo MEC1.

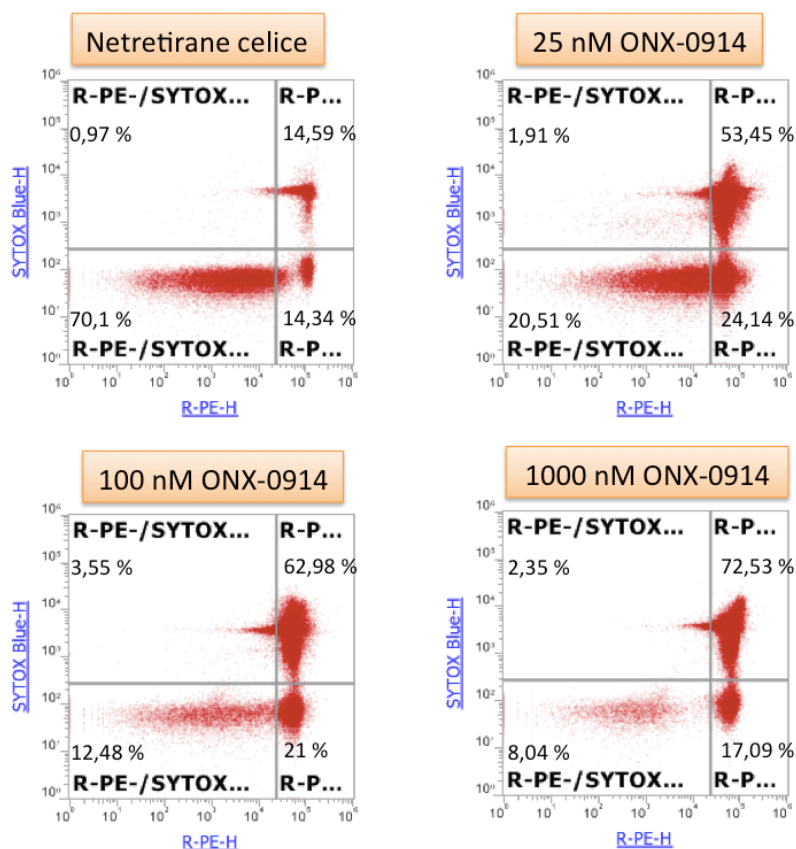
Celice MEC1 smo tretirali z naraščajočimi koncentracijami DPLG-3 ($0,25 \mu\text{M}$, $0,5 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $25 \mu\text{M}$) in naraščajočimi koncentracijami ONX-0914 ($0,025 \mu\text{M}$, $0,05 \mu\text{M}$, $0,1 \mu\text{M}$, $0,25 \mu\text{M}$, $0,50 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$). Presnovno aktivnost celic smo določili s testom MTS po 24 in 48 urah. Rezultat smo normirali na kontrolo ($0,1 \%$ DMSO v RPMI mediju). Poskus smo izvedli v trojniku.

ONX-0914 je selektiven inhibitor imunoproteasomske podenote $\beta 5i$, kljub temu pa ima, čeprav 10-krat manjše, inhibitorne učinke tudi na konstitutivno podenoto $\beta 5c$. DPLG-3, ki je visoko selektiven inhibitor podenote $\beta 5i$ in ima zanemarljive učinke na ostale podenote, je izkazal izrazito nižje citotoksično delovanje na celice MEC1 v primerjavi z ONX-0914. Ti rezultati podpirajo prej omenjene ugotovitve, da za citotoksične učinke inhibitorjev imunoproteasoma ne zadostuje inhibicija ene podenote, pač pa je potrebno inhibitorno delovanje na proteasomsko in imunoproteasomsko podenoto s KP-delovanjem. Tudi v tem primeru pa bi bilo smiselno preveriti in primerjati akumulacijo DPLG-3 in ONX-0914 v tarčnih celicah, ki bi lahko bili različni zaradi različnega prehajanja celične membrane ali prenosa s celičnimi prenašalci. Različno doseganje tarče bi lahko pripomoglo k različnim vrednostim EC_{50} .

4.1.7 Mehanizem celične smrti celic KLL, povzročene z ONX-0914, je apoptoza

Citotoksično delovanje ONX-0914 na celice KLL smo ocenjevali na podlagi metabolnega testa celične viabilnosti PrestoBlue. Zmanjšanje metabolne aktivnosti je poleg indukcije celične smrti lahko tudi posledica inhibicije proliferacije (76). Zanimalo nas je, če je zmanjšanje metabolne aktivnosti celic KLL zaradi delovanja ONX-0914 posledica citotoksičnega delovanja in če je mehanizem povzročene celične smrti programirana celična smrt ali apoptoza. Pri apoptozi se v okolico mrtvih celic ne izločajo toksične komponente, ki bi lahko sprožile vnetne procese, in zato pri razvoju protirakavih terapij predstavlja željeno obliko celične smrti (79).

Da bi določili delež mrtvih in apoptičnih celic, smo 24 ur po tretiranju z ONX-0914 označili celice z reagentoma R-PE Annexin V in SYTOXTMBlue. R-PE Annexin V je označil apoptične, SYTOXTMBlue pa mrtve celice. Dvojno negativne celice so tako predstavljale žive celice, R-PE Annexin V pozitivne in SYTOXTMBlue negativne celice so predstavljale zgodnje apoptične celice, dvojno pozitivne celice so predstavljale pozno apoptične celice, SYTOXTMBlue pozitivne in R-PE Annexin V negativne celice pa so predstavljale nekrotične celice. Na Sliki 18 lahko opazimo, da je ONX-0914 po 24 urah sprožil koncentracijsko odvisen porast procenta mrtvih celic KLL, kar potrjuje citotoksično delovanje ONX-0914. Hkrati lahko opazimo koncentracijsko odvisen porast apoptičnih celic KLL in lahko trdimo, da je mehanizem celične smrti, povzročene z ONX-0914, apoptoza. V predhodnih študijah so ugotovili, da tudi bortezomib in karfilzomib v celicah KLL sprožita celično smrt preko mehanizmov apoptoze (5,38).



Slika 18: Ovrednotenje mehanizma celične smrti na celicah KLL po 24-urni inkubaciji z ONX-0914.

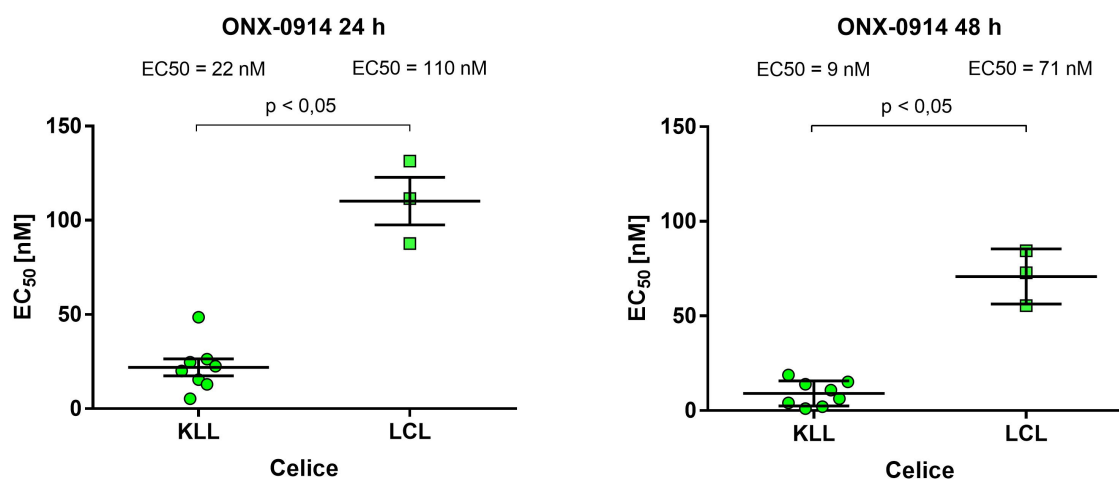
Celice KLL smo tretirali s 25 nM, 100 nM in 1000 nM ONX-0914 ali pa smo pustili netretirane (0,1 % DMSO v RPMI mediju) in jih inkubirali. Po 24 urah smo jih za oceno apoptoze obarvali z reagentoma R-PE Annexin V in SYTOX™Blue in merili fluorescenco na pretočnem citometru. Zgodnje apoptične celice so v desnem spodnjem kvadrantu (R-PE Annexin V +, SYTOX™Blue -), pozno apoptične celice so v desnem zgornjem kvadrantu (R-PE Annexin V +, SYTOX™Blue +).

4.1.8 ONX-0914 deluje selektivno na primarne celice KLL

Z neselektivnim delovanjem učinkovine povečamo pogostost in jakost neželenih učinkov. Zato si pri načrtovanju novih strategij za zdravljenje raka prizadevamo za razvoj učinkovin, ki imajo selektivno delovanje na tarčne celice (80). Za preizkus selektivnosti delovanja inhibitorjev (imuno)proteasoma na celice KLL smo uporabili limfoblastoidne celične linije (LCL). Celice LCL so pridobljene iz limfocitov B z *in vitro* transformacijo z virusom Epstein-Barr (81). Tako nastale celične linije predstavljajo neomejen vir transformiranih celic istega darovalca. Ker celice med transformacijo v veliki meri

ohranijo prvotni DNA-zapis in s tem svoje lastnosti, so dober model za preiskovanje učinkov zdravil na limfocite B (82, 83).

Z namenom ovrednotenja selektivnosti delovanja ONX-0914 na levkemične celice smo določili vrednosti EC_{50} na celičnih linijah LCL po 24 in 48 urah. Uporabili smo celične linije LCL4, LCL9 in LCL1516, ki vse izvirajo iz limfoblastoidnih celic zdravih darovalcev. Celice smo tretirali z naraščajočimi koncentracijami ONX-0914. Po 24 in 48 urah inkubacije celic z učinkovino smo pomerili metabolno aktivnost celic s testom MTS in določili vrednosti EC_{50} . Povprečni vrednosti EC_{50} za ONX-0914 na celicah LCL sta bili 110 nM po 24 urah in 71 nM po 48 urah. Povprečni vrednosti EC_{50} , določeni na primarnih celicah KLL (22 nM po 24 urah, 9 nM po 48 urah), sta bili signifikantno nižji. Razlika v zmanjšanju metabolne aktivnosti celičnih linij LCL in primarnih celic bolnikov s KLL je bila statistično značilna že po 24 urah inkubacije z ONX-0914 ($p_{24h} = 0,0121$). Po 48 urah inkubacije se je statistično značilna razlika ohranila ($p_{48h} = 0,0121$) (Slika 19).



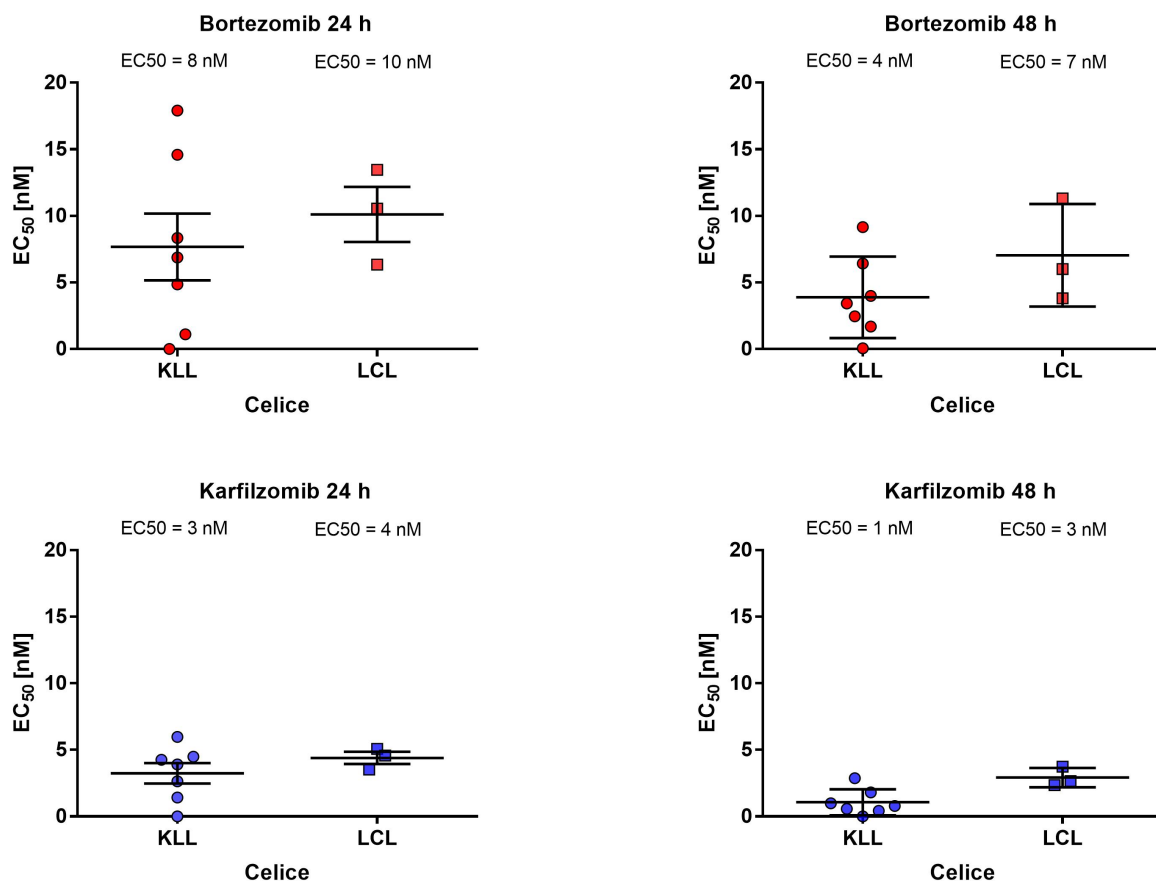
Slika 19: Selektivnost delovanja ONX-0914 na primarne celice KLL.

Celice KLL in LCL smo tretirali z naraščajočimi koncentracijami (5 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM, 5000 nM) ONX-0914. Po 24 in 48 urah smo merili metabolno aktivnost celic s testom PrestoBlue za celice KLL in testom MTS za celice LCL. Rezultat smo normirali na kontrolo (0,1 % DMSO v RPMI mediju). Vrednosti EC_{50} smo izračunali s programom GraphPad Prism. Za analizo selektivnosti smo uporabili neparni *t*-test.

Selektivno citotoksično delovanje ONX-0914 je lahko povezano z različnimi celičnimi mehanizmi, ki so v celicah KLL spremenjeni. Za celice KLL so najbolj značilni

neuravnoteženo izražanje antiapoptičnih proteinov Bcl-2, konstitutivna aktivacija jedrnega transkripcijskega dejavnika kapa B (NF- κ B) in različne funkcije tumor supresorskega proteina p53 (84). Da bi ugotovili natančne vzroke za opaženo selektivno delovanje, bi bile potrebne nadaljnje preiskave mehanizmov citotoksičnega delovanja ONX-0914 v celicah KLL.

Na enak način kot za ONX-0914 smo določili selektivnost citotoksičnega delovanja bortezomiba in karfilzomiba. Povprečna vrednost EC_{50} na celicah LCL za bortezomib je bila 10 nM po 24 urah in 7 nM po 48 urah. Povprečna vrednost EC_{50} na celicah LCL za karfilzomib je bila 4 nM po 24 urah in 3 nM po 48 urah. Vrednosti EC_{50} za celične linije LCL smo s t-testom primerjali z vrednostmi EC_{50} za celice KLL. Razlika v zmanjšanju metabolne aktivnosti celičnih linij LCL in primarnih celic bolnikov s KLL pod vplivom bortezomiba po 24 urah ni bila statistično značilna ($p = 0,6667$), prav tako ne po 48 urah ($p = 0,2667$). Tudi v delovanju karfilzomiba na celice LCL in KLL ni bilo statistično značilne razlike po 24 ($p = 0,3833$) in ne po 48 urah ($p = 0,0667$) (Slika 20).



Slika 20: Primerjava citotoksičnih učinkov bortezomiba in karfilzomiba na celice KLL in LCL.

Celice KLL in LCL smo tretirali z naraščajočimi koncentracijami bortezomiba (0,5 nM, 1 nM, 2,5 nM/5 nM, 5 nM/7,5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM) in karfilzomiba (1 nM, 2,5 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM). Po 24 in 48 urah smo merili metabolno aktivnost s testom PrestoBlue za celice KLL in testom MTS za celice LCL. Rezultat smo normirali na kontrolo (0,1 % DMSO v RPMI mediju). Vrednosti EC_{50} smo izračunali s programom GraphPad Prism. Za analizo selektivnosti smo uporabili neparni t-test.

V predhodni raziskavi, kjer so raziskovali vpliv bortezomiba na periferne mononuklearne celice (PBMC), so ugotovili, da ima bortezomib po 24 urah, že v nizkih koncentracijah, znaten citotoksičen učinek na monocite ($EC_{50} = 2,6 - 26$ nM). V isti raziskavi so ugotovili, da so bile za doseg apoptičnih učinkov v limfocitih T in limfocitih B potrebne koncentracije bortezomiba, višje od 130 nM (85), kar je znatno višje v primerjavi s koncentracijami bortezomiba, ki smo jih mi določili za doseg citotoksičnih učinkov v celicah LCL. Kljub temu so koncentracije, v katerih je bortezomib v omenjeni študiji deloval citotoksično na monocite, primerljive koncentracijam, pri katerih je bortezomib v

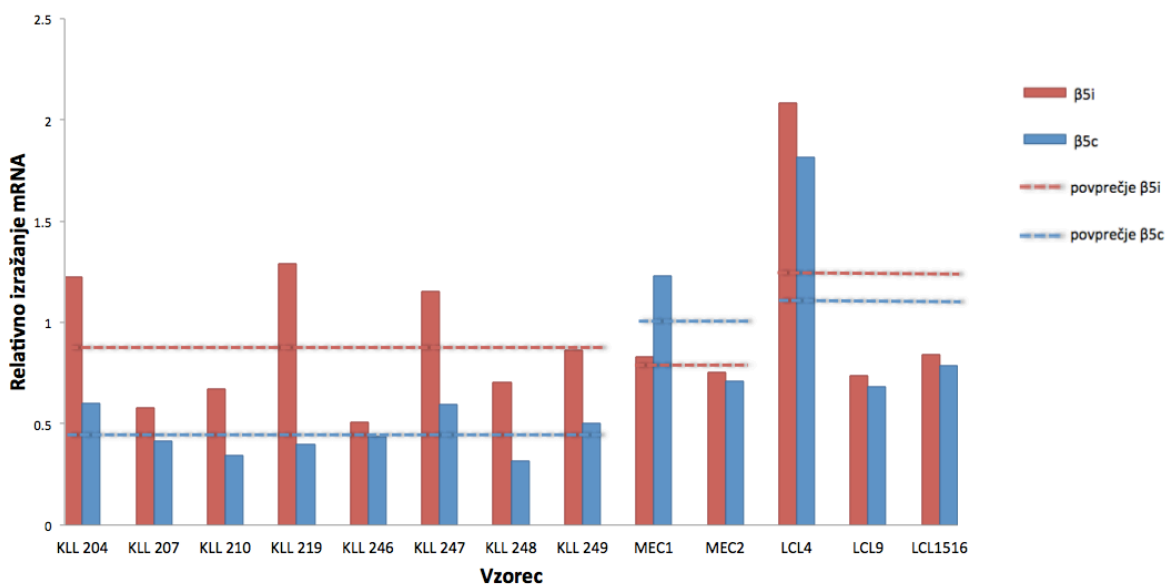
naših poskusih sprožil apoptozo celic KLL. Zato rezultati predhodne študije, skladno z našimi rezultati, nakazujejo na neselektivno delovanje bortezomiba na celice KLL. V nasprotju z našimi rezultati so Gupta in sodelavci dokazali, da je imel karfilzomib znatno manjše učinke na zdrave limfocite B in limfocite T v primerjavi z učinki na celice KLL (84). Naša raziskava je bila izvedena na omejenem številu vzorcev, hkrati pa smo poskuse izvedli na celičnih linijah LCL, in ne na primarnih celicah zdravih darovalcev, kar bi lahko bila vzroka za neskladje naših rezultatov z ugotovitvami omenjene študije.

Glede na to, da smo za ONX-0914 dokazali selektivno delovanje že na majhnem številu vzorcev in na modelu, na katerem delovanje bortezomiba in karfilzomiba ni bilo selektivno za celice KLL, pričakujemo, da je citotoksično delovanje ONX-0914 bolj selektivno za celice KLL v primerjavi z delovanjem inhibitorjev proteasoma. To je obetaven rezultat, saj visoka selektivnost prinaša manj stranskih in neželenih učinkov. Za potrditev selektivnega delovanja ONX-0914 in neselektivnega delovanja inhibitorjev proteasoma bi bile potrebne dodatne študije na primarnih celicah zdravih darovalcev in na večjem številu vzorcev celic bolnikov s KLL.

4.2 ANALIZA IZRAŽANJA PODENOT $\beta 5c$ IN $\beta 5i$ (IMUNO)PROTEASOMA

Inhibitorja proteasoma bortezomib in karfilzomib ter inhibitor imunoproteasoma ONX-0914 v različnih razmerjih zavirajo delovanje tako proteasomske podenote $\beta 5c$ kot imunoproteasomske podenote $\beta 5i$ (26). Zanimalo nas je, ali obstaja korelacija med izražanjem podenote $\beta 5c$ ali podenote $\beta 5i$ in citotoksičnim delovanjem omenjenih inhibitorjev (imuno)proteasoma.

Z namenom ovrednotenja izražanja katalitskih podenot $\beta 5c$ in $\beta 5i$ smo iz primarnih celic 8 vzorcev KLL in iz celic celičnih linij MEC1, MEC2, LCL4, LCL9 ter LCL1516 izolirali RNA. Izolirano RNA smo prepisali v komplementarno cDNA, ki smo jo nato kvantificirali z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času. Rezultate smo normirali na geometrijsko sredino izražanja referenčnih genov *RPLP0* in *GUSB*. Na Sliki 21 je prikazana relativna genska ekspresija za podenoti $\beta 5c$ in $\beta 5i$ v posameznih celicah.



Slika 21: Relativno izražanje genov za podenoti $\beta 5c$ in $\beta 5i$ v primarnih celicah KLL in v stabilno transformiranih celicah MEC in LCL.

Iz vzorcev smo izolirali RNA in jo prepisali v cDNA. Z uporabo kvantitativne metode PCR v realnem času smo najprej kvantificirali izražanje referenčnih genov *RPLP0* in *GUSB*. Nato smo kvantificirali še izražanje preiskovanih genov $\beta 5c$ in $\beta 5i$ in ju normirali na izražanje referenčnih genov po sledeči enačbi: $\beta 5c/i \text{ norm.} = \frac{\text{ekspresija } (\beta 5c/i)}{\text{ekspresija (ref. genov)}}$
 $\text{ekspresija (ref. genov)} = \sqrt{\text{ekspresija (RPLP0)} \times \text{ekspresija (GUSB)}}$.

V primarnih celicah KLL je bila opazna statistično značilna razlika v izražanju podenote $\beta 5i$ in podenote $\beta 5c$ ($p = 0,0027$). Izražanje imunoproteasomske podenote je bilo višje v primerjavi z izražanjem konstitutivne podenote. Povprečje relativnega izražanja podenote $\beta 5i$ v celicah KLL je bilo $0,87 \pm 0,31$, povprečje relativnega izražanja podenote $\beta 5c$ pa $0,45 \pm 0,11$. V celicah LCL je bilo izražanje podenote $\beta 5i$ prav tako višje v primerjavi z izražanjem podenote $\beta 5c$. Razlike v izražanju podenot $\beta 5c$ in $\beta 5i$ v celicah LCL so bile veliko manjše kot v celicah KLL. Izražanje imunoproteasomske enote je bilo v celicah KLL v povprečju višje za 96,0 %, medtem ko je bilo v celicah LCL izražanje podenote $\beta 5i$ višje za 9,5 %. Celice MEC1 so bile edine, pri katerih je bilo relativno izražanje podenote $\beta 5c$ (1,23) višje od izražanja podenote $\beta 5i$ (0,83). V celicah MEC2 je bilo izražanje podenote $\beta 5c$ (0,71) primerljivo izražanju podenote $\beta 5i$ (0,75).

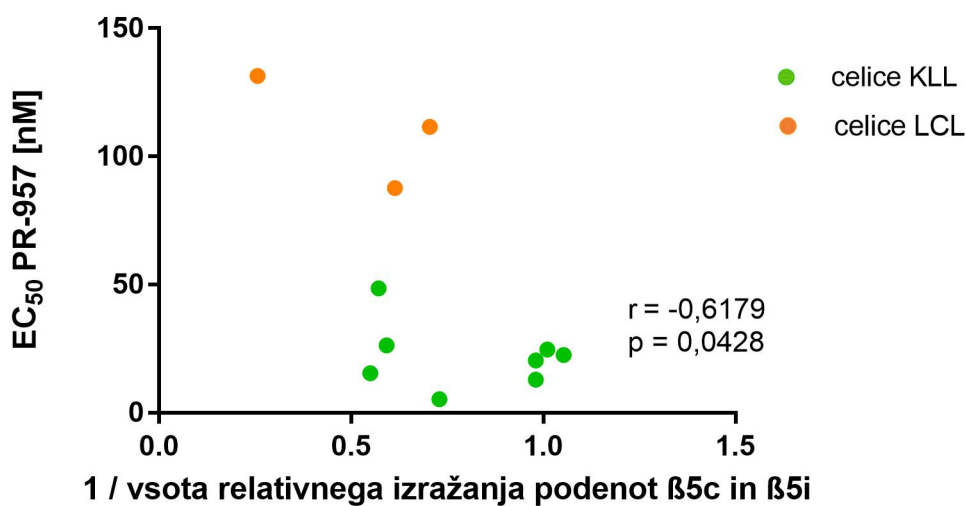
Skladno z našimi ugotovitvami so v predhodnih študijah poročali o višjem izražanju imunoproteasomskih podenot v primerjavi s proteasomskimi podenotami pri malignih obolenjih limfocitov B (28). Izražanja podenot $\beta 5c$ in $\beta 5i$ pa ne odražajo neposredno izražanja končnih izooblik proteasoma, saj se proteasomske in imunoproteasomske katalitske podenote lahko združujejo na različne načine (28, 86).

4.2.1 Med vsoto izražanja proteasomskih podenot $\beta 5c$ in $\beta 5i$ ter citotoksičnim delovanjem ONX-0914 obstaja korelacija

Želeli smo ovrednotiti vlogo izražanja proteasomske podenote $\beta 5c$ in imunoproteasomske podenote $\beta 5i$ pri citotoksičnem delovanju inhibitorjev (imuno)proteasoma. S tem namenom smo preverili, če obstaja korelacija med izražanjem genov za podenoti $\beta 5c$ in $\beta 5i$ ter citotoksičnimi učinki bortezomiba, karfilzomiba in ONX-0914.

Celični liniji MEC1 in MEC2 sta nastali s transformacijo netipičnih celic KLL. Čeprav predstavljata dober model za preliminarne študije, se njune lastnosti v več pogledih razlikujeta od *ex vivo* lastnosti celic KLL (72). Te razlike se odražajo tudi v rezultatih naših raziskav, kjer smo določili znatno višje vrednosti EC_{50} za inhibitorje (imuno)proteasoma na celicah MEC v primerjavi s celicami KLL. Hkrati smo opazili, da je bilo v celični liniji MEC1 v nasprotju s celicami KLL višje izražanje podenote $\beta 5c$ v primerjavi s podenoto $\beta 5i$. Zato smo za analizo korelacije uporabili le podatke iz meritev na primarnih celicah in celičnih linijah LCL.

Ker se vrednosti relativnega izražanja genov niso porazdeljevale normalno, smo uporabili recipročno transformacijo, pri čemer smo dobili vrednosti, ki so se porazdeljevale normalno. V programu GraphPad Prism smo izračunali Pearsonov koeficient korelacije in ugotovili, da obstaja statistično značilna korelacija med citotoksičnim delovanjem ONX-0914 in obratno vrednostjo vsote izražanja podenot $\beta 5c$ in $\beta 5i$ ($r = -0,6179$, $p = 0,0428$) (Slika 22). Med citotoksičnim delovanjem bortezomiba in karfilzomiba ter izražanjem podenot $\beta 5c$ in $\beta 5i$ ni bilo statistično značilnih korelacij.



Slika 22: Korelacija med obratno vrednostjo vsote izražanja genov za podenoti $\beta 5c$ in $\beta 5i$ in citotoksičnim delovanjem ONX-0914.

V programu GraphPad Prism smo analizirali korelacije med izražanjem genov za (imuno)proteasomski podenoti $\beta 5c$ in $\beta 5i$ in citotoksičnostjo inhibitorjev (imuno)proteasoma. Vrednosti EC_{50} na grafu, so vrednosti izračunane na podlagi meritev z metabolnim testom PrestoBlue za celice KLL in MTS za celice LCL 24 ur po tretiranju celic z različnimi koncentracijami ONX-0914. Ekspresija genov je normirana na referenčna gena *GUSB* in *RPLP0*. Oranžna barva predstavlja celice LCL, zelena pa celice KLL.

ONX-0914 je selektivni inhibitor imunoproteasomske podenote $\beta 5i$, ki v 10-krat manjši meri deluje tudi na konstitutivno podenoto $\beta 5c$. Korelacije med citotoksičnim delovanjem ONX-0914 in relativnim izražanjem podenote $\beta 5i$ na podlagi rezultatov naših poskusov nismo opazili. V predhodnih raziskavah so dokazali, da ni nujno, da ekspresija (imuno)proteasomskih podenot odraža količino in katalitsko aktivnost dejansko nastalih podenot v celici (28,87). Hkrati pa je bila naša študija izvedena na omejenem številu vzorcev. Za potrditev (ne)povezanosti citotoksičnosti ONX-0914 in izražanja/aktivnosti

podenote $\beta 5i$ bi bile potrebne dodatne študije na večjem številu vzorcev, ki bi vključevale tudi študije katalitske aktivnosti podenote $\beta 5i$.

Opazili smo statistično značilno povezanost med citotoksičnim delovanjem ONX-0914 in obratno vrednostjo vsote relativnega izražanja podenot $\beta 5c$ in $\beta 5i$. Večje kot je bilo skupno izražanje teh dveh podenot, večja je bila vrednost EC_{50} , kar pomeni, da so bile potrebne višje koncentracije ONX-0914 za doseg citotoksičnega učinka. Podenoti $\beta 5c$ in $\beta 5i$ imata obe KP-delovanje. V predhodnih študijah na celicah KLL so ugotovili, da citotoksično delovanje karfilzomiba korelira z bazalnim KP-delovanjem v celicah KLL (84). Na podlagi naših rezultatov bi to lahko veljalo tudi za citotoksično delovanje ONX-0914. Če je za citotoksičen učinek potrebno znižano KP-delovanje, je smiselno, da so ob večjem izražanju podenot $\beta 5c$ in $\beta 5i$ potrebne višje koncentracije ONX-0914 za doseganje enako nizkega KP-delovanja, ki lahko vodi v apoptozo. Čeprav so v predhodnih študijah ugotovili, da sta za inhibicijo KP-delovanja ključni inhibicija podenot $\beta 5c$ in $\beta 5i$ (78), pa ima KP-delovanje tudi imunoproteasomska podenota $\beta 1i$. V nadaljnjih raziskavah bi bilo smiselno določiti bazalno KP-delovanje v celicah KLL in ovrednotiti potencialne korelacije s citotoksičnostjo ONX-0914.

Vsota relativnega izražanja podenot $\beta 5c$ in $\beta 5i$ v celicah LCL ($2,32 \pm 1,37$) je bila višja kot v celicah KLL ($1,25 \pm 0,35$). To spoznanje se sklada z ugotovitvami Gupte in sodelavcev, ki so ugotovili, da je kimotripsinska katalitska aktivnost večja v zdravih limfocitih B kot v celicah KLL (84). Gupta in sodelavci so predlagali, da bi lahko bila razlika v kimotripsinski katalitski aktivnosti podlaga za selektivno citotoksičnost karfilzomiba, enako bi lahko veljalo za ONX-0914. Za potrditev te možnosti bi bile potrebne nadaljnje raziskave.

4.3 PRIHODNOST UPORABE (IMUNO)PROTEASOMSKIH INHIBITORJEV V TERAPIJI KLL

Ugotovili smo, da ONX-0914 *in vitro* v nanomolarnih koncentracijah, selektivno v primarnih celicah KLL, koncentracijsko in časovno odvisno sproži apoptozo. Dobljeni rezultati so obetavni, a ne zagotavljajo učinkovitosti delovanja ONX-0914 *in vivo*. Bortezomib in karfilzomib sta prav tako v predhodnih in naših študijah izkazala citotoksično delovanje v nizkih nanomolarnih koncentracijah *in vitro* na celice KLL, *in vivo* pa nista izkazala zadostnih učinkov. Celice KLL so bile *in vivo* odporne na bortezomib. Eden od predlaganih mehanizmov neodzivnosti na bortezomib *in vivo* je prisotnost flavonoidov v plazmi bolnikov. Flavonoidi so vnešeni v telo s prehrano bolnikov in inhibirajo delovanje bortezomiba (21). Karfilzomib se je *in vitro* izkazal kot bolj citotoksičen v primerjavi z bortezomibom. Apoptično je deloval v nižjih koncentracijah v primerjavi z bortezomibom ter bil enako učinkovit tako v mediju s humanim serumom kot v mediju s fetalnim govejim serumom. Poleg tega je deloval citotoksično na celice, ki so razvile rezistenco na bortezomib. V klinični študiji 1. faze (21), kjer so testirali karfilzomib na bolnikih s KLL, se je ta izkazal za varno in tolerabilno učinkovino. Pri vseh bolnikih so opazili zmanjšanje KP-delovanja proteasoma, ki je bilo posledica tarčnega učinka karfilzomiba na celice KLL. Pri nekaterih bolnikih je bil opazen klinično ugoden učinek na nivoju bezgavk. Nobeden od opaženih učinkov pa ni bil zadosten, da bi ga lahko ovrednotili kot delni ali popolni odgovor na karfilzomib. Kljub temu se karfilzomib uvršča med potencialne učinkovine v terapiji KLL, vendar v kombinaciji z drugimi učinkovinami. Trenutno potekata 2 klinični študiji, ki vključujeta karfilzomib v terapijo KLL. V klinični študiji 1. stopnje ga testirajo v kombinaciji z bendamustinom in rituksimabom. V drugi študiji, ki je v 2. fazi kliničnega testiranja, pa ga testirajo v kombinaciji s TGR-1202, inhibitorjem PI3K δ (36, 88).

Naša raziskava je prva, ki je ovrednotila vpliv imunoproteasomskega inhibitorja ONX-0914 na primarne celice KLL. Čeprav so bile vrednosti EC₅₀ za ONX-0914 višje kot za bortezomib in karfilzomib, je ONX-0914 deloval citotoksično na celice KLL v nanomolarnih koncentracijah. Ugotovili smo, da je delovanje ONX-0914 bolj selektivno za celice KLL v primerjavi z delovanjem bortezomiba in karfilzomiba, kjer nismo opazili statistično značilne razlike v citotoksičnem delovanju na celice LCL in KLL. Predvidevamo, da bi lahko bila njegova uporaba povezana z manj neželenimi učinki v

primerjavi z uporabo karfilzomiba in bortezumiba, ki sta že v klinični rabi za zdravljenje diseminiranega plazmocitoma.

Prvi inhibitor imunoproteasoma, ki so ga vključili v klinične študije, je analog ONX-0914, KZR-616, ki ga preiskujejo za zdravljenje sistemskega lupusa eritematozusa. V 1. fazi klinične študije je izkazal ponovljive farmakodinamične in farmakokinetične lastnosti. Na zdravih prostovoljcih je pri varnih koncentracijah izkazal inhibitorni učinek na imunoproteasomske podenote in je trenutno vključen v 2. fazo klinične študije (89). Naši *in vitro* rezultati v skladu z rezultati klinične študije analoga ONX-0914 nakazujejo na potencialno možnost uporabe inhibitorjev imunoproteasoma v terapiji KLL.

5 SKLEP

Izhodišče našega raziskovalnega dela je bilo, da je izražanje imunoproteasoma povečano pri boleznih, kjer gre za prekomerno nastajanje ali kopičenje imunskih celic, kot je na primer kronična limfocitna levkemija (KLL). Na podlagi tega smo ovrednotili protirakave učinke inhibitorja imunoproteasoma ONX-0914 na celicah KLL in raziskali povezave med citotoksičnimi učinki in izražanjem katalitskih podenot $\beta 5c$ in $\beta 5i$. Učinke ONX-0914 smo primerjali z učinki inhibitorjev proteasoma bortezomiba in karfilzomiba ter drugih terapevtskih učinkovin.

ONX-0914 je na primarne celice KLL deloval citotoksično v nanomolarnih koncentracijah. Izkazano delovanje je bilo koncentracijsko in časovno odvisno, kar je z vidika terapije zaželjeno. Celice KLL vseh preiskovanih vzorcev so bile odzivne na ONX-0914 v nanomolarnih koncentracijah, v odzivih smo opazili interindividualne razlike.

ONX-0914 je na celice KLL deloval manj citotoksično v primerjavi z inhibitorjema proteasoma bortezomibom in karfilzomibom. Z uporabo DPLG-3, ki je visoko selektiven za podenoto $\beta 5i$, smo potrdili, da je za citotoksično delovanje inhibitorjev imunoproteasoma pomembna hkratna inhibicija katalitskih podenot proteasoma ($\beta 5c$) in imunoproteasoma ($\beta 5i$). Smiselno bi bilo primerjati tudi akumulacijo teh učinkovin v celicah KLL in ovrednotiti njen doprinos k razlikam v določenih vrednostih EC_{50} .

S pretočno citometrijo smo dokazali, da je mehanizem celične smrti celic KLL, povzročene z ONX-0914, apoptoza. Citotoksični učinki inhibitorja imunoproteasoma ONX-0914 so bili selektivni za maligne limfocite B, medtem ko selektivnosti pri inhibitorjih proteasoma bortezomiba in karfilzomiba nismo zaznali. Za potrditev selektivnosti delovanja ONX-0914 na maligne limfocite B bi bilo smiselno preveriti njegovo delovanje tudi na primarnih PBMC-jih zdravih darovalcev.

Z analizo izražanja katalitskih podenot $\beta 5c$ in $\beta 5i$ smo potrdili, da je v primarnih celicah KLL izražanje imunoproteasomske podenote $\beta 5i$ v povprečju 2-krat večje kot izražanje proteasomske podenote $\beta 5c$. Obstajala je povezanost med citotoksičnim učinkom ONX-0914 in obratno vrednostjo vsote relativnega izražanja podenot $\beta 5c$ in $\beta 5i$, kar podpira ugotovitev, da je za citotoksično delovanje potrebna inhibicija obeh omenjenih podenot. Ker aktivnost katalitskih podenot imunoproteasoma in proteasoma ne korelira nujno z

ekspresijo le-teh, bi bilo v nadaljnjih raziskavah smiselno določiti aktivnost teh in ostalih (imuno)proteasomskih podenot. Na večjem vzorcu celic KLL bi bilo smiselno hkrati določiti aktivnost katalitskih podenot in citotoksične učinke inhibitorjev imunoproteasoma na posamezne celice KLL ter ovrednotiti potencialne korelacije.

Naša raziskava je bila prva, ki je ovrednotila *in vitro* delovanje inhibitorja imunoproteasoma na celicah KLL. V splošnem se je v naših raziskavah inhibitor imunoproteasoma ONX-0914 *in vitro* izkazal kot obetavna spojina za doseganje protirakavih učinkov na primarnih celicah KLL. Nadalje bi bilo študijo smiselno razširiti in izvesti raziskave na večjem številu vzorcev. Hkrati bi bilo smiselno rezultate ovrednotiti skupaj s kliničnimi podatki o bolnikih in raziskati potencialne povezave med *in vitro* citotoksičnim delovanjem inhibitorjev imunoproteasoma na celice KLL ter citogenetskimi dejavniki, potekom bolezni in odzivnostjo bolnikov na uveljavljene terapije. Naši rezultati spodbujajo k nadaljnjemu raziskovanju imunoproteasoma kot tarče v terapiji KLL.

6 LITERATURA

1. WHO | Cancer [Internet]. WHO. Dostopno na: <http://www.who.int/cancer/en/> [10. april 2018].
2. Ruiz S. The proteasome inhibitor NPI-0052 is a more effective inducer of apoptosis than bortezomib in lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Mol Cancer Ther.* 2006 Jul 1;5(7):1836–43.
3. Chronic Lymphocytic Leukemia [Internet]. Cancer Therapy Advisor. 2016. Dostopno na: <https://www.cancertherapyadvisor.com/hospital-medicine/chronic-lymphocytic-leukemia/article/601542/> [10. april 2018]
4. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment: HALLEK. *Am J Hematol.* 2017 Sep;92(9):946–65.
5. Kelley TW, Alkan S, Srkalovic G, Hsi ED. Treatment of human chronic lymphocytic leukemia cells with the proteasome inhibitor bortezomib promotes apoptosis. *Leuk Res.* 2004 Aug;28(8):845–50.
6. What Is Chronic Lymphocytic Leukemia? [Internet]. Dostopno na: <https://www.cancer.org/cancer/chronic-lymphocytic-leukemia/about/what-is-cll.html> [10. april 2018]
7. Shanafelt TD. Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL. *Blood.* 2003 Oct 23;103(4):1202–10.
8. Wu CJ. CLL clonal heterogeneity: an ecology of competing subpopulations. *Blood.* 2012;120:4117–8
9. Zver S, Černelč P, Fikfak N, Enova D, Mlakar-Mastnak D, Remic M, et al. Kronična limfocitna levkemija: vodnik za bolnike. Slovensko združenje bolnikov z limfomom in levkemijo, L&L; Ljubljana, 2015.
10. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Hillmen P, Hallek M, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2015 Sep;26(suppl 5):v78–84.
11. Cll Smear [Internet]. Dostopno na: <https://library.med.utah.edu/WebPath/HEMEHTML/HEME019.html> [10. april 2018]
12. Prevodnik VK. Citopatološka diagnostika limfomov iz vzorcev bezgavk. *Onkologija.* 2010; leto XIV, št. 2:139-143.
13. Rawstron AC. Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of “indolent” chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. *Blood.* 2002 Jun 28;100(2):635–9.
14. Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, Croce CM, Packham G, Wierda WG, et al. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primer.* 2017 Jan 19;3:16096.
15. Chen C, Puvvada S. Prognostic Factors for Chronic Lymphocytic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep.* 2016 Feb;11(1):37–42.
16. Hallek M, Shanafelt TD, Eichhorst B. Chronic lymphocytic leukaemia. *The Lancet.* april 2018;391(10129):1524–37.
17. CBZ: Venetoklaks [Internet]. Dostopno na: [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search?SearchView&Query=\(%5BSEZNAMUCINKNAZIV%5D=_venetoklaks*\)&SearchOrder=4&SearchMax=301](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search?SearchView&Query=(%5BSEZNAMUCINKNAZIV%5D=_venetoklaks*)&SearchOrder=4&SearchMax=301) [20. april 2018]
18. Venclyxto SMPC [Internet]. Dostopno na: <https://mediately.co/si/drugs/VF01x0WRzJpqKutPw6KRyOBuojj/venclyxto-100-mg-filmsko-oblozene-tablete#packagings> [20. april 2018]

19. Liu H, Wan C, Ding Y, Han R, He Y, Xiao J, et al. PR-957, a selective inhibitor of immunoproteasome subunit low-MW polypeptide 7, attenuates experimental autoimmune neuritis by suppressing T_h 17-cell differentiation and regulating cytokine production. *FASEB J*. 2017 Apr;31(4):1756–66.
20. Ettari R, Zappalà M, Grasso S, Musolino C, Innao V, Allegra A. Immunoproteasome-selective and non-selective inhibitors: A promising approach for the treatment of multiple myeloma. *Pharmacol Ther*. 2018 Feb;182:176–92.
21. Awan FT, Flynn JM, Jones JA, Andritsos LA, Maddocks KJ, Sass EJ, et al. Phase I dose escalation trial of the novel proteasome inhibitor carfilzomib in patients with relapsed chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2015 Oct 3;56(10):2834–40.
22. Tanaka K. The proteasome: Overview of structure and functions. *Proc Jpn Acad Ser B*. 2009;85(1):12–36.
23. Jung T, Grune T. The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part I—structure of proteasomes. *Redox Biol*. 2013;1(1):178–82.
24. Carlin Walsh R, Alloway RR, Girnita AL, Steve Woodle E. Proteasome inhibitor-based therapy for antibody-mediated rejection. *Kidney Int*. 2012 Jun;81(11):1067–74.
25. Kniepert A, Groettrup M. The unique functions of tissue-specific proteasomes. *Trends Biochem Sci*. 2014;39:17-24.
26. Ferrington DA, Gregerson DS. Immunoproteasomes: structure, function, and antigen presentation. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2012;109:75–112.
27. Male D. *Immunology*, 7. izdaja. Elsevier Limited, Kanada, 2006.
28. Niewerth D, Kaspers GJ, Assaraf YG, van Meerloo J, Kirk CJ, Anderl J, et al. Interferon- γ -induced upregulation of immunoproteasome subunit assembly overcomes bortezomib resistance in human hematological cell lines. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol*. 2014;7(1):7.
29. Johnston-Carey HK, Pomatto LCD, Davies KJA. The Immunoproteasome in oxidative stress, aging, and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2016 Jul 3;51(4):268–81.
30. McCarthy MK, Weinberg JB. The immunoproteasome and viral infection: a complex regulator of inflammation. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:21.
31. Budenholzer L, Cheng CL, Li Y, Hochstrasser M. Proteasome Structure and Assembly. *J Mol Biol*. 2017 Nov;429(22):3500–24.
32. Zanker D, Waithman J, Yewdell JW, Chen W. Mixed Proteasomes Function To Increase Viral Peptide Diversity and Broaden Antiviral CD8⁺ T Cell Responses. *J Immunol*. 2013 Jul 1;191(1):52–9.
33. Centralna baza zdravil [Internet]. Dostopno na: [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search/\\$searchForm?SearchView](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search/$searchForm?SearchView) [14. april 2018].
34. Search of: bortezomib - List Results - ClinicalTrials.gov [Internet]. Dostopno na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?recrs=&cond=&term=bortezomib&cntry=&state=&city=&dist=> [14. april 2018].
35. Kuhn DJ, Chen Q, Voorhees PM, Strader JS, Shenk KD, Sun CM, et al. Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. *Blood*. 2007 Nov 1;110(9):3281–90.
36. Search of: carfilzomib | Recruiting, Not yet recruiting, Active, not recruiting, Enrolling by invitation Studies - List Results - ClinicalTrials.gov [Internet]. Dostopno na: https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=carfilzomib&Search=Apply&recrs=b&recrs=a&recrs=f&recrs=d&age_v=&gndr=&type=&rslt= [14. april 2018].
37. What Is Multiple Myeloma? [Internet]. Dostopno na: <https://www.cancer.org/cancer/multiple-myeloma/about/what-is-multiple-myeloma.html> [14. april 2018].

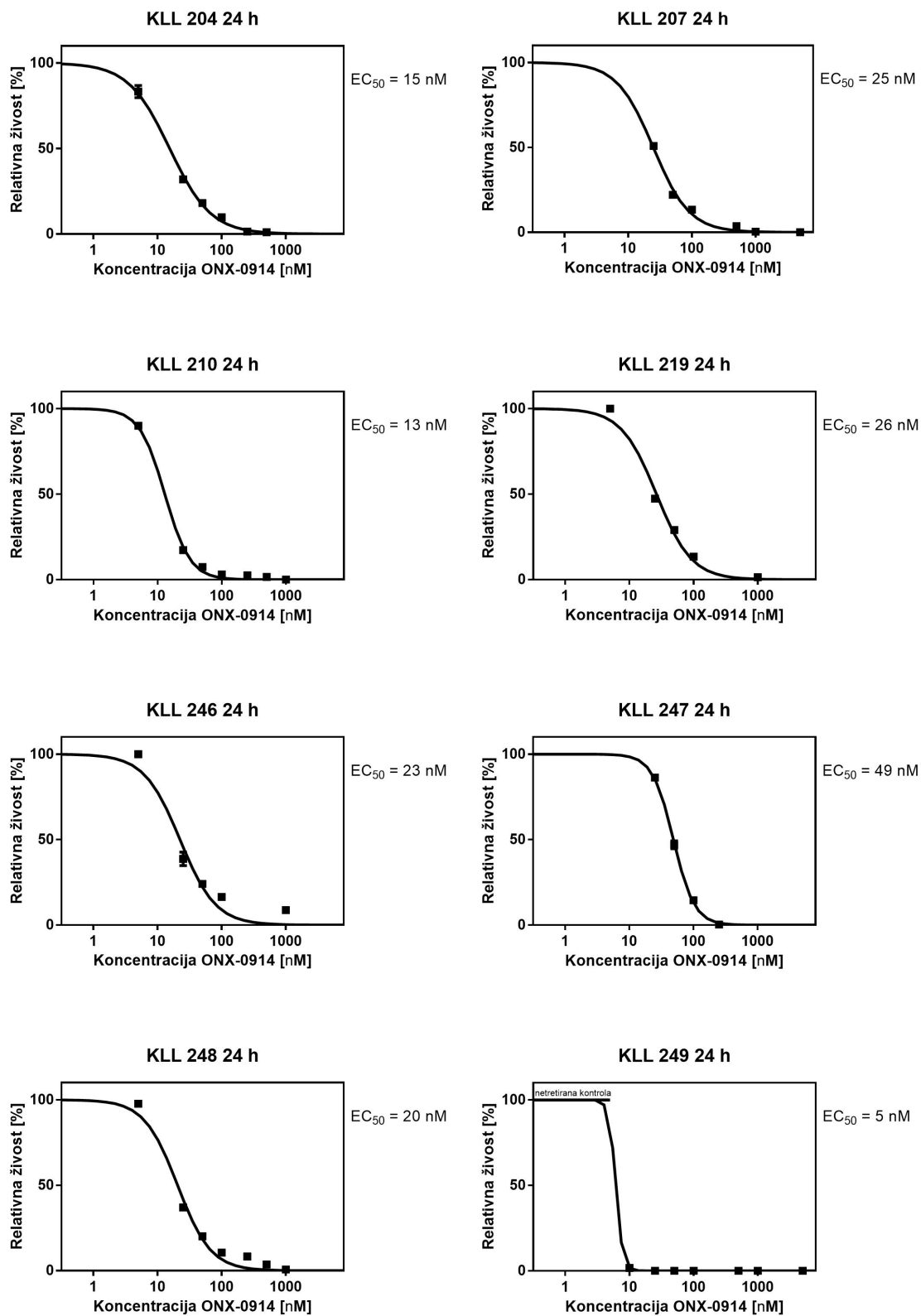
38. Lamothe B, Wierda WG, Keating MJ, Gandhi V. Carfilzomib Triggers Cell Death in Chronic Lymphocytic Leukemia by Inducing Proapoptotic and Endoplasmic Reticulum Stress Responses. *Clin Cancer Res.* 2016 Sep 15;22(18):4712–26.
39. Huber EM, Basler M, Schwab R, Heinemeyer W, Kirk CJ, Groettrup M, et al. Immuno- and Constitutive Proteasome Crystal Structures Reveal Differences in Substrate and Inhibitor Specificity. *Cell.* 2012 Feb;148(4):727–38.
40. Koerner J, Brunner T, Groettrup M. Inhibition and deficiency of the immunoproteasome subunit LMP7 suppress the development and progression of colorectal carcinoma in mice. *Oncotarget.* 2017;8(31):50873–50888.
41. Kuhn DJ, Orłowski RZ. The Immunoproteasome as a Target in Hematologic Malignancies. *Semin Hematol.* 2012 Jul;49(3):258–62.
42. Basler M, Mundt S, Muchamuel T, Moll C, Jiang J, Groettrup M, et al. Inhibition of the immunoproteasome ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *EMBO Mol Med.* 2014 Jan.
43. Muchamuel T, Basler M, Aujay MA, Suzuki E, Kalim KW, Lauer C, et al. A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nat Med.* 2009 Jul;15(7):781–7.
44. Sula Karreci E, Fan H, Uehara M, Mihali AB, Singh PK, Kurdi AT, et al. Brief treatment with a highly selective immunoproteasome inhibitor promotes long-term cardiac allograft acceptance in mice. *Proc Natl Acad Sci.* 2016 Dec 27;113(52):E8425–32.
45. CELL CULTURE BASICS [Internet]. Dostopno na: <https://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf> [16. april 2018].
46. Laminar Flow Cabinets [Internet]. Dostopno na: <http://www.laminarflows.co.uk> [16. april 2018].
47. Trypan Blue [Internet]. Dostopno na: <https://www.researchgate.net/.../Sigma+trypan+blue+cell+counting.pdf> [16. april 2018].
48. Hemocytometer [Internet]. Dostopno na: www.abcam.com/protocols/counting-cells-using-a-haemocytometer [16. april 2018].
49. Cell Counting with Neubauer Chamber [Internet]. Dostopno na: <http://www.celeromics.com/en/resources/docs/Articles/Cell-counting-Neubauer-chamber.pdf> [16. april 2018].
50. Cryopreservation of Mammalian Cells [Internet]. Dostopno na: <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/cryopreservation-of-mammalian-cells.html> [22. april 2018].
51. RosetteSep HLA Procedure [Internet]. Dostopno na: <http://www.stemcell.so/images/upload/pdf/527c94e612aae.pdf> [17. april 2018].
52. Cell Viability Assays [Internet]. Dostopno na: <https://socio.doc.us/download/bookshelf-nbk144065-ebook-pdf> [17. april 2018].
53. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay [Internet]. Dostopno na: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-system-protocol.pdf?la=en> [17. april 2018].
54. PrestoBlue® Cell Viability Reagent Documentation [Internet]. Dostopno na: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/PrestoBlueFAQ.pdf> [17. april 2018].
55. Csepregi R, Lemli B, Kunsági-Máté S, Sente L, Kőszegi T, Némethi B, et al. Complex Formation of Resorufin and Resazurin with B-Cyclodextrins: Can Cyclodextrins Interfere with a Resazurin Cell Viability Assay? *Molecules.* 2018 Feb 10;23(2):382.

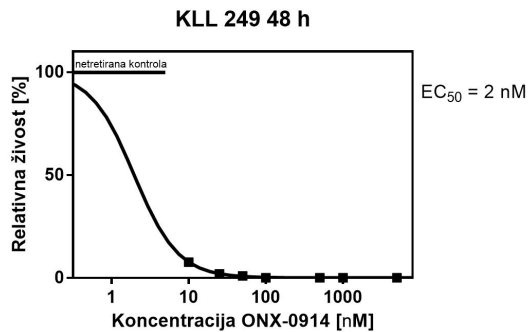
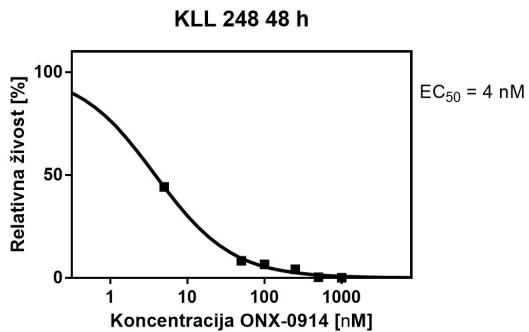
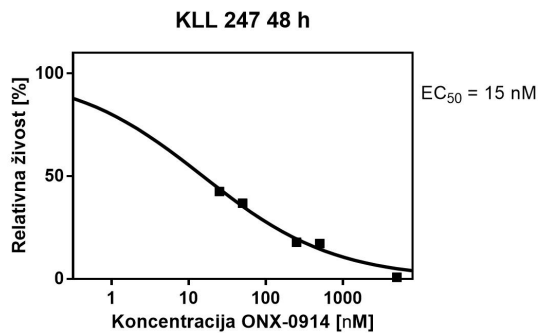
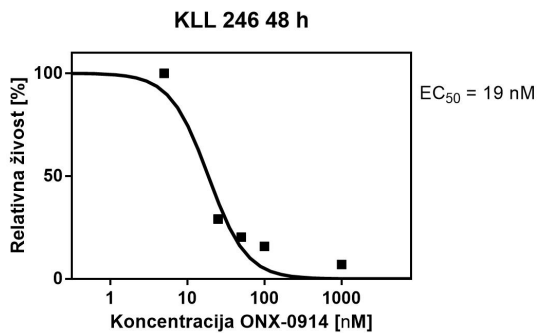
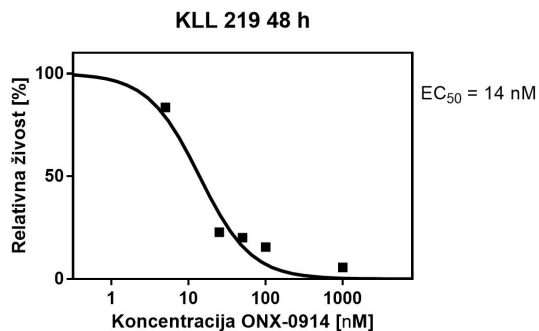
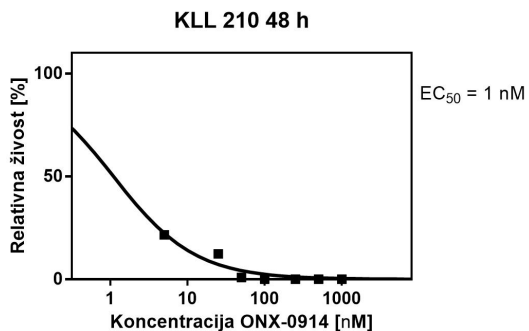
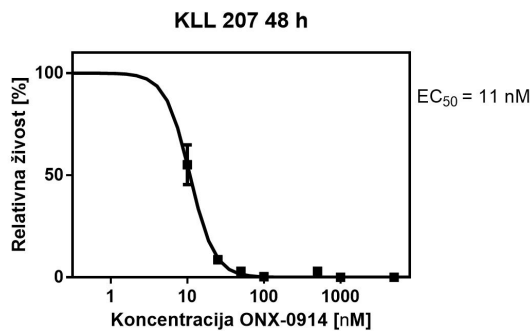
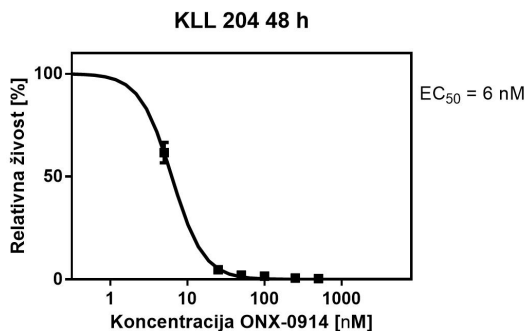
56. Grogan WM, Collins JM. Guide to Flow Cytometry Methods. CRC Press; 1990. 244 p.
57. Flow Cytometry Guide [Internet]. Dostopno na: <https://www.creative-diagnostics.com/flow-cytometry-guide.htm> [18. april 2018].
58. SYTOX® Blue Dead Cell Stain [Internet]. Dostopno na: <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S34857> [18. april 2018].
59. Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V PE and SYTOX Green, for flow cytometry [Internet]. Dostopno na: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V35112> [8. maj 2018].
60. PureLink™ Micro-to-Midi Total RNA Purification System [Internet]. Dostopno na: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/purelink_micro_midi_rna_man.pdf [18. april 2018].
61. NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8 User's Manual [Internet]. Dostopno na: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/nd-1000-v3.8-users-manual-8%20x11.pdf> [19. april 2018].
62. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ.* 2005 Sep;29(3):151–9.
63. Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods.* 2010 Apr;50(4):227–30.
64. Basic Principles of RT-qPCR [Internet]. Dostopno na: <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/basic-principles-rt-qpcr.html> [22. april 2018].
65. REAL-TIME PCR: FROM THEORY TO PRACTICE [Internet]. Dostopno na: https://www.researchgate.net/...real_time_PCR.../Real+Time+PCR.From+Theory+to+Practice.pdf [22. april 2018].
66. EvaGreen® Dye for qPCR & Other Applications [Internet]. Biotium. Dostopno na: <https://biotium.com/technology/pcr-dna-amplification/evagreen-dye-for-qpcr/> [21. april 2018].
67. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol.* 1999 Oct;75(2–3):291–5.
68. Vitale C, Burger JA. Chronic lymphocytic leukemia therapy: new targeted therapies on the way. *Expert Opin Pharmacother.* 2016 May 23;17(8):1077–89.
69. Burger JA, Tedeschi A, Barr PM, Robak T, Owen C, Ghia P, et al. Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.* 2015 Dec 17;373(25):2425–37.
70. Raedler LA. Imbruvica (Ibrutinib) Now FDA Approved as First-Line Treatment for Chronic Lymphocytic Leukemia and Small Lymphocytic Lymphoma. *American Health & Drug Benefits®* 2017;10:3.
71. Fava S, De Paoli A, Grimi E, Luoni M, Tocci A, Tosi A, et al. Prolymphocytic leukemia: the therapeutic strategy. *Recenti Prog Med.* 1994 Oct;85(10):496–501.
72. Rasul E, Salamon D, Nagy N, Leveau B, Banati F, Szenthe K, et al. The MEC1 and MEC2 Lines Represent Two CLL Subclones in Different Stages of Progression towards Prolymphocytic Leukemia. Pagano JS, editor. *PLoS ONE.* 2014 Aug 27;9(8):e106008.
73. Neubig RR. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology. *Pharmacol Rev.* 2003 Dec 1;55(4):597–606.
74. Niewerth D, Franke NE, Jansen G, Assaraf YG, van Meerloo J, Kirk CJ, et al. Higher ratio immune versus constitutive proteasome level as novel indicator of sensitivity of pediatric acute leukemia cells to proteasome inhibitors. *Haematologica.* 2013 Dec 1;98(12):1896–904.

75. Mulder A, Heidt S, Vergunst M, Roelen DL, Claas F H J. Proteasome Inhibition Profoundly Affects Activated Human B Cells: *Transplant J*. 2013 Jun;95(11):1331–7.
76. Roit FD, Engelberts PJ, Taylor RP, Breij ECW, Gritti G, Rambaldi A, et al. Ibrutinib interferes with the cell-mediated anti-tumor activities of therapeutic CD20 antibodies: implications for combination therapy. *Haematologica*. 2015 Jan 1;100(1):77–86.
77. Guièze R, Wu CJ. Genomic and epigenomic heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2015 Jul 23;126(4):445–53.
78. Parlati F, Lee SJ, Aujay M, Suzuki E, Levitsky K, Lorens JB, et al. Carfilzomib can induce tumor cell death through selective inhibition of the chymotrypsin-like activity of the proteasome. *Blood*. 2009 Oct 15;114(16):3439–47.
79. Lekshmi A, Varadarajan SN, Lupitha SS, Indira D, Mathew KA, Chandrasekharan Nair A, et al. A quantitative real-time approach for discriminating apoptosis and necrosis. *Cell Death Discov*. 2017 Jan 23;3:16101.
80. Calvert AH. O1.1 Discovering selective anticancer drugs: Succeeding slowly is better than failing fast. *Ann Oncol*. 2015 Mar 1;26.
81. Frisan T, Levitsky V, Masucci M. Generation of Lymphoblastoid Cell Lines (LCLs). *Epstein-Barr Virus Protocols. Methods in Molecular BiologyTM*, Humana Press, 2001: 125–7.
82. Morag A, Kirchheiner J, Rehavi M, Gurwitz D. Human lymphoblastoid cell line panels: novel tools for assessing shared drug pathways. *Pharmacogenomics*. 2010 Mar;11(3):327–40.
83. Sie L, Loong S, Tan EK. Utility of lymphoblastoid cell lines. *J Neurosci Res*. 2009 Jul;87(9):1953–9.
84. Gupta SV, Hertlein E, Lu Y, Sass EJ, Lapalombella R, Chen TL, et al. The Proteasome Inhibitor Carfilzomib Functions Independently of p53 to Induce Cytotoxicity and an Atypical NF- B Response in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *Clin Cancer Res*. 2013 May 1;19(9):2406–19.
85. Arpinati M, Chirumbolo G, Nicolini B, Agostinelli C, Rondelli D. Selective apoptosis of monocytes and monocyte-derived DCs induced by bortezomib (Velcade). *Bone Marrow Transplant*. 2009 Feb;43(3):253–9.
86. Kammerl IE, Meiners S. Proteasome function shapes innate and adaptive immune responses. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2016 Jun 24; 00156.
87. Krause S. Immunoproteasome subunit LMP2 expression is deregulated in Sjogren’s syndrome but not in other autoimmune disorders. *Ann Rheum Dis*. 2006 Jan 13;65(8):1021–7.
88. O’Connor, O. A., Flinn, I. W., Patel, M. R., Fenske, T. S., Deng, C., Brander, D. M., Gutierrez, M., Jones, S., Kuhn, J. G., Miskin, H. P., Sportelli, P., Vakkalanka, S., & Burris, H. A. TGR-1202, a Novel Once Daily PI3K-Delta Inhibitor, Demonstrates Clinical Activity with a Favorable Safety Profile in Patients with CLL and B-Cell Lymphoma. *Blood*. 2015;126(23):41-54.
89. Lickliter J, Anderl J, Kirk CJ, Wang J, Bomba D. KZR-616, a Selective Inhibitor of the Immunoproteasome, Shows a Promising Safety and Target Inhibition Profile in a Phase I, Double-Blind, Single (SAD) and Multiple Ascending Dose (MAD) Study in Healthy Volunteers [abstract]. *Arthritis Rheumatol*. 2017; 69 (suppl 10).

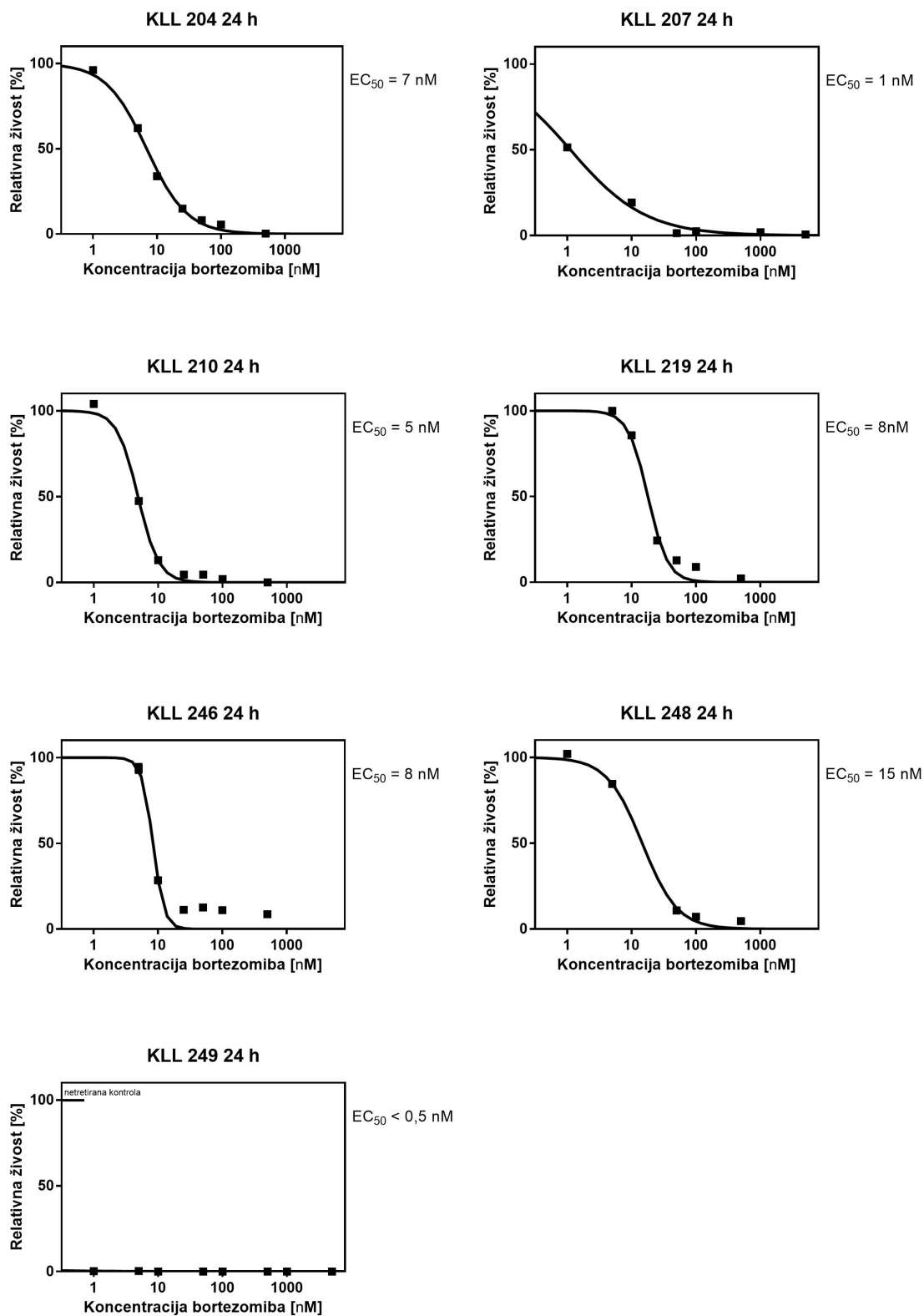
7 PRILOGE

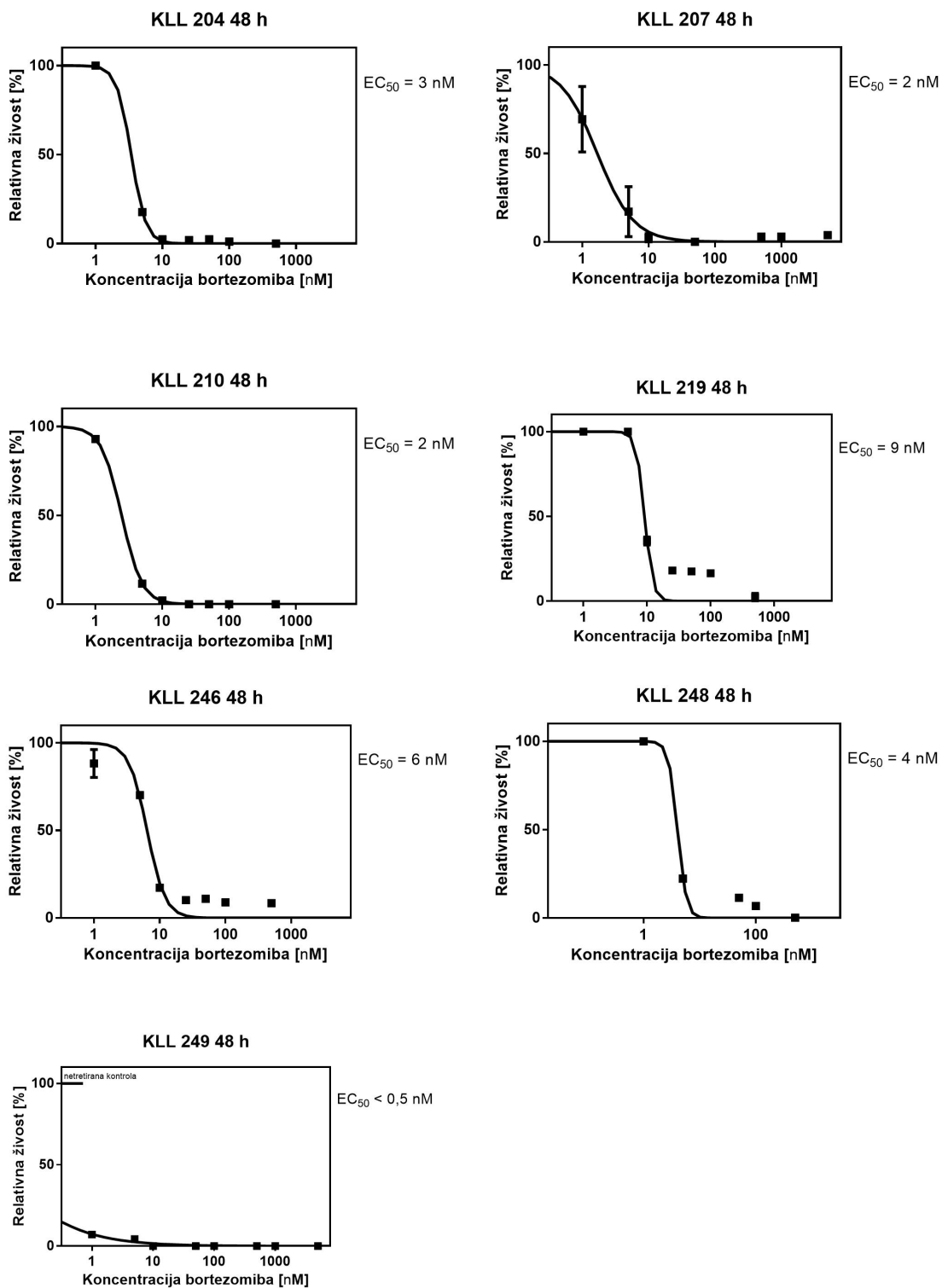
Priloga 1: Citotoksični učinki ONX-0914 na celice KLL





Priloga 2: Citotoksični učinki bortezomiba na celice KLL.





Priloga 3: Citotoksični učinki karfilzomiba na celice KLL.

