

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

ANDREJA KANDARE

**VPLIV STIMULACIJE RECEPTORJA EP₄ NA AKTIVACIJO NFκB V
CELICAH RAMOS IN RAJI**

**DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE**

Ljubljana, 2012

Univerza v *Ljubljani*
Fakulteta *za farmacijo*



ANDREJA KANDARE

**VPLIV STIMULACIJE RECEPTORJA EP₄ NA AKTIVACIJO NF κ B V
CELICAH RAMOS IN RAJI**

**MODULATION OF NF κ B IN RAMOS AND RAJI CELLS BY EP₄
RECEPTOR**

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za klinično biokemijo, pod mentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič-Raščan, mag. farm.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Ireni Mlinarič-Raščan, mag. farm za strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi asist. dr. Matevžu Prijatelju, mag. farm za nasvete, pomoč in usmerjanje pri izvajanju laboratorijskega dela diplomske naloge.

Nenazadnje hvala tudi staršem, ki so mi omogočili študij ter sestri in vsem prijateljem, ki so mi tekom študija stali ob strani.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič-Raščan, mag. farm.

Andreja Kandare

Ljubljana, april 2012

Predsednica diplomske komisije:izr. prof. dr. Saša Baumgartner, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Jožko Cesar, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO SLIK	III
KAZALO PREGLEDNIC	III
KAZALO ENAČB	III
POVZETEK	IV
ABSTRACT	VI
Seznam kratic in okrajšav	VIII
1 UVOD	1
1.1 B LEVKEMIJE IN LIMFOMI.....	1
1.1.1 <i>Levkemije</i>	1
1.1.2 <i>Limfomi</i>	2
1.1.3 <i>Terapija B-limfocitnih malignih obolenj</i>	4
1.2 APOPTOZA	6
1.2.1 <i>Kaspaze</i>	6
1.2.2 <i>Bcl-2 družina proteinov</i>	9
1.2.3 <i>NFκB v apoptozi</i>	10
1.2.4 <i>Modulacija apoptoze kot terapevtski pristop</i>	13
1.3 PROSTAGLANDINSKI RECEPTOR EP ₄	14
1.3.1 <i>Vloga receptorja EP₄ pri uravnavanju fizioloških in patofizioloških procesov</i>	15
1.3.2 <i>Signalizacija preko receptorja EP₄</i>	16
2 NAMEN DELA	19
3 MATERIALI IN METODE	20
3.1 MATERIALI	20
3.1.1 <i>Kemikalije</i>	20
3.1.2 <i>Kompleti</i>	21
3.1.3 <i>Pufri in raztopine</i>	21
3.1.4 <i>Geli za SDS-PAGE</i>	24
3.1.5 <i>Označevalci velikosti</i>	25
3.1.6 <i>Substrat</i>	25
3.1.7 <i>Protitelesa</i>	25
3.1.8 <i>Gojišče</i>	26

3.1.9	<i>Laboratorijska oprema</i>	26
3.2	METODE DELA S CELICAMI	28
3.2.1	<i>Gojenje celičnih kultur</i>	28
3.2.2	<i>Subkultiviranje celičnih linij</i>	29
3.2.3	<i>Odmrzovanje celic</i>	29
3.2.4	<i>Štetje celic</i>	29
3.3	TEST MTS	30
3.4	MERJENJE AKTIVNOSTI KASPAZ 3 IN 7.....	31
3.5	SDS-PAGE IN PRENOS PO WESTERNU.....	32
3.5.1	<i>Priprava celičnega lizata</i>	32
3.5.2	<i>Določanje celokupne koncentracije proteinov z metodo po Lowry-ju</i>	33
3.5.3	<i>Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (SDS-PAGE)</i>	34
3.5.4	<i>Prenos western in imunodetekcija</i>	36
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	38
4.1	AKTIVACIJA RECEPTORJA EP ₄ INDUCIRA APOPTOZO V CELICAH BURKITTOVEGA LIMFOMA.....	38
4.1.1	<i>Agonist receptorja EP₄ inhibira proliferacijo celic RAMOS in RAJI</i>	38
4.1.2	<i>Aktivacija receptorja EP₄ vodi v celično smrt</i>	40
4.1.3	<i>Aktivacija receptorja EP₄ inducira apoptozo v celicah RAMOS in RAJI</i>	42
4.2	AKTIVACIJA RECEPTORJA EP ₄ VODI V ZMANJŠANO IZRAŽANJE ANTIPOPTOTSKEGA PROTEINA BCL-xL.....	43
4.2.1	<i>V celicah RAMOS in RAJI aktivacija receptorja EP₄ zmanjša aktivacijo transkripcijskega faktorja NFκB</i>	44
4.2.2	<i>Aktivacija receptorja EP₄ vodi v zmanjšano izražanje BCL-xL v celicah RAMOS in RAJI</i>	46
4.3	AGONIST RECEPTORJA EP ₄ POVEČA CITOTOKSIČNE UČINKE DOKSORUBICINA IN BORTEZOMIBA	48
4.3.1	<i>Vpliv doksorubicina na proliferacijo celic RAMOS in RAJI</i>	49
4.3.2	<i>Vpliv bortezomiba na proliferacijo celic RAMOS in RAJI</i>	50
4.3.3	<i>Vpliv aktivacije receptorja EP₄ na farmakološke učinke doksorubicina</i>	51
4.3.4	<i>Vpliv aktivacije receptorja EP₄ na farmakološke učinke bortezomiba</i>	52
5	SKLEP	55
6	LITERATURA	57

KAZALO SLIK

Slika 1: Zunanja in notranja pot apoptoze (30).....	9
Slika 2: Klasična (kanonična) in alternativna pot NFκB (33).....	12
Slika 3: Shematski prikaz celičnega metabolizma reagenta MTS.	31
Slika 4: Umeritvena premica za določitev koncentracije proteinov.	34
Slika 5: Metabolna aktivnost celic (A) RAMOS in (B) RAJI stimuliranih s PGE1-OH.	39
Slika 6: Vpliv PGE1-OH na viabilnost celic RAMOS in RAJI.....	41
Slika 7: Aktivnost kaspaz 3 in 7 v celicah RAMOS.	43
Slika 8: Izražanje inhibitornih proteinov IκB v celicah (A) RAMOS in (B) RAJI po stimulaciji s PGE1-OH.	45
Slika 9: Izražanje proteina BCL-xL v celicah (A) RAMOS in (B) RAJI po stimulaciji s PGE1-OH.	47
Slika 10: Metabolna aktivnost celic RAMOS in RAJI stimuliranih z doksorubicinom.	49
Slika 11: Metabolna aktivnost celic RAMOS in RAJI stimuliranih z bortezomibom.....	50
Slika 12: Metabolna aktivnost celic RAMOS in RAJI stimuliranih s PGE1-OH in doksorubicinom.	51
Slika 13: Metabolna aktivnost celic RAMOS in RAJI stimuliranih s PGE1-OH in bortezomibom.....	53

KAZALO PREGLEDNIC

Tabela I: Absorbance BSA, potrebne za konstrukcijo umeritvene premice.	34
--	----

KAZALO ENAČB

Enačba 1: Računanje koncentracije celic.	30
--	----

POVZETEK

Prostaglandinski receptor EP₄ je povezan z vrsto različnih fizioloških in patofizioloških učinkov, odvisnih od vrste celic in tkiv, v katerih se nahaja. V limfocitih B ima receptor EP₄ tumorsupresorsko funkcijo, saj njegova aktivacija posreduje inhibitorne učinke na proliferacijo mišjih malignih nezrelih in zrelih limfocitov B in poveča BCR inducirano apoptozo. EP₄ receptor je z G proteinom sklopljen receptor in njegova aktivacija z endogenim ligandom PGE₂ povzroči porast cAMP, v nekaterih primerih pa tudi aktivira od cAMP neodvisne poti, ki vključujejo inhibicijo aktivacije transkripcijskega faktorja NFκB. NFκB sodeluje pri preživetvenih poteh v večini tumorskih celic in postane konstitutivno aktiviran. Namen diplomskega dela bo natančneje pojasniti, kako stimulacija receptorja EP₄, v humanih modelnih linijah B levkemij in limfomov vodi v zastoj celične rasti oz. apoptozo. Kot model za raziskovanje smo uporabili dve humani celični liniji Burkittovega limfoma, in sicer celice RAMOS in RAJI.

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili farmakološki pristop. S testom MTS smo ocenili učinke selektivnega agonista receptorja EP₄, PGE1-OH, na proliferacijo celic, živost celic pa smo določili z izključitvenim testom s tripan modrim. Zanimalo nas je, ali aktivacija receptorja EP₄ vodi v od kaspaz odvisno programirano celično smrt, kar smo ugotavljali z merjenjem aktivnosti kaspaz 3 in 7. Z metodo prenosa po westernu smo proučili vpliv aktivacije receptorja EP₄ na fosforilacijo signalnih molekul vpletenih v regulacijo transkripcijskega faktorja NFκB.

V zadnjem delu naloge smo proučili vpliv PGE1-OH na citotoksične učinke doksorubicina in bortezomiba na celice RAMOS in RAJI.

Ugotovili smo, da stimulacija receptorja EP₄ s PGE1-OH zmanjša proliferacijo celic in inducira od kaspaz odvisno apoptozo. Prav tako pa je aktivacija receptorja EP₄ zmanjšala aktivacijo NFκB, saj se je zmanjšala raven fosfo-IκBα in fosfo-p105 ter povečala raven nefosforiliranih proteinov IκBα in p105 v celicah RAMOS. V celicah RAJI ni bilo opaziti bistvenih razlik med proteinoma IκBα in p105 ter njunima fosforiliranima oblikama. Potrdili smo tudi domnevo, da aktivacija receptorja EP₄ preko inaktivacije NFκB, vodi v zmanjšano izražanje antiapoptotskega proteina BCL-xL v celicah RAMOS, medtem ko v celicah RAJI nismo zasledili bistvenih sprememb.

Ugotovili smo tudi, da aktivacija receptorja EP₄ sinergistično poveča citotoksične učinke doksorubicina in bortezomiba na celice RAMOS in RAJI.

V okviru diplomske naloge smo odkrili do sedaj še neprepoznano potencialno uporabo agonistov receptorja EP₄ kot novih učinkovin pri izboljšanju terapije B celičnih levkemij in limfomov.

ABSTRACT

Prostaglandin E receptor type 4 (EP₄) has different physiological or pathophysiological functions, depending on the type of cells and tissues it is expressed in. In B cells, EP₄ has been identified as a negative feedback regulator of proliferation in response to BCR signals. Its tumorsuppressive function contributes to inhibition of growth in malignant mature and immature murine B cells and leads to programmed cell death or apoptosis. EP₄ receptor is a G-protein coupled receptor and its activation by endogenous ligand PGE₂ leads to elevated levels of cAMP and in some cases to activation of cAMP independent pathways including inhibition of NFκB transcriptional activity. NFκB is involved in survival pathways in most of tumor cells and becomes constitutively activated. The aim of our research was to study how stimulation of EP₄ receptor leads to decreased of cell growth or apoptosis in human B cells.

The experimental work was based on pharmacological treatment of human Burkitt lymphoma cell lines, RAMOS and RAJI. We evaluated the effects of EP₄ receptor selective agonist PGE1-OH on proliferation of cells using the MTS assay. We further determined activity of cells by tripan blue exclusion assay. Next we investigated if the activation of EP₄ receptor induces caspase mediated apoptosis. This was determined by measuring caspases 3 and 7 like activity. Furthermore we studied if the involment of NFκB signaling components also play a role in EP₄ receptor mediated effects in human B cells using the immunoblot analysis. In the last part of our experimental work we evaluated the influence of PGE1-OH to the cytotoxic effects of doxorubicin and bortezomib on RAMOS and RAJI cells.

We showed that stimulation of EP₄ receptor conveys inhibitory effects on cell growth and induces caspase mediated apoptosis. The activation of EP₄ receptor leads to decreased NFκB activation, determinated by decreased levels of phospho-IκBα and phospho-p105 and increased levels of an unphosphorylated form of the IκBα and p105 in RAMOS cells. In contrast, significant differences between the IκBα and p105 and their phosphorylated form were not observed in RAJI cells. As we expected, activation of EP₄ receptor leads to decreased NFκB mediated expression of antiapoptotic gene BCL-xL in RAMOS cells, while in RAJI cells we did not observe significant differences.

We found that EP₄ receptor mediated downregulation of BCL-xL could synergistically enhance the toxicity of doxorubicin and bortezomib on RAMOS and RAJI cells.

Here in we provide evidence for yet unrecognized potential usage of EP₄ receptor agonist as chemo-sensitizing agents in B cell lymphoma. Specific down regulation of NFκB dependent pathways in B cell malignancies open new possibilities for treatment and current therapy optimization, using specific EP₄ receptor agonists.

Seznam kratic in okrajšav

AA/BA	akrilamid/bisakrilamid
AC	adenilat ciklaza
AIF	indukcijski faktor apoptoze
AKT	protein kinaza B
ALL	akutna limfocitna levkemija
angl.	angleška beseda
Apaf-1	angl. apoptosis protease activating factor-1
APS	amonijev persulfat
ATM	angl. ataxia telangiectasia mutated
BCL-2	produkt gena bcl-2, ki preprečuje apoptozo
BCL-XL	produkt gena bcl-xl, ki preprečuje apoptozo
BCR	B-celični receptor
B-CLL	kronična limfocitna levkemija B celic
BL	Burkittov limfom
BSA	goveji serumski albumin (angl. bovine serum albumin)
CAD	angl. caspase-activated deoxyribonuclease
CARD	dopolnilna domena (angl. caspase recruitment domain)
cAMP	ciklični adenzin monofosfat
CD	celični označevalec
DED	efektorska domena smrti (angl. death effector domain)
DEVD	zaporedje asparaginska kislina-glutaminska kislina-valin-asparaginska kislina
DD	domena smrti (angl. death domain)
DISC	angl. death-inducing signalling complex
DLBCL	velikocelični difuzni limfom B
DMSO	dimetil sulfoksid
CRE	cAMP odzivni element (angl. cAMP response element)
CREB	CRE vezavni protein (angl. cAMP response element binding protein)
EBNA-1	EBV nuklearni antigen 1 (angl. EBV nuclear antigen 1)
EBNA-2	EBV nuklearni antigen 2

EBV	Epstein-Barr virus (humani herpesvirus 4)
Egr-1	zgodnji rastni faktor 1 (angl. early growth response factor-1)
EP ₄	receptor za prostaglandin E ₂ , podtip 4, prostaglandinski receptor E ₄
ERK	kinaza uravnavana z zunajceličnim signalom (angl. extracellular signal regulated kinase)
EPRAP	z receptorjem EP ₄ povezan protein (angl. EP ₄ receptor-associated protein)
FADD	angl. Fas-associating protein with death domain
Fas	površinska molekula celic T _c , tarča za TNF
FGF-R	angl. fibroblast growth factor receptor
GCSF	granulocitne kolonije stimulirajoči faktor
GSK-3	glikogen sintazna kinaza 3
HAART	angl. highly active antiretroviral therapy
HSV 1	herpes simplex virus 1
ICAD	angl. inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease
IFN- γ	interferon γ
I _G H	imunoglobulinska težka veriga
I _G V _H	variabilni del težke verige imunoglobulina
I κ B	inhibitorni protein NF kappa B
IKK	kinaza inhibitornih proteinov I kappa B
IL	interlevkin
LMP-1	angl. EBV latent membrane protein 1
MAP	z mitogenom aktiviran protein (angl. mitogen activated protein)
MAPK	z mitogenom aktivirana proteinska kinaza (angl. mitogen activated protein kinase)
MCP-1	kemoatraktantni protein 1 za monocite (angl. monocyte chemoattractant protein 1)
M-CSF	makrofagne kolonije stimulirajoči faktor (angl. macrophage-colony-stimulating factor)
MHC II	poglavitni histokompatibilnostni kompleks II (angl. class II major histocompatibility complex)
mTOR	angl. mammalian target of rapamycin

MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol
NEMO	drugo ime za kinazo IKK γ (angl. NF κ B essential modifier)
NF κ B	jedrni dejavnik kappa B (transkripcijski faktor)
NIK	kinaza, ki inducira aktivacijo NF κ B (angl. NF κ B inducing kinase)
NLS	angl. nuclear localization sequence
p50, p105	proteina NF κ B1, p50 in njegov prekurzor p105
p52, p100	proteina NF κ B2, p52 in njegov prekurzor p100
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
PDK-1	angl. phosphoinositide dependent kinase-1
PGE ₁ .OH	prostaglandin E ₁ alkohol, agonist receptorja EP4
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PI3K	fosfatidilinozitol 3-kinaza
PKA	proteinska kinaza A
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluorid
<i>Ptger4</i>	gen, ki kodira receptor EP ₄
RAMOS	celična linija, ki izvira iz humanega Burkittovega limfoma
RANKL for	ligand aktivatorja receptorja jedrnega faktorja NF- κ B (angl. receptor activator NF- κ B ligand)
RPMI	kratica izvira iz <u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute, kjer so medij RPMI razvili Moore in sodelavci
SDS	natrijev dodecil sulfat (angl. sodium dodecyl sulfate)
SLB	nanašalni pufer (angl. sample loading buffer)
Smac/DIABLO	ang. second mitochondrial activator of caspases
TBS	tris pufer s soljo (angl. Tris-buffered saline)
TCF	T-celični faktor (angl. T-cell factor)
TCR	T-celični receptor
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
Th1, Th2	celice T pomagalk
TNFR1	receptor za dejavnik tumorske nekroze tipa 1
TNF- α	dejavnik tumorske nekroze α (angl. tumor necrosis factor α)

tmTNF- α	transmembranski dejavnik tumorske nekroze α
TRADD	angl. TNF receptor associated protein with death domain
TRAIL	apoptozo inducirajoči ligand, soroden TNF (angl. TNF related apoptosis inducing ligand)
TRAIL-R1	apoptozo inducirajoči ligand receptor 1, soroden TNF (angl. TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1)
TRAIL-R2	apoptozo inducirajoči ligand receptor 2, soroden TNF (angl. TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 2)
TRIS	tris (hidroksimetil)-aminometan
TTBS	TBS z dodanim Tween 20
TWEEN 20	polioksietilen sorbitan monolavrat
VEGF-A	vaskularni endotelijski rastni faktor A
XIAP	angl. X-linked inhibitor of apoptotic protein

1 UVOD

1.1 B LEVKEMIJE IN LIMFOMI

1.1.1 Levkemije

Levkemije so rakaste novotvorbe krvotvornega tkiva, katerih značilnost je kopičenje enega klona nenormalnih in nefunkcionalnih krvnih celic v kostnem mozgu in v krvi. Delimo jih glede na vrsto celic v limfatične (B ali T) in mieloične levkemije ter glede na razvojno stopnjo levkemičnih celic in hitrost poteka bolezni v akutne (hitro potekajoče) in kronične (dolgotrajne) levkemije (1).

Akutna limfatična levkemija (ALL) je rak nezrelih limfocitov B ali T, ki se kopičijo v kostnem mozgu in periferni krvi in ki ohranijo sposobnost neprestane delitve, izgubijo pa sposobnost dozorevanja. Večina ALL je B-celičnih, za katere so značilni celični imunološki označevalci CD19, CD22, CD79a in/ali CD10. Za ALL so značilne recipročne kromosomske translokacije, katerih posledica je nov, fuzijski gen. Najpogostejše kromosomske translokacije so t(9;22) (Philadelphia kromosom), ki tvori BCR-ABL fuzijski gen, t(12;21), ki kodira TEL-AML1 fuzijski protein in t(4;11). Ostale citogenetične nepravilnosti so trisomija kromosoma 8, delecija kromosoma 7 in hiperdiploidija (2).

Kronična limfocitna levkemija B celic (B-CLL) je rak zrelih limfocitov, ki v 95 % pripadajo limfocitom B. Nastane zaradi nekontroliranega razraščanja limfocitov B, ki se kopičijo v kostnem mozgu, kjer se normalno nahajajo, in prehajajo v kri. Označevalci značilni za B-CLL so CD19, CD22, CD20, CD23, CD79a, CD43 in CD5, medtem ko je izraženost površinskega IgM slaba. Odsotna sta CD10 in ciklin D1. Najpogostejše kromosomske nepravilnosti so trisomija 12, delecija 13q14, delecija 11q22-23, delecija 6q21 in delecija 17p13 (p53 lokus) (3). Čeprav geni, ki so vključeni v te poškodbe, niso znani, je verjetno, da je pri deleciji 17p13 vključena delecija p53, pri deleciji 11q22-13 pa gen ATM (angl. ataxia telangiectasia mutated gene). Oba gena regulirata apoptozo in v primeru odsotnosti prispevata k rezistenci na kemoterapijo. Hitrejši potek bolezni napoveduje prisotnost nemutiranega gena za variabilni del težke verige imunoglobulina (IgV_H), medtem ko imajo bolniki z mutiranim genom IgV_H

indolenten potek bolezni. Kljub temu lahko pri obeh najdemo podobnosti v aminokislinskem zaporedju B-celičnega receptorja (BCR). Antigeni, ki jih mutirani BCR-ji prepoznavajo, so v nekaterih primerih antigeni mikrobov, velikokrat pa so to avtoantigeni, saj mnogo limfocitov B pri kronični limfocitni levkemiji izloča avtoreaktivna protitelesa. Ta odkritja kažejo, da B limfociti izvirajo iz avtoreaktivnih B celičnih prekurzorjev, ki so kljub različnim mehanizmom negativne selekcije ohranili neprimerno specifičnost za vezavo antigenov (4).

1.1.2 Limfomi

Limfom je maligni tumor, ki izvira iz limfocitov B, T ali naravnih celic ubijalk. Nastane zaradi nenadzorovanega razraščanja celic limfatičnega tkiva. Glede na izvor maligne celice, histološko sliko, klinično sliko, potek in prognozo delimo limfome na Hodgkinov limfom in neHodgkinove limfome (2).

Večina limfomov je B-celičnih in predstavljajo različne stopnje v zorenju limfocitov B. Limfomi so posledica kromosomskih translokacij ali mutacij, virusnih ali bakterijskih okužb in dejavnikov iz okolja. Za večino limfocitov B z zrelim fenotipom so značilne recipročne kromosomske translokacije, ki vključujejo enega izmed imunoglobulinskih genskih segmentov in protoonkogen (npr. c-myc). Translocirajo se tudi geni vključeni v uravnavanje celičnega cikla (npr. gen za ciklin D1), diferenciacije (npr. bcl-6, PAX5) ali preživetja celic (npr. bcl-2, NFκB). Posledica takih translokacij je, da aktivirani imunoglobulinski lokus nadzoruje translocirani gen in povzroči njegovo nekontrolirano, konstitutivno ekspresijo. Pogoste so tudi mutacije, ki inaktivirajo tumor supresorske gene (p53, p16). Izražanje večine the genov nadzorujejo signali, ki izvirajo iz receptorja BCR. Preživetje in/ali proliferacija mnogih B limfomov je odvisna od ekspresije BCR in njegove aktivacije z antigeni, ki so pomembni dejavniki pri patogenezi mnogih limfomov (5,6).

Burkittov limfom (BL) je visoko agresiven limfom zrelih limfocitov B, ki ga uvrščamo med ne-Hodgkinove limfome. Glede na klinične in geografske lastnosti ga razdelimo na tri oblike: endemična, sporadična in oblika imunske pomanjkljivosti (okvara imunskega sistema). Za vse tri podtipje je značilna kromosomska sprememba v c-myc onkogenu. Najpogosteje gre za kromosomsko translokacijo c-myc iz 8. kromosoma k lokusu za težko verigo IgH na 14.

kromosomu, t(8;14). Znani sta še dve kromosomski translokaciji t(2;8) in t(8;22). Pri endemični obliki se mesto preloma običajno pojavi na kromosomu 8 pri več kot 100 kb v smeri od prve kodirajoče regije c-myc gena, ki je pod kontrolo E μ ojačevalca gena IgH. Pri sporadični obliki in obliki imunske pomanjkljivosti se mesto preloma pojavi med 1. in 2. eksonom gena c-myc znotraj S μ regije gena IgH. C-myc onkogen je transkripcijski dejavnik, ki vpliva na transkripcijo beljakovin vpletenih v regulacijo celičnega cikla, celične rasti, apoptoze, celične adhezije in proliferacije (7).

Endemična oblika je najpogostejša pri otrocih, starih 4-7 let v ekvatorialni Afriki. Običajno prizadene čeljust in ledvice, čeprav so opazili, da prizadene tudi druge organe: jajčnike, dojki, tanko in slepo črevo ter ekстранodalne predele. Geografsko območje BL sovpada s porazdelitvijo endemične malarije. Incidenca je 50x višja kot v ZDA. Sporadična oblika predstavlja 1 do 2 % vseh odraslih limfomov in do 40 % vseh limfomov pri otrocih v zahodni Evropi in ZDA. Obliki imunske pomanjkljivosti so opazili pri bolnikih, ki so okuženi z virusom HIV. Ta dva podtipa BL najpogosteje prizadeneta abdominalne organe, lahko tudi bezgavke in kostni mozeg (8). Približno 90 % bolnikov z endemičnim BL in 30 % s sporadičnim BL je okuženih z Epstein-Barr virusom (EBV) (9). Pogosto je prisoten tudi pri bolnikih okuženih z virusom HIV (8). Dolgo časa je BL veljal za bolezen, ki jo povzroča EBV, saj se je pojavljal pri afriških EBV pozitivnih otrocih. Hipoteza je bila ovržena, ko so drugje po svetu našli EBV negativen BL (10). Okužba z EBV bi lahko bila predispozicija za genetske napake, ki se pojavljajo v zorenju B-celic. *In vitro* študija na EBV pozitivnih transgenih miših je pokazala, da naj bi bil protein EBNA-1 (angl. EBV nuclear antigen 1), ki se izraža pri BL, onkogen (11). Kasnejše študije *in vivo* razkrivajo, da ne obstaja korelacija med EBV in apoptotskimi markerji (12). Iz tega lahko sklepamo, da EBV ni pogoj za razvoj BL, ampak le olajša preživetje limfocitov B s translociranim c-myc, iz katerih se BL razraste (10).

Glede na morfološke značilnosti BL razdelimo na dve skupini, klasično in atipično ali BLL (angl. Burkitt-like lymphoma). Za klasični BL so značilne srednje velike celice z obilico bazofilne citoplazme, ki vsebujejo maščobne vakuole in okrogla jedra z grobozrnatim kromatinom in več zrci. BLL ima jedra različnih oblik in velikosti z manj zrci ter je vmesna oblika med velikoceličnem difuznem limfomom B (DLBCL) in BL (7). Limfoma sta si po morfoloških lastnostih zelo podobna, ločimo ju lahko na osnovi imunofenotipa. Celice BL na

površini izražajo IgM, Bcl-6, CD19, CD20, CD22, CD10, CD43, p53 in CD79a ter so negativne za CD5, CD23, Bcl-2, CD138 in TdT. Tumor supresorski gen p53 je pri mnogih bolnikih z BL mutiran (11). Celice DLBCL so Bcl-2 pozitivne in CD10 negativne ter imajo tudi translociran c-myc, vendar le med 5 in 15 %. V BL se c-myc stalno izraža (13,8). Ločevanje med njima je nujno, saj je terapija precej drugačna in pri pacientih z lažno določenim BL povzroča relaps (14).

1.1.3 Terapija B-limfocitnih malignih obolenj

Bolnike z malignimi limfomi zdravimo s sistemsko terapijo (citostatiki, biološka zdravila) in obsevanjem z ionizirajočimi žarki ter presaditvijo kostnega mozga. Bolniki prejemajo kombinacije citostatikov po določenih shemah v točno določenem časovnem zaporedju. Najbolj učinkoviti pri zdravljenju limfomov so:

- antraciklinski antibiotiki (doksorubicin, epidoksorubicin);
- alikilirajoči citostatiki (ciklofosfamid, ifosfamid, klorambucil, dakarbazin, karmustin, meklorektamin);
- vinka alkaloidi (vinkristin, vinblastin);
- druge protitumorne učinkovine (prokarbazin, etopozid, bleomicin, fludarabin, metilprednizolon).

Pri agresivnih oblikah v citostatske sheme vključimo tudi druge antimetabolite (metotreksat, citozin arabinozid, merkaptopurin, tiogvanin). Pri zdravljenju bolnikov z indolentnimi in agresivnimi ne-Hodgkinovimi limfomi uporabljamo monoklonska protitelesa samostojno ali v kombinaciji s citostatiki. Monoklonska protitelesa se vežejo na značilne strukture na membranah B celičnih limfomov in delujejo direktno citotoksično ali preko aktivacije komplementa ali spodbuditve apoptoze (rituksimab - protitelo proti CD20 determinanti, alemtuzumab – protitelo proti CD52 determinanti) (15).

Maligni limfociti B izražajo CD74 v nasprotju z normalnimi limfociti B. CD74 je integralni protein, ki deluje kot molekularni spremljevalec poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa II (MHC II). Humano protitelo proti CD74 (milatuzumab) že kaže vzpodbudne učinke v predkliničnih študijah in je zato nova tarča B-celičnih malignih obolenj. Predvsem

učinkoviti so konjugati z radioizotopi, toksini in RNA-azami, saj CD74⁺ maligne celice internalizirajo protitelo proti CD74, kjer le-ta deluje ciljano, znotraj celice (16).

Levkemije se zdravijo s podobnimi pristopi kot limfomi (15). V terapiji akutnih levkemij se uporablja imatinib kot selektivni inhibitor BCR-ABL tirozin kinaze (produkt fuzijskega proteina pri Philadelphia kromosomu) (17). V kliničnih preizkušnjah za kronično limfocitno levkemijo so monoklonska protitelesa proti HLA-DR, proti CD40, proti CD37, proti DR4 (TRAIL-R1) in DR5 (TRAIL-R2) ter inhibitor od ciklina odvisne kinaze flavopiridol (18).

Burkittov limfom zdravimo z različnimi terapijami, najučinkovitejši so kratkotrajni intenzivni režimi. Bolnike z nizko stopnjo tveganja in bolnike z visoko stopnjo tveganja lahko zdravimo z naslednjimi kemoterapevtičnimi režimi:

- Modificiran CODOX-M (ciklofosfamid, vinkristin, doksorubicin, visok odmerek metotreksata) z ali brez rituksimaba, trije cikli pri bolnikih z nizko stopnjo tveganja.
- Modificiran CODOX-M/IVAC (ifosfamid, etopozid, visok odmerek citarabina) z ali brez rituksimaba, štiri cikli pri bolnikih z visoko stopnjo tveganja.
- HiperCVAD (ciklofosfamid, vinkristin, doksorubicin, deksametazon) z rituksimabom, prilagojen odmerek EPOCH (etopozid, prednizon, vinkristin, ciklofosfamid, doksorubicin) z rituksimabom ali režim CALGB 9251 (intenzivna kemoterapija z ali brez kranialne radioterapije) (19).

Rituksimab je monoklonsko protitelo proti CD20 antigenu, ki se izraža tudi na celicah BL. Uporablja se v kombinaciji s hiperCVAD, EPOCH in CODOX-M/IVAC ter prispeva k večji učinkovitosti terapije in izboljša izid zdravljenja. Vsi omenjeni režimi imajo visoko stopnjo preživetja, vendar imajo številne toksične učinke. CODOX-M/IVAC in hiperCVAD povzročata hude infekcije, nevtropenijo, mukozitis, trombocitopenijo in cerebralno toksičnost. CALGB povzroča periferno nevropatijo, demenco, mielitis, afazijo in kortikalno slepoto. Mnogim režimom zdravljenja so dodali glivično, bakterijsko in virusno profilakso ter granulocitne kolonije stimulirajoči faktor (GCSF), da bi zmanjšali toksične učinke. Zaradi neželenih stranskih učinkov so v razvoju nove terapijske strategije, ki so usmerjene k znanim molekularnim in genetskim nepravilnostim BL. V razvoju so različni pristopi, med temi so

inhibitorji DNA metiltransferaze, inhibitorji histon deacetilaze, protismiselno oligonukleotidno ciljanje c-myc, inhibitorji proteasoma, inhibitorji od ciklina odvisne kinaze, selektivni inhibitorji serotoninskega privzema (SSRIs) in inhibitorji EBV sorodnih virusnih proteinov (7,8). HIV⁺ bolniki z BL se uspešno zdravijo z intenzivno kemoterapijo s podporno transfuzijo in antibiotično terapijo. Dodatek HAART (angl. highly active antiretroviral therapy) izboljša izid zdravljenja in zmanjša nevarnost oportunističnih okužb (7).

1.2 APOPTOZA

Apoptoza ali programirana celična smrt je normalen fiziološki proces, ki omogoča vzdrževanje homeostaze tkiv, uravnava imunski sistem in odstranjuje poškodovane celice. Proces apoptoze je natančno programiran in kodiran v celičnem genskem zapisu.

Neppravilno delovanje ali moteno uravnavanje apoptoze vodi v številna patološka stanja. Odsotnost apoptoze lahko privede do rakavih obolenj, avtoimunskih bolezní ali do širjenja virusnih okužb, medtem ko prekomerna apoptoza vodi v nevrodegenerativne bolezni, sindrom pridobljene imunske pomanjkljivosti (AIDS) in ishemične bolezni.

Za apoptotično celico so značilne naslednje morfološke spremembe: krčenje volumna celice, izguba stika s sosednjimi celicami, kondenzacija kromatina, fragmentacija DNA, brstenje membrane ter nastanek apoptotskih teles, ki jih fagocitirajo makrofagi, tako da ne škodujejo sosednjim celicam in ne povzročajo vnetja v nasprotju z nekrozo (20,21).

Osrednjo vlogo pri uravnavanju apoptoze imajo encimi, ki jih imenujemo kaspaze (22).

1.2.1 Kaspaze

Kaspaze so aspartat specifične cisteinske proteaze, ki cepijo peptidno verigo za aspartatom. V aktivnem mestu imajo aminokislino cistein. Sestavljene so iz N-terminalne prodomene, velike in male podenote. Pri sesalcih je poznanih 14 kaspaz. Prva odkrita sesalska kaspaza je kaspaza-1, ki je interleukin-1 β -konvertirajoči encim (angl. interleukin-1 β -converting enzyme; ICE). V celici se sintetizirajo kot neaktivni proencimi (zimogeni), ki čakajo signal za začetek apoptoze. Signal sproži odcepitev prodomene in združitvev dveh malih in dveh velikih podenot v tetramer, ki predstavlja aktivno kaspazo. Kaspaze 1, 4, 5, 11 in 12 sodelujejo pri vnetnih procesih. Kaspaze 3, 9, 8, 2, 6, 7 in 10 pa igrajo pomembno vlogo v apoptozi. Proapoptotične

kaspaze lahko razdelimo v dve skupini, in sicer na sprožitvene kaspaze (kaspaze 2, 8, 9 in 10) in izvršiteljske kaspaze (kaspaze 3, 6 in 7) (21,23).

Sprožitvene kaspaze imajo dolge prodomene, kot sta DED domena (angl. death effector domain) (prokaspazi 8 in 10) ali CARD domena (angl. caspase recruitment domain) (prokaspazi 2 in 9). Zaradi afinitete do lastnega tetrapeptidnega zaporedja so sposobne samoaktivacije in aktivirajo tudi druge kaspaze. Izvršiteljske kaspaze imajo kratke prodomene, niso sposobne samoaktivacije, lahko pa jih aktivirajo sprožitvene kaspaze (22,24).

Osrednjo vlogo igra kaspaza 3, ki lahko aktivira druge kaspaze in je hkrati glavna izvršiteljska kaspaza. Kaspaza 7 je homologna kaspazi 3. Kaspaza 3 je odgovorna za značilne morfološke spremembe v apoptotski celici (kondenzacija kromatina, fragmentacija DNA, brstenje citoplazme). Po aktivaciji potuje v jedro, kjer cepi beljakovine ICAD (angl. inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease) in lamine. Po cepitvi ICAD, CAD (angl. caspase-activated deoxyribonuclease) postane aktivna in cepi jedrno DNA (22).

Apoptozo lahko sprožijo zunanji dražljaji, ki se vežejo na celične receptorje od zunaj, ali pa notranji signali, ki izvirajo iz notranjosti celice (npr. poškodba DNA zaradi napak v popravljalnih mehanizmih, oksidativnega stresa, stresa ob stradanju, delovanja kemoterapevtikov) (20).

Poznane so tri signalne poti, ki lahko sprožijo apoptozo (slika 1):

- zunanja (ekstrinzična pot)
- notranja (intrinzična pot)
- sproščanje vsebine zrnc iz citotoksičnih limfocitov T in naravnih celic ubijalk (ob določenih dražljajih izločijo perforin, ki naredi pore v celični membrani, skozi katere vstopi grancim B v celico in aktivira kaskado kaspaz) (22).

Ekstrinzična pot apoptoze

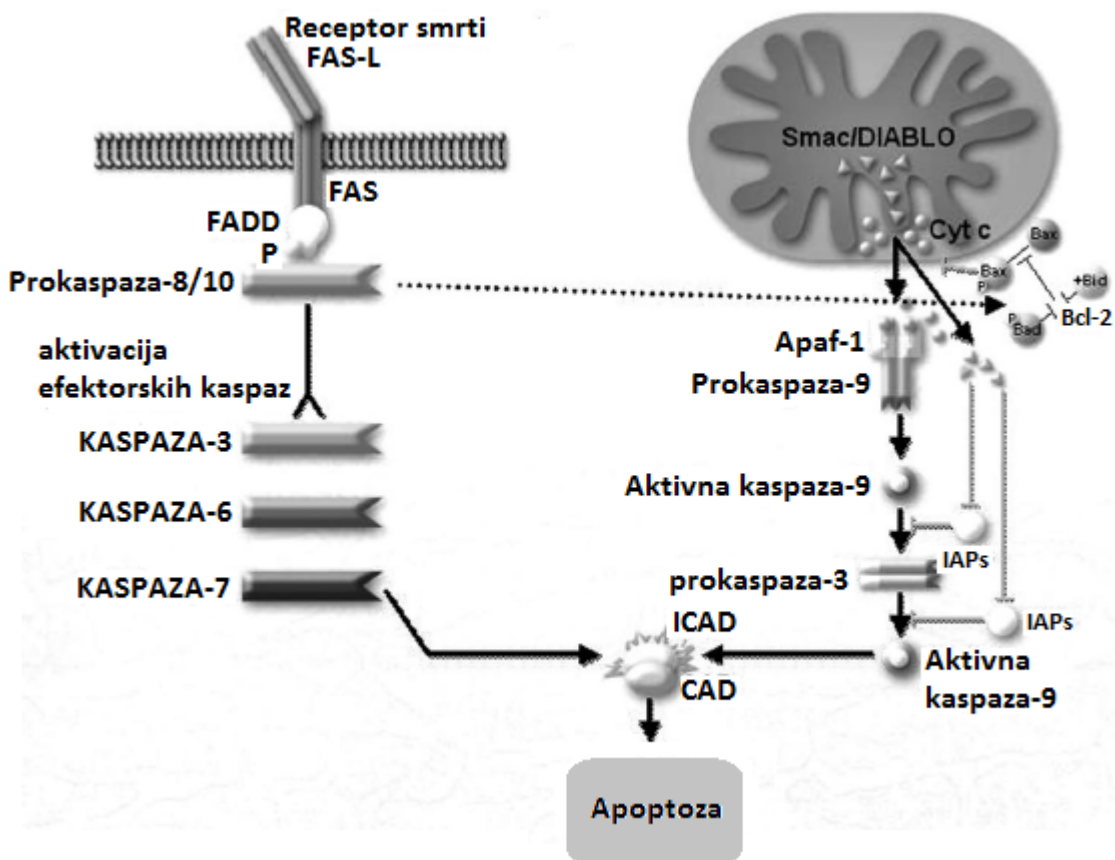
Ekstrinzično pot apoptoze sprožijo specifični ligandi, ki se vežejo na celične receptorje oz. na receptorje smrti od zunaj, med katere uvrščamo TNFR1, Fas/CD95 in TRAIL receptorja (TRAIL-R1 ter TRAIL-R2). Na zunanji strani membrane imajo vsi ti receptorji s cisteinom bogata prepoznavna mesta za specifične ligande. Na notranji strani pa imajo DD domeno (angl. death domain) za vezavo adaptorskih molekul. Adaptorski molekuli FADD (angl. Fas-

associating protein with death domain) in TRADD (angl. TNF receptor associated protein with death domain) imata poleg DD domene, tudi vezavno mesto za DED domeno, na katero se veže prokaspaza 8 z istoimensko domeno. Po vezavi kaspaze 8 nastane DISC kompleks (angl. death-inducing signalling complex). Aktivacija kaspaze 8 sproži aktivacijo izvršiteljskih kaspaz (20,22).

Intrinzična pot apoptoze

Intrinzično pot apoptoze sprožijo smrtni signali iz notranjosti celice. Apoptotični dražljaji sprožijo sproščanje citokroma C iz mitohondrija. Citokrom C skupaj s proteinom Apaf-1 (angl. apoptosis protease activating factor-1) v odvisnosti od ATP inducira nastanek apoptosoma in aktivira prokaspazo 9. Apoptosom je proteinski kompleks, ki tvori strukturo v obliki okroglega heptamera. Protein Apaf-1 ima CARD domeno na katero se veže prokaspaza 9 z istoimensko domeno v notranjost apoptosoma. Po aktivaciji kaspaze 9 se aktivirajo izvršiteljske kaspaze (25). Mitohondrijska pot je pod strogim nadzorom regulatornih mehanizmov, ki so odvisni od članov družine Bcl-2.

V nekaterih celicah signal ni dovolj močan za izvedbo celične smrti preko kaskadne reakcije, zato ga je potrebno okrepiti z mitohondrijsko potjo. Intrinzično in ekstrinzično pot povezuje protein Bid, ki pripada družini proteinov Bcl-2. Sprosti se po delovanju aktivirane kaspaze 8 in se v obliki tBid translocira do mitohondrija, kjer povzroči skupaj z drugimi proapoptotičnimi proteini sproščanje citokroma C in drugih mitohondrijskih proapoptotičnih dejavnikov (20).



Slika 1: Zunanja in notranja pot apoptoze (30).

1.2.2 Bcl-2 družina proteinov

Bcl-2 proteini uravnavajo intrinzično pot apoptoze. V sekvenčnem zaporedju imajo do štiri konzervativne Bcl-2 homologne domene (BH1, BH2, BH3 in BH4). Delimo jih na antiapoptotske ter na proapoptotske proteine (26). Med antiapoptotske uvrščamo BCL-2, BCL-xL, BCL-w, A1 in MCL-1 proteine, ki imajo vse štiri domene. Proapoptotsko skupino pa lahko razdelimo na dve podskupini, in sicer na podskupino, ki jo sestavljajo Bax, Bak in Bok proteini z BH1, BH2 in BH3 domenami ter na podskupino, ki ima le BH3 domeno (Bid, BIM, Bik, Bad, BMF, HRK, Noxa, Puma, Blk, BNIP3 in Spike). Njihova glavna naloga je varovanje mitohondrijske integritete in kontrola sproščanja mitohondrijskih proteinov v citoplazmo (27).

Proapoptotska člana Bax in Bak med apoptozo spremenita svojo konformacijo in integrirata v zunanjo mitohondrijsko membrano, kjer oligomerizirata in tvorita pore in tako prispevata k prepustnosti zunanje mitohondrijske membrane (20). Antiapoptotski člani pa se vežejo na

BH3 domeno proapoptotskih proteinov in tako preprečijo aktivacijo proteinov Bax in Bak ter zavirajo mitohondrijske proapoptotične dogodke. Povzročijo povečano izražanje proteinov BCL-xL in BCL-2, stabilizirajo transmembranski potencial, preprečijo prepustnost zunanje mitohondrijske membrane ter zavirajo sproščanje citokroma C (28). Posredno tudi nadzirajo aktivacijo apoptosoma in zavirajo apoptotično pot, ki je neodvisna od Apaf-1/kaspaza 9.

Proteini, ki vsebujejo samo BH3 domeno uravnava ravnovesje med proapoptotskimi in antiapoptotskimi člani družine Bcl-2. Proteina Bid in Bim neposredno povzročita oligomerizacijo Bax/Bak, medtem ko Bad in Bik sodelujeta z antiapoptotskimi proteini. Apoptotični signali aktivirajo Bad/Bik, ki izpodrine Bid/Bim iz vezavnega mesta BCL-xL/BCL-2 in izzovejo oligomerizacijo Bax/Bak in sproščanje citokroma C, indukcijskega faktorja apoptoze (AIF), proteina Smac/DIABLO in drugih proapoptotičnih faktorjev (29).

Izražanje antiapoptotskih genov družine Bcl-2 in inhibitorjev kaspaz inducira NF κ B, ki deluje kot pro-preživetveni transkripcijski faktor (20).

1.2.3 NF κ B v apoptozi

Jedrni transkripcijski faktor NF κ B je proteinski kompleks, ki sodeluje pri celičnem odzivu na različne dražljaje (stres, citokini, prosti radikali, UV obsevanje, bakterijski ali virusni antigeni), uravnava imunski odziv in izražanje številnih genov (BCL-2, BCL-xL, cIAP, suvivin, TRAF, COX-2, MMP-9, iNOS) ter regulatorjev celičnega cikla. Nepravilno delovanje vodi v vnetne in avtoimune bolezni, nastanek in širjenje raka ter rezistenco rakavih celic na mnoga zdravila. Z blokiranjem NF κ B signalne poti lahko ustavimo širjenje raka in povečamo občutljivost rakavih celic na delovanje protitumorih zdravil (31).

Prvotno je bil odkrit v mišjih limfocitih B. Sesalski NF κ B vključuje pet članov, in sicer: RelA (p65), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF κ B1) in p52/p100 (NF κ B2), ki so v obliki homo- ali heterodimerov vezani z inhibitorji proteini I κ B (angl. inhibitor of nuclear factor NF κ B, I κ B). Ti kompleksi se nahajajo v neaktivni obliki v citoplazmi. NF κ B1 in NF κ B2 se sintetizirata v obliki večjih prekurzorjev (p105 in p100), ki delujeta hkrati kot inhibitorna proteina, saj šele post-translacijsko proteolitično procesiranje omogoči nastanek zrelih p50 in p52 proteinov NF κ B (32).

Med I κ B proteine uvrščamo I κ B α , I κ B β , p105, p100 in I κ B ϵ . Imajo od pet do sedem ankirinskih ponovitev s katerimi tvorijo komplekse z dimeri NF κ B. Aktivacijo NF κ B

inhibirajo tako, da zakrijejo NLS zaporedja (angl. nuclear localization sequence) proteinov NF κ B. Dinamično ravnovesje med kompleksi I κ B/ NF κ B med jedrom in citoplazmo uravnava IKK (kinaza inhibitornih proteinov κ B, angl. I κ B kinase). IKK je sestavljena iz 2 katalitičnih podenot, IKK α in IKK β ter regulatorne podenote IKK γ (znana tudi kot NEMO, angl. NF κ B essential modifier). Aktivacija IKK kompleksa povzroči fosforilacijo I κ B proteinov in inducira njihovo razgradnjo, kar omogoča sprostitev prostih NF κ B ter njihov transport v jedro, kjer regulirajo transkripcijo številnih genov.

Poznani sta dve signalni poti NF κ B, klasična (kanonična) in alternativna pot (slika 2).

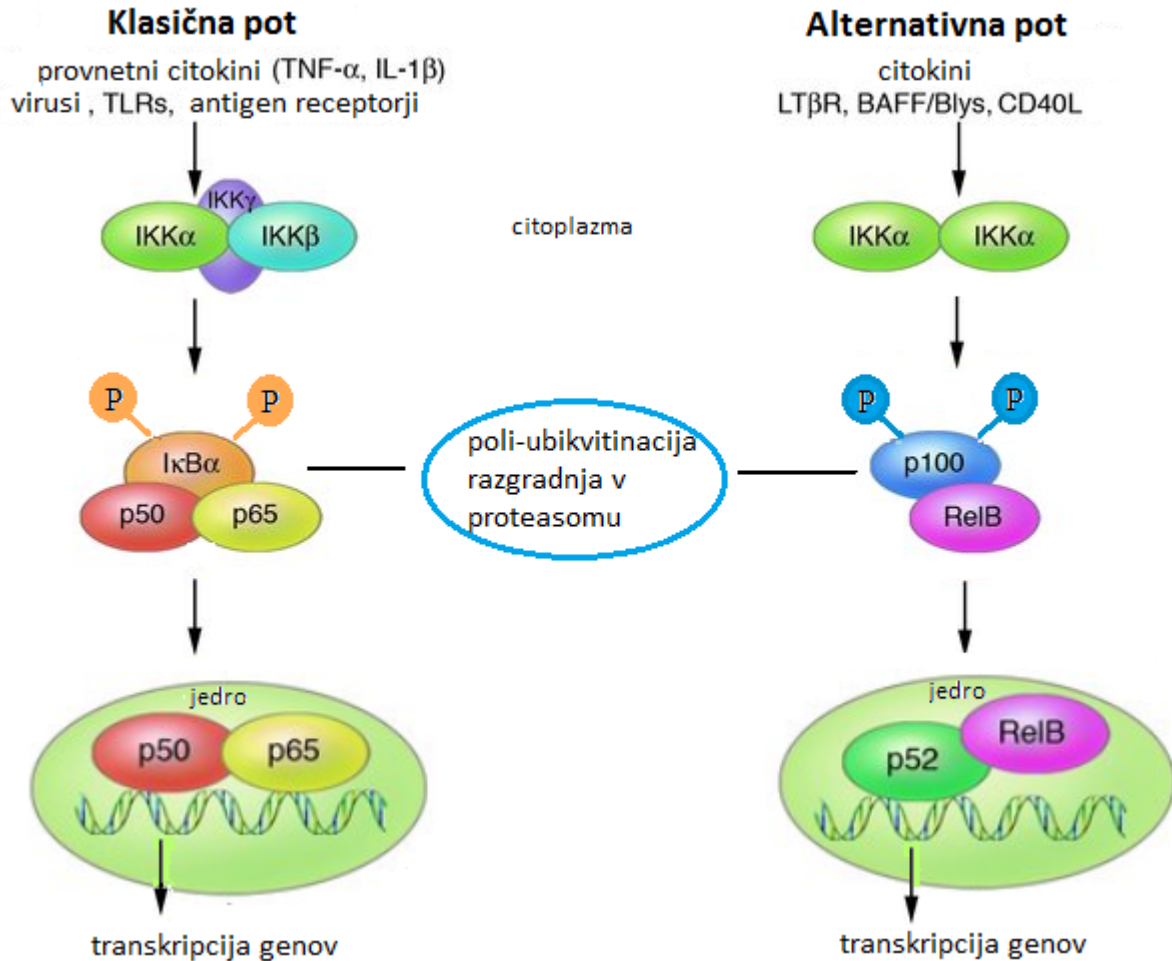
Klasična (kanonična) pot

Številni stimuli vodijo do aktivacije IKK β in IKK γ . Aktivirani kompleks IKK fosforilira I κ B α proteine na dveh serinskih preostankih na N-terminalnih delih. Fosforilirane proteine prepozna ubikvitinon ligaza, ki povzroči poli-ubikvitinacijo in razgradnjo v 26S proteasomu. Prosti NF κ B dimeri se translocirajo v jedro, kjer regulirajo transkripcijo tarčnih genov.

Alternativna pot

Številni stimuli vodijo do aktivacije IKK α preko kinaze NIK (angl. NF κ B inducing kinase). Aktivirana IKK α kinaza fosforilira p100, čemur sledi poli-ubikvitinacija in indukcija proteolize p100 v p52 s strani proteasoma. Prosti NF κ B dimeri se translocirajo v jedro, kjer regulirajo transkripcijo tarčnih genov.

Klasična pot ima glavno vlogo pri uravnavanju prirojene imunosti in vnetja. Alternativna pot pa uravnava razvoj in preživetje limfocitov B (31).



Slika 2: Klasična (kanonična) in alternativna pot NF κ B (33).

Kanonično pot aktivacije NF κ B sprožijo številni stimuli: provnetni citokini (TNF- α , dejavnik tumorske nekroze α), s patogeni povezani molekularni vzorci, ki se vežejo na receptorje prirojene imunosti, signali posredovani preko T-celičnega (TCR) in B-celičnega (BCR) receptorja ter stimuli posredovani preko limfocitnih koreceptorjev. Alternativno pot aktivacije NF κ B sprožijo površinski receptorji superdružine TNF, kot so CD40, receptor za limfotoksin β ter receptor BAFF (32).

Aktivacija NF κ B je v normalnih celicah prehodna in inducibilna. V tumorskih celicah pa NF κ B izgubi svojo prehodno aktivacijo in postane konstitutivno aktiviran (34). Konstitutivna aktivnost NF κ B je povezana s preživetjem celic, napredovanjem malignih obolenj in rezistenco rakavih celic na kemoterapevtike. Čeprav natančni mehanizmi, ki vodijo v

povečano aktivacijo NF κ B še niso poznani, so številne študije pokazale, da lahko povečana razgradnja I κ B proteinov ter neobičajno aktivirana IKK kinaza privedeta do konstitutivne aktivacije NF κ B. V celicah RAJI je za konstitutivno aktivnost NF κ B odgovoren endogeni tmTNF- α (transmembranski dejavnik tumorske nekroze α) (35). Odkrili so tudi, da EBNA-2 (angl. EBV nuclear antigen 2) in LMP-1 (angl. EBV latent membrane protein 1) povečata aktivnost NF κ B pri Burkittovem limfomu z EBV virusom (36). V celicah RAMOS je NF κ B tudi konstitutivno izražen, vendar mehanizem še ni poznan (37,38).

Aktivacijo NF κ B v nezrelih in zrelih B celicah modulira EP₄ receptor (42,43).

1.2.4 Modulacija apoptoze kot terapevtski pristop

Napake v regulaciji programirane celične smrti (apoptoze) so vzrok mnogih bolezni, za katere še ne obstajajo učinkoviti načini zdravljenja. Razvoj potencialnih terapevtskih tarč za te bolezni so zato osredotočene na možnosti uravnavanja aktivnosti beljakovin povezanih s proapoptotskimi ali antiapoptotskimi učinki (26).

Inhibicija antiapoptotskih signalnih poti

- Inhibitorji proteinskih kinaz (Imatinib (Glivec[®]) je inhibitor tirozinske kinaze za zdravljenje levkemije in gastrointestinalnih tumorjev; Iressa/ZD 1839 in Tarceva[™]/OSI-774 sta inhibitorja kinaze FGF-R (angl. fibroblast growth factor receptor) za zdravljenje pljučnega raka; flavopiridol je inhibitor od ciklina odvisne kinaze za zdravljenje kronične limfocitne levkemije) (26).
- Nasprotnosmiselni oligonukleotidi, ki utišajo izražanje tarčnega gena, tako da hibridizirajo z njegovo mRNA. (Oblimersen je nasprotnosmiselni oligonukleotid proti BCL-2, SPC2996 je nasprotnosmiselni oligonukleotid proti BCL-xL, LY2181308 je nasprotnosmiselni oligonukleotid proti survivinu, AEG35156 je nasprotnosmiselni oligonukleotid proti XIAP (angl. X-linked inhibitor of apoptotic protein)) (39).
- Nizkomolekularni inhibitorji ali mimetiki, ki prepoznajo vezavno mesto za BCL-2 in BCL-xL ter tako sprožijo apoptozo (HA14-1, ki se veže v žep BCL-2; sintetični BH3 peptidi, ki oponašajo domeno BH3, inducirajo apoptozo preko inhibicije antiapoptotskih proteinov BCL-2) (30).

- Inhibitorji modulatorjev apoptoze: proteasomski inhibitorji zavirajo angiogenezo in metastaziranje ter inducirajo apoptozo (laktacistin, MG132, ALLN, MG115, bortezomib...); inhibitorji NF κ B zavirajo I κ B kinazo in tako preprečijo fosforilacijo proteinov I κ B (PS-1,145); inhibitorji mTOR (angl. mammalian target of rapamycin) zavirajo PI3K/Akt pot (CCI-779, RAD001); inhibitorje p53 uvedemo z gensko terapijo, tako da z virusom, ki nosi zapis za divji tip gena p53 okužimo rakave celice, čemur sledi indukcija apoptoze (ONYX-015, INGN201) (30).

Inhibicija proapoptotskih signalnih poti

- Inhibitorji kaspaz (IDN-6556 je inhibitor kaspaz 3 in 7 in je v fazi preizkušanja za zdravljenje kroničnega hepatitisa C; M826 je inhibitor kaspaze 3 in je v fazi preizkušanja za zdravljenje Huntingtonove bolezni) (26).

Stimulacija proapoptotskih signalnih poti

- Monoklonska protitelesa: mapatumumab, ki cilja TRAIL-R1 (angl. TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1); lexatumumab, apomab in AMG-655 ciljajo TRAIL-R2 (angl. TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 2) (39).
- Rekombinantni ligandi: rekombinantni humani TRAIL (angl. TNF-related apoptosis inducing ligand); APO010 je rekombinantna oblika humanega Fas liganda; TNFerade je adenovektor, ki izraža humani TNF- α (angl. tumor necrosis factor- α) (39).
- Aktivatorji kaspaz (sintezni aktivatorji kaspaz, apoptin) (30).

1.3 PROSTAGLANDINSKI RECEPTOR EP₄

Prostaglandinski E receptorji so sestavljeni iz 4 različnih podtipov, in sicer EP₁, EP₂, EP₃ in EP₄, ki jih kodirajo različni geni. Vsi so izraženi na plazemski membrani, medtem ko sta EP₃ in EP₄ izražena tudi v jedrni (40). Receptorja EP₂ in EP₄ imata podobno afiniteto za prostaglandin E₂ (PGE₂), ki je naravni ligand prostaglandinskih receptorjev in preko sklopitve z G_{us}-proteinom aktivirata adenilat ciklazo (AC). Razlikujeta se v strukturnih in funkcionalnih lastnostih, predvsem v desenzibilizaciji, internalizaciji in signalizacijskih poteh (41).

Receptor EP₄ je sestavljen iz 488 aminokislin in je s proteinom G sklopljen receptor. Sestavljen je iz sedmih transmembranskih domen, zunajceličnega N-terminalnega dela in citoplazemskega C-terminalnega dela. C-terminalni del je sestavljen iz 156 aminokislin in vsebuje 38 serinskih in treoninskih ostankov, ki so nujni za z agonistom-inducirano hitro desenzibilizacijo in internalizacijo. Cisteinski ostanek, ki je lociran med prvimi 15 aminokislinami citoplazemskega repa, ima visoko afiniteto za vezavo ligandov in za sklopitev z G-proteini. Odstranitev tega dela ni zmanjšala fiziološkega odziva celice na stimulacijo receptorja, močno pa se je zmanjšala desenzibilizacija. Sklopitev PGE₂-EP₄ inducira TNF- α , ciklin D in angiogenezo preko različnih kinaz MAP ter znotrajcelični cAMP (40).

Gen *Ptger4*, ki kodira EP₄ receptor, se izraža v zrelih in nezrelih limfocitih B in deluje kot negativni povratni regulator preko BCR posredovanih signalov in ima vlogo tumor supresorskega gena v limfocitih B. PGE₂-EP₄ signaliziranje zavira proliferacijo malignih zrelih in nezrelih limfocitov B (42,43). Izbijanje gena *Ptger4* je povzročilo popolno neobčutljivost limfocitov B na PGE₂. Stimulacija receptorja EP₂ s PGE₁-OH, ki je specifični agonist receptorja EP₄, ni vplivala na proliferacijo celic, zato lahko sklepamo, da je pomen receptorja EP₂ pri signalizaciji nič. Ugotovljeno je bilo, da konstitutivna aktivacija NF- κ B in primarne genetske poškodbe oslabijo izražanje gena *Ptger4* (42).

1.3.1 Vloga receptorja EP₄ pri uravnavanju fizioloških in patofizioloških procesov

Receptor EP₄ predstavlja pomembno tarčo pri zdravljenju številnih motenj, ki so posledica povečane ali zmanjšane stimulacije le-tega. Osrednja vloga receptorja EP₄ pri posredovanju učinkov endogenega liganda PGE₂ je dokazana pri številnih fizioloških in patofizioloških spremembah. Pomembnejši učinki PGE₂ preko receptorja EP₄ so:

- Ščiti celice želodčne sluznice pred apoptozo (44).
- Ohranja intestinalno homeostazo z ohranjanjem integritete sluznice in z zmanjševanjem imunskega odziva (45).
- Pomembno vpliva na kancerogenezo debelega črevesa (46).

- Sodeluje pri nastanku proteinurije, ker vpliva na integriteto aktinskega citoskeleta podocitov; pri povišanem glomerularnem pritisku stimulacija EP₄ spremeni dinamiko citoskeleta podocitov in s tem vpliva na filtracijsko sposobnost glomerulov (47).
- Poveča resorpcijo kosti in inducira ekspresijo RANKL (angl. receptor activator for NF- κ B ligand) v osteoblastih ter sinergistično z RANKL in M-CSF (angl. macrophage colony-stimulating factor) spodbuja diferenciacijo osteoklastov iz prekurzorskih celic (48,49).
- Inducira tvorbo vaskularnega endotelijskega rastnega faktorja A (VEGF-A) v gladkih mišicah dihalnega sistema (50).
- Ima protivnetno vlogo pri patogenezi revmatoidnega artritisa (51).
- Ščiti hepatocite, tako da preprečuje apoptozo pri njihovi okvari, preko indukcije antiapoptotskih proteinov iz družine Bcl-2 (52).
- Indukcija gena *Ptger4* ima pomembno vlogo pri infekciji trigeminalnega ganglija z virusom herpes simplex-1 (HSV-1) in pri njegovi reaktivaciji (53).
- Vpliva na zapiranje arterijskega duktusa. Pomanjkanje receptorja EP₄ vodi v perinatalno smrt, ki je povezana s persistentnim odprtjem arterijskega duktusa (51).
- Okrepi imunski odziv v koži s spodbujanjem migracije in dozorevanja Langerhansovih celic (54).
- Inhibira aktivacijo makrofagov preko inhibicije tvorbe citokinov TNF- α , IL-1 β in IL-12; ter spreminja antigen predstavitevno vlogo makrofagov preko inhibicije izražanja pglavitnega histokompatibilnega kompleksa tipa II (55).
- Inhibira proliferacijo celic T (51,55).
- Preusmeri celični imunski odziv fenotipa Th1 v fenotip Th2, tako da poveča tvorbo IL-4, IL-5 in IL-10 ter zmanjša tvorbo IL-2, interferona γ (IFN- γ) in IL-12. Kot posledica povečanega sproščanja Th2 citokinov in izotipskega preklopa, PGE₂ preusmeri produkcijo protiteles v IgE (55,56).

1.3.2 Signalizacija preko receptorja EP₄

Poleg klasične, z G proteinom sklopljene aktivacije adenilat ciklaze, ki ji sledi povečanje znotrajceličnega cikličnega adenzin-monofosfata (cAMP), so za receptor EP₄ značilne tudi

dodatne neklasifne poti, za katere je odgovorna C-terminalna citoplazemska domena, ki vsebuje determinante za fosforilacijo, desenzitizacijo in internalizacijo receptorja (41).

Stimulatorne poti

Stimulatorski učinki signalizacije preko EP₄ so primarno povezani z aktivacijo kinaz PI3K in/ali ERK1/2, ki običajno povečajo proliferacijo celic.

PI3K/Akt

Po stimulaciji receptorja EP₄ s PGE₂ se aktivira fosfatidil-inozitol 3-kinaza (PI3K), ki preko zaporedne aktivacije PDK-1 (angl. phosphoinositide dependent kinase-1) in protein kinaze B (Akt) vodi v fosforilacijo vezavnega proteina za cAMP odzivni element (angl. cAMP response element binding protein, CREB) na serinu 133 (41). Aktivacija receptorja EP₄ vodi tudi v fosforilacijo glikogen sintaze kinaze-3 (GSK-3) preko PI3K/Akt poti, kar vodi v inhibicijo encima GSK-3. Inaktivacija GSK-3 zmanjša fosforilacijo β-ksenina, kar omogoči premestitev β-ksenina v jedro, kjer poveča transkripcijsko delovanje T-celičnega faktorja (angl. T-cell factor, TCF) (57).

PI3K/ERK1/2

EP₄ preko PI3K signalne poti stimulira fosforilacijo kinaze ERK (angl. extracellular signal regulated kinase) in inducira ekspresijo dejavnika EGR-1 (angl. early growth response protein 1), ki regulira izražanje PGE₂ sintaze, TNF-α in ciklina D1. Indukcija izražanja EGR-1 vključuje tudi z mitogenom aktivirane proteinske kinaze (angl. mitogen activated protein kinase, MAPK). V to skupino uvrščamo ERK, JNK in p38 kinazo (58).

Inhibitorne poti

Inhibitorski učinki signalizacije preko EP₄ so primarno povezani s porastom cAMP in/ali inhibicijo aktivacije NFκB.

cAMP/CREB

PGE₂ povzroči aktivacijo adenilat ciklaze ter porast cAMP, ki sproži signalno pot protein kinaze A (PKA), ki fosforilira CREB na serinu 133. CREB je transkripcijski faktor in se veže

na CRE mesta. Vortmanin, ki je inhibitor PI3K, ni blokiral fosforilacije CREB-a, kar kaže na vključenost PKA signalne poti v signalizacijo receptorja EP₄. Stimulacija receptorja EP₄ tako aktivira CREB preko kinaz PKA in Akt, vendar primarno zavira aktivacijo PKA preko PI3K odvisnega mehanizma (41).

cAMP/PKA/NFκB1

Stimulacija IL-1β v sinovijskih fibroblastih povzroči izločanje PGE₂, ki zavira NF-κB preko aktivacije adenilat ciklaze ter povišanja cAMP in vodi v zmanjšano izražanje MCP-1 (angl. monocyte chemoattractant protein 1). Jedrni transkripcijski faktor NF-κB kontrolira transkripcijo MCP-1 (59).

ERK/NFκB1

TNF-α in IL-1β stimulirata humane sinovijske fibroblaste, da začnejo izločati PGE₂. PGE₂ preko ERK kinaz inhibira translokacijo p65/p50 v jedro, medtem pa pospeši translokacijo p50/p50, ki posreduje protivnetno delovanje. Ugotovili so tudi, da PGE₂ poveča izražanje IκBα neodvisno od ERK kinaz (60).

EPRAP/NF-κB

Nedavno so v študijah na makrofagih odkrili, da se na C-terminalni rep EP₄ receptorja veže protein EPRAP (angl. EP₄ receptor-associated protein), ki zavira izražanje provnetnih genov. EPRAP vsebuje osem ankirinskih ponavljajočih se enot, brez encimske katalitične domene. Deluje tako, da se neposredno povezuje z NF-κB1 p105/p50 tako, da zavira s stimulusom inducirano fosforilacijo in degradacijo proteina p105. Ugotovljeno je bilo, da EPRAP posreduje protivnetno signalno pot neodvisno od cAMP (61,62).

2 NAMEN DELA

Stimulacija receptorja EP₄ zavira proliferacijo in poveča BCR inducirano apoptozo na mišjih malignih nezrelih in zrelih limfocitih B (42,43). Namen diplomskega dela je natančneje pojasniti, kako stimulacija receptorja EP₄, v humanih modelnih linijah levkemij in limfomov vodi v zastoj celične rasti oz. apoptozo. V predhodnih študijah je bilo ugotovljeno, da aktivacija receptorja EP₄ povzroči porast cAMP, v nekaterih primerih pa tudi aktivira od cAMP neodvisne poti, ki vključujejo inhibicijo aktivacije transkripcijskega faktorja NFκB (43). Kot celični model bomo uporabili humani celični liniji Burkittovega limfoma RAMOS in RAJI.

V prvem delu diplomskega dela bomo s pomočjo testov celične proliferacije (test MTS) ter uporabo specifičnih agonistov ugotavljali, kakšne učinke posreduje aktivacija receptorja EP₄ na celice RAMOS in RAJI. Nadalje bomo z izključitvenim testom s tripan modrim in z merjenjem aktivnosti kaspaz 3 in 7 ugotavljali, če stimulacija receptorja EP₄ vodi v programirano celično smrt.

V drugem delu diplomske naloge bomo s pomočjo prenosa po westernu preučili vpliv aktivacije receptorja EP₄ na fosforilacijo signalnih molekul vpletenih v regulacijo transkripcijskega faktorja NFκB ter ugotavljali vpliv aktivacije receptorja EP₄ na antiapoptotski protein BCL-xL.

V tretjem delu bomo preučili vpliv doksorubicina in bortezomiba na proliferacijo izbranih celic. Nato bomo preučili morebitni vpliv agonistov receptorja EP₄ na citotoksične učinke doksorubicina in bortezomiba na celice RAMOS in RAJI.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

Kemikalija	Proizvajalec
akrilamid	Fluka Chemie AG, Buchs, Švica
antibiotik (streptomycin, penicilin) in antimikotik (amfotericin B), raztopina	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
APS	Fluka Chemie AG, Buchs, Švica
bortezomib	Janssen-Cilag Internacional NV (Beerse, Belgija)
bromfenolmodro	Fluka Chemie AG, Buchs, Švica
DMSO	Merck Chemicals, Darmstadt, Nemčija
doksorubicin	AdriaBlastin, Milano, Italija
Goveji serumski albumin (BSA)	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
izopropanol	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
2-merkaptoetanol	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
medij RPMI 1640	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
Cell Titer 96® AQueous One Solution Reagent (reagent za test MTS)	Promega, Madison, WI, ZDA
N,N'-metilen-bis-akrilamid	Fluka Chemie AG, Buchs, Švica
PGE ₁ -OH	Cayman Chemical, MI, ZDA
raztopina tripanskega modrila (angl. Trypan Blue solution)	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
SDS (angl. Sodium dodecyl sulphate)	Promega, Madison, WI, ZDA
TEMED	Bio-Rad, Richmond, CA, ZDA

Tween 20	Bio-Rad, Richmond, CA, ZDA
----------	----------------------------

3.1.2 Kompleti

Komplet	Proizvajalec
Komplet za določanje koncentracije proteinov (angl. Bio-Rad DC protein assay) Komplet je sestavljen iz treh reagentov: reagent A (bazična raztopina bakrovega tartrata) reagent B (razredčen Folinov reagent) reagent S (razredčena površinsko aktivna snov)	Bio-Rad, Richmond, CA, ZDA

3.1.3 Pufri in raztopine

10 % amonijev persulfat (APS)

Raztopimo 100 mg amonijevega persulfata v 1 mL dH₂O. Pripravljamo sproti.

Kaspazni lizirajoči pufer

Sestava: 0,1 M PP (fosfatni pufer)

0,1 % Triton X-100

5 mL 1M PP in 5 mL 10 % Triton X-100 raztopimo v 40 mL dH₂O v 50 mL falkonki.

1M PP pH 6,0: 2,14 g Na₂HPO₄ x 2H₂O, 12,0 g KH₂PO₄, 0,37 g EDTA in 5,84 g NaCl raztopimo v 100 mL dH₂O.

10 % Triton X-100

1 mL Tritona X-100 raztopimo v 9 mL dH₂O.

2x Kaspazni reakcijski pufer

Sestava: 40 mM PIPES pH 7,2

20 % sukroza

0,2 % CHAPS

2 mM EDTA

200 mM NaCl

10xPBS (10-kratni fosfatni pufer s soljo, pH 7,4)

Sestava: 80 g NaCl

2 g KCl

14,4 g Na₂HPO₄

2,4 g KH₂PO₄

ultračista H₂O

Snovi raztopimo v 800 mL dH₂O in uravnamo pH na 7,4 in dopolnimo z dH₂O do 1000 mL. Avtoklaviramo.

1xPBS

10xPBS redčimo 1:10 z avtoklavirano ultračisto H₂O.

RIPA pufer (lizatni pufer)

Sestava: 1 % Nonidet P40 ali P10

0,5 % Natrijev deoksiholat

0,1 % SDS

0,004 % NaN₃

RIPA* pufer (lizatni pufer)

Sestava: 1600 µL RIPA

1,6 µL aprotinin

8 µL PMSF (fenilmetilsulfonilfluorid)

16 µL halt-fosfataze

Separacijski gel pufer (1,5 M Tris/HCl, pH 8,8)

18,2 g tris-baze raztopimo v 100 mL dH₂O in uravnamo pH na 8,8. Avtoklaviramo. Dodamo 0,4 g SDS. Shranjujemo pri +4 °C.

Koncentracijski gel pufer (0,5 M Tris/HCl, pH 6,8)

6,1 g tris-baze raztopimo v 100 mL dH₂O in uravnamo pH na 6,8. Avtoklaviramo. Dodamo 0,4 g SDS. Shranjujemo pri +4 °C.

3xSLB (nanašalni pufer, angl. sample loading buffer)

Sestava: 30 % glicerol

0,3 % bromfenol modro

9 % SDS

195 mM Tris/HCl (pH 6,8)

dH₂O

Segrejemo na 68 °C, da se bromfenol modro dobro raztopi. Shranjujemo pri -20 °C.

Pufer za odstranjevanje vezanih protiteles (angl. stripping buffer)

Sestava: 2 % SDS

62,5 mM Tris HCl pH 6,8

100 mM 2-merkaptoetanol

TBS (Tris pufer s soljo, 10x, pH 7,4)

Sestava: 250 mM Tris-baza

1370 mM NaCl

30 mM KCl

dH₂O

Snovi raztopimo v 800 mL dH₂O, uravnamo pH na 7,4 s HCl in dopolnimo z dH₂O do 1000 mL.

5 % raztopina mleka

Sestava: 5 g mleka v prahu

50 mL TTBS

TTBS

0,02 % Tween 20 v 1x Tris puferni raztopini

Tris-glicin elektroforezni pufer, 5x

Sestava: 25 mM Tris-baza

250 mM glicin

0,1 % SDS

dH₂O

V 900 mL dH₂O raztopimo tris-bazo in glicin. Dodamo 10 % SDS in uravnamo volumen na 1000 mL z dH₂O.

10 % SDS

Sestava: 10 g SDS

90 mL dH₂O

Segrejemo na 68 °C, da se raztopi. S koncentrirano HCl uravnamo pH na 7,2. Dopolnimo do 100 mL z dH₂O.

3.1.4 Geli za SDS-PAGE

8 % Separacijski gel

Sestava: 30 % akrilamid	2,7 mL
1,5 M Tris HCl, pH 8,8	2,5 mL
H ₂ O	4,6 mL
10 % SDS	100 µL
10 % APS	100 µL
TEMED	6 µL

5 % Koncentracijski gel

Sestava: 30 % akrilamid	850 µL
0,5 M Tris, pH 6,8	625 µL
H ₂ O	3,4 mL
10 % SDS	50 µL
10 % APS	50 µL
TEMED	5 µL

Akrilamid, Tris-HCl, dH₂O in SDS odpipetiramo in premešamo, nato dodamo še APS in TEMED, ponovno premešamo in hitro vlijemo med stekelci elektroforezne celice

3.1.5 Označevalci velikosti

SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (označevalec velikosti proteinov)	Invitrogen (Carlsbad, CA, ZDA)
--	--------------------------------

3.1.6 Substrat

Kemiluminiscenčni substrat za hrenovo peroksidazo (SuperSignal® West Femto chemiluminiscent Substrate)	Thermo Scientific, Rockford, IL, ZDA
Ac-DEVD.AFC peptidni substrat	Sigma – Aldrich, MO, ZDA

3.1.7 Protitelesa

Primarna kunčja monoklonska protitelesa proti BCL-xL	Cell Signaling
Primarna kunčja monoklonska protitelesa proti I κ B α	Cell Signaling
Primarna kunčja monoklonska protitelesa proti fosfo-I κ B α (p-I κ B α)	Cell Signaling (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, ZDA)
Primarna kunčja monoklonska protitelesa proti fosfo-NF κ B p105 (p-p105)	Cell Signaling
Primarna kunčja monoklonska protitelesa proti NF κ B p105/p50 (p105/p50)	Abcam (Cambridge, VB)
Primarna mišja monoklonska protitelesa proti β -aktinu	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
sekundarna kozja anti-mišja protitelesa konjugirana s hrenovo peroksidazo (HRP)	Upstate (Temecula, CA, ZDA)

sekundarna kozja anti-kunčja protitelesa konjugirana s hrenovo peroksidazo (HRP)	Upstate (Temecula, CA, ZDA)
--	-----------------------------

3.1.8 Gojišče

Medij RPMI

Sestava:

500 mL RPMI-1640

50 mL FBS

5,125 mL 200 mM L-glutamin

5 mL antibiotik/antimikotik 100x

0,5 mL 50 mM 2-merkaptoetanol

3.1.9 Laboratorijska oprema

Aparatura/material	Proizvajalec
analitska tehtnica	Exacta 300 EB Tehtnica, Železniki, Slovenija
avtoklav	A-21, Kambič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija
avtomatski števec za štetje celic (Countess™)	Invitrogen, Carlsbad, ZDA
centrifuge	Tehtnica CENTRIC 322A, Železniki, SLO Tehtnica CENTRIC 150, Železniki, SLO Eppendorf centrifuge 5415 R, Hamburg, Nemčija
centrifugirke (15 in 50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija
termični stresalnik Apollo HP50	CLP Tools, San Diego, ZDA
gorilnik	Labogaz® 206, Campingaz, Francija, mešanica butana in propana
hemocitometer	Brand Neubauer (BNlau Brand)

hladilnik/zamrzovalnik	Gorenje, Velenje, Slovenija
inkubator	Heraus Holding GmbH, Hanau Nemčija
invertni svetlobni mikroskop (Olympus CK40)	Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Nemčija
komora z laminarnim pretokom zraka (LAF)	Waldner Electronics FAZ 3, Wangen, Nemčija
kadička za vertikalno elektroforezo	Bio-Rad, Richmond, CA, ZDA
krioviale	TPP, Trasadingen Švica
krovna stekla	Assistent, Sondheim, Nemčija
mikrocentrifugirke (0,5 mL; 1,5 mL in 2mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija
mikrokapilarni nastavki za pipete s sploščeno konico za nanos na gel (5-100 µL)	Sigma – Aldrich, MO, ZDA
mikrotitrne ploščice za gojenje celičnih kultur (s 6, 12, 24 ali 96 vdolbinami)	TPP, Trasadingen Švica
mikrotitrski čitalec (Safire ² ™ Genios)	Tecan, Genios, Zürich, Švica
multikanalne pipete	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
nastavki za pipete (do 10, 200, 300 ali 1000 µL)	Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija
pipete	100 – 1000 µL (Biohit) 20 – 200 µL (Biohit) 0,5 – 10 µL (Biohit) 0,1 – 2,5 µL (Biohit) – 1000 µL (Biohit)
precizna tehtnica	Europe60 Gibertini
programska oprema za Tecan	Magellan V3.X IVD
računalniška programska oprema GeneSnap	SynGene, Cambridge, VB
G box: kemiluminiscenčna komora za merjenje kemiluminiscence	SynGene, Frederick, MD, ZDA
stekleničke za gojenje celičnih kultur (s 25, 75 in	TPP, Trasadingen Švica

150 cm ² rastne površine)	
stresalnik	Vibromix 314 EVT Tehnica
iBlot [®] naprava za prenos Western anoda, nitrocelulozna membrana, katoda	Invitrogen, Carlsbad, ZDA
ultrasonični homogenizator 4710	Call-Rarner Instrument Co., Chicago, ZDA
vir napetosti za elektroforezne kadičke	Bio-Rad, Richmond, CA, ZDA
vodna kopel	Mikro+Polo, Maribor, Slovenija Memmert, Schwabach, Nemčija
vibracijski mešalnik (Vortex GENIE 2)	Scientific Industries, Orlando, Florida, ZDA
zamrzovalnik -80 °C	Forma Scientific Midland, ON, Kanada

3.2 METODE DELA S CELICAMI

Za ustrezno delo s celicami moramo najprej zagotoviti aseptične pogoje prostorov in površin. Delo opravljamo v komori z laminarnim pretokom zraka (komora LAF), ki je nameščena v prostorih, kjer velja poseben režim čistote (namenska zaščitna oblačila in obutev). LAF komora zagotavlja sterilne pogoje z omejenim dostopom ter stalnim pretokom filtriranega zraka na delovno površino (zrak onemogoča dostop kontaminantom in prahu). Komoro pred uporabo razkužimo s polurnim obsevanjem z ultravijolčno svetlobo. Tik pred pričetkom dela pa površine komore očistimo s 70-odstotnim etanolom. Pri delu uporabljamo zaščitne rokavice, ki jih razkužimo s 70-odstotnim etanolom.

3.2.1 Gojenje celičnih kultur

Celični liniji RAMOS in RAJI smo gojili v mediju RPMI z 10 % FBS, glutaminom, antibiotikom, antimikotikom in 2-merkaptetanom. Celice smo gojili in redčili v T-flaskih (stekleničkah za gojenje celičnih kultur) ali ploščicah za celične kulture v inkubatorju pri 37 °C v prisotnosti 5 % atmosfere CO₂.

Pri našem delu smo uporabili dve humani celični liniji B limfoma:

- RAMOS je celična linija Burkittovega limfoma, pridobljena iz 3-letnega kavkavškega dečka bele rase. Celice so bile EBV negativne in izražajo nezreli fenotip limfocitov B (63).
- RAJI je celična linija Burkittovega limfoma, pridobljena iz leve čeljustnice 11-letnega dečka črne rase leta 1963. Celice so bile EBV pozitivne. Celice so bile tudi delno odporne na polioviruse in viruse vezikuloznih stomatitisev (64).

3.2.2 Subkultiviranje celičnih linij

Za doseganje ustreznega števila in optimalne rasti celic smo jih morali presejati vsake 2 do 3 dni, tako da smo jih redčili z medijem RPMI, segretim na 37 °C.

3.2.3 Odmrzovanje celic

Celične kulture shranjujemo v krioampulah pri -80 °C v zmrzovalniku ali pri -180 °C v Dewarjevi posodi s tekočim dušikom. Celice so shranjene v 10-odstotnem dimetilsulfoksidu (DMSO), ki je citotoksičen, zato se mora postopek odmrzovanja izvesti hitro. Krioampulo s celicami smo takoj prenesli iz zmrzovalnika oz. tekočega dušika v vodno kopel, segreto na 37 °C in jo rahlo stresali, da smo pospešili odmrzovanje. Odmrznjeno vsebino smo prenesli v 15 mL centrifugirko, v katero smo predhodno odpipetirali 10 mL medija RPMI, segretega na 37 °C. Suspenzijo smo centrifugirali 5 minut pri 1200 obr./min. Nastali supernatant smo odpipetirali in celice resuspendirali v ustreznem volumnu medija RPMI, segretega na 37 °C. Celično suspenzijo smo prenesli v sterilno mikrotitrsko ploščico za gojenje celičnih kultur in jo inkubirali v CO₂ inkubatorju.

3.2.4 Štetje celic

Ročno štetje celic

Celice smo šteli s pomočjo hemocitometra pod invertnim mikroskopom. Ta metoda omogoča štetje celic v znanem volumnu in izračunanje koncentracije celic (št. celic/mL). Pod sterilnimi pogoji smo odpipetirali 20 µL celične suspenzije in jo prenesli v mikrocentrifugirko. Dodali smo 20 µL tripanškega modrila, ki obarva poškodovane in mrtve celice modro. Zmes smo

dobro premešali s pipeto in jo nanesti na hemocitometer. Pod mikroskopom smo prešteli število živih celic v štirih poljih po spodnji enačbi:

$$\text{Št. celic/mL} = \frac{A + B + C + D}{4} \times f \times 10^4$$

A, B, C, D - št. živih celic v posameznem polju hemocitometra

f - faktor redčenja zaradi redčitve z gojiščem in mešanja s tripan modrim

10^4 - volumen celične suspenzije nad kvadratom (1/mL)

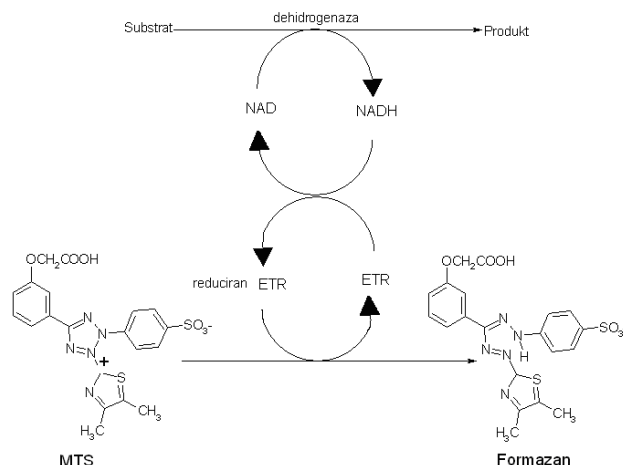
Enačba 1: Računanje koncentracije celic.

Avtomatsko štetje celic

Za avtomatsko štetje celic smo uporabili avtomatski števec CountessTM. Pod sterilnimi pogoji smo odpipetirali 10 μ L celične suspenzije in jo prenesli v mikrocentrifugirko. Dodali smo 10 μ L tripanškega modrila, ki obarva poškodovane in mrtve celice modro. Zmes smo dobro premešali s pipeto in jo nanesti na ploščico, ki je sestavljena iz dveh merilnih celic. Ploščico smo vstavili v instrument in v 30 sekundah smo dobili naslednje rezultate: celokupno število celic, število živih celic in število mrtvih celic.

3.3 TEST MTS

Test MTS je kolorimetrična metoda za merjenje aktivnosti metabolnih encimov, ki reducirajo MTS v formazan vijolične barve. MTS je zmes 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazola v obliki soli in fenazin etosulfata (angl. phenazine ethosulfate; PES), ki je reagent za prenos elektronov. Ta tetrazolijeva sol prehaja v celice, kjer se pod vplivom reducirajočih reagentov v mitohondrijih reducira do formazana (slika 3). Količina nastalega formazana je sorazmerna številu živih metabolno aktivnih celic in jo lahko merimo spektrofotometrično pri 490 nm (65).



Slika 3: Shematski prikaz celičnega metabolizma reagenta MTS.

Redukcija MTS v formazan v metabolno aktivnih celicah je posledica delovanja dehidrogenaz, ki tvorijo reducirajoče reagente, npr. NADH ali NADPH. NADH prenese svoj elektron na reagent za prenos elektronov (angl. electron transfer reagent; ETR), kot npr. PES v našem primeru in tako reducira ta reagent. Reduciran reagent za prenos elektronov lahko direktno reagira z MTS, ga reducira in nastane močno obarvan formazan.

Postopek:

Celice smo stimulirali z zeleno substanco v različnih koncentracijah 24 in 48 ur v inkubatorju za gojenje celic (37 °C, 5 % CO₂). Po inkubaciji smo na 100 µL kulture dodali 10 µL reagenta MTS in inkubirali še 3 ure v inkubatorju. Po treh urah smo z mikrotitrskim čitalcem Tecan Safire² izmerili absorbanco nastalega formazana pri 492 nm. Večja kot je bila izmerjena absorbanca, večja je bila metabolna aktivnost celic. Istočasno smo test izvedli tudi z medijem RPMI (brez celic) in 10 µL MTS, s čimer smo določili absorbanco ozadja (slepa kontrola) in jo odšteli od absorbance vzorcev.

3.4 MERJENJE AKTIVNOSTI KASPAZ 3 IN 7

Kaspazi 3 in 7, ki sta prisotni v celičnem lizatu selektivno prepoznata in cepita DEVD zaporedje iz substrata. Fluorescenco sproščenega AFC (7-amino-4-trifluorometil kumarin) merimo pri valovni dolžini vzbujanja 405 nm in emisije 535 nm.

Postopek:

Celice smo gojili na mikrotitrski ploščici s 6 vdolbinicami. V posamezno vdolbinico smo odpipetirali ustrezno količino celične suspenzije, ki je vsebovala 2×10^6 celic/mL in jim dodali 50 μ M PGE₁-OH ter jih prenesli v inkubator. Istočasno smo kot kontrolo uporabili celice, ki smo jih inkubirali le v popolnem mediju RPMI. V izbranih časovnih točkah smo stimulacijo prekinili in celotni volumen celic prenesli v 15 mL centrifugirke. Dno vdolbine smo 2x spirali z 1xPBS in nato smo celično suspenzijo dobro resuspendirali v ledeno mrzlem pufu za lizo celic. Po sonificiranju smo dali lizate takoj nazaj na led in jih stresali na stresalniku 30 min. Vsebino iz centrifugirk smo prenesli v mikrocentrifugirke in jih centrifugirali pri 4 °C, 15 min pri 14000 x g. Supernatante smo po centrifugiranju prenesli v nove 500 μ L mikrocentrifugirke in jim določili celokupno koncentracijo proteinov z metodo po Lowry-ju, kot je opisano v poglavju materiali in metode 3.5.2.

V vsako vdolbinico na mikrotitrski ploščici s 96 vdolbinicami smo napipetirali po 50 μ L 2x reakcijskega pufra z 20 mM DTT (ditiotreitrol). V kontrolo smo dodali 50 μ L lizatnega pufra, v ostale vdolbinice pa po 50 μ L normiranih vzorcev (t.j. lizatov s koncentracijo proteinov 0,4 μ g/ μ L). Delali smo v 2 paralelkah. Po 30 min inkubaciji pri 37 °C smo kontroli in vzorcem dodali 10 μ L Ac-DEVD-AFC peptidnega substrata s koncentracijo 1 mM in takoj začeli z merjenjem fluorescence pri 405 in 535 nm. Merili smo kontinuirano 40 min. Rezultat za vsak vzorec smo podali kot povečanje fluorescence v odvisnosti od časa (dF/dt) v primerjavi s kontrolo celic.

3.5 SDS-PAGE IN PRENOS PO WESTERNU

3.5.1 Priprava celičnega lizata

Postopek:

Celične lizate smo pripravili iz kontrolnih nestimuliranih celic in celic stimuliranih z 10 in/ali 25 μ M PGE₁-OH. Po ustreznem času (6, 12 in 24h oz. 15, 30, 45 in 60 min) smo celice prenesli v centrifugirke in jih centrifugirali (5 min, 1200 rpm). Nastali supernatant smo odpipetirali in celicam dodali 80 μ L lizatnega pufra (RIPA puffer, aprotinin, PMSF in halt-fosfataze) na $4,3 \times 10^5$ celic/mL. Celične lizate smo nato sonificirali. Po sonificiranju smo dali

lizate takoj nazaj na led in jih stresali na stresalniku 15 min. Nato smo jih ponovno centrifugirali pri 4 °C, 15 min pri 16000 obr./min. Supernatant smo po centrifugiranju prenesli v nove 500 µL mikrocentrifugirke, usedlino pa zavrgli, hkrati smo odpipetirali 4 µL posameznega vzorca in 8 µL lizatnega pufra v novo mikrocentrifugirko za merjenje koncentracije proteinov. Vzorce (lizate) smo shranjevali na - 80 °C.

3.5.2 Določanje celokupne koncentracije proteinov z metodo po Lowry-ju

Celokupno koncentracijo proteinov v celičnih lizatih smo določali z modificirano Lowryjevo metodo (Bio-Rad DC Protein Assay). Metoda temelji na biuretski reakciji proteinov z bazično raztopino bakrovega tartrata in Folinovega reagenta. Najprej poteče reakcija med proteini in bakrom v alkalnem mediju in nato redukcija Folinovega reagenta s kompleksom baker-protein. Do redukcije Folinovega reagenta pride zaradi oksidacije aromatskih aminokislin, ki jih katalizira baker in tako nastane več možnih reduciranih spojin značilno modre barve z maksimumom absorbance pri 750 nm (66).

Postopek:

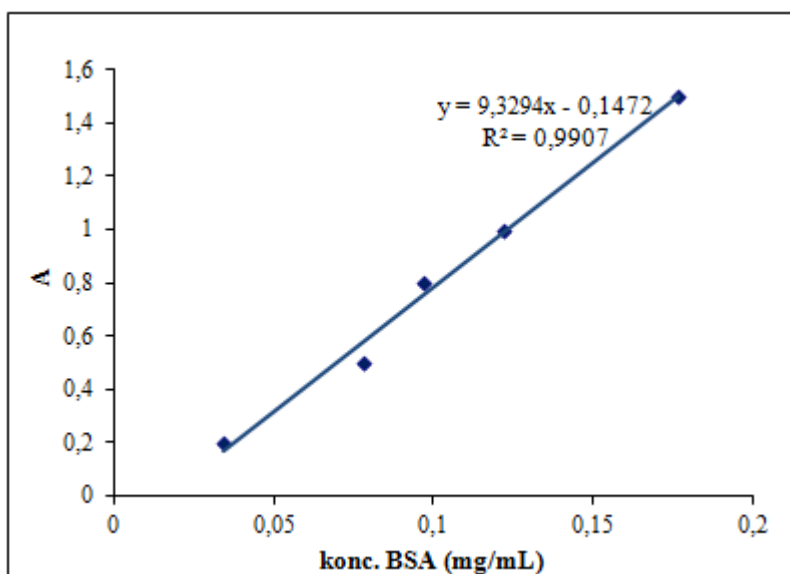
Metodo smo izvajali na mikrotitrski ploščici s 96 vdolbinicami. Najprej smo pripravili standardne raztopine 1 mg/mL BSA v lizatnem pufu (RIPA pufer) s koncentracijami 0,2, 0,5, 0,8, 1,0 in 1,5 mg/mL. V prvo vdolbinico smo nanesti 5 µL lizatnega pufra, ki nam je služil kot slepa kontrola. V naslednjih pet vdolbinic smo nanesti po 5 µL vsakega standarda. V naslednjih šestnajst vdolbinic smo nanesti po 5 µL posameznega vzorca. V vse vdolbinice smo dodali 25 µL reagenta A' (1 ml reagenta A (alkalna raztopina bakrovega tartrata) + 20 µL reagenta S (razredčena površinsko aktivna snov)) in 200 µL reagenta B (razredčen Folinov reagent). Vse smo napipetirali v duplikatih (dvojna tehnična ponovitev). Po 15 min smo z mikrotitrskim čitalcem Tecan Safire² izmerili absorbance nastalega modro obarvanega produkta pri 750 nm. Iz izmerjenih vrednosti standardov smo določili umeritveno krivuljo (slika 3). Na podlagi umeritvene krivulje in izmerjenih vrednosti absorbance posameznega vzorca, smo izračunali koncentracijo proteinov v vsakem vzorcu.

Priprava standardne krivulje

Kot standard smo pripravili raztopine BSA različnih koncentracij. S pomočjo dobljene umeritvene premice smo izračunali koncentracije proteinov v vzorcih.

Tabela I: Absorbance BSA, potrebne za konstrukcijo umeritvene premice.

konc. (mg/mL)	A1	A2	$A_{\text{povprečna}}$	$A_{\text{povprečna}} - A_{\text{slepa}}$
0,2	0,0912	0,1085	0,09985	0,0341
0,5	0,147	0,1405	0,14375	0,078
0,8	0,1484	0,1774	0,1629	0,09715
1,0	0,1784	0,1969	0,18765	0,1219
1,5	0,2241	0,2604	0,24225	0,1765



Slika 4: Umeritvena premica za določitev koncentracije proteinov.

Na sliki je umeritvena premica reprezentativnega eksperimenta za določitev koncentracije proteinov po Lowryju na osnovi znanih koncentracij BSA kot standarda. Absorbanca slepega vzorca (brez proteinov) je odšteta od eksperimentalno določenih absorbanc standardov.

3.5.3 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (SDS-PAGE)

Poliakrilamidna gelska elektroforeza je separacijska metoda. Poteka v gelskem matriksu, ki nastane po polimerizaciji akrilamida in N,N'-metilenbisakrilamida. Poliakrilamidna

elektroforeza poteka navpično in jo navadno izvajamo v diskontinuiranem sistemu, ki ga sestavljajo različno zamrežena gela ter pufru z različnima vrednostima pH in ionske moči. Zgornji koncentracijski gel je manj zamrežen od spodnjega separacijskega in ne ovira molekul pri potovanju, zato v njem ne more priti do ločitve. Tako dosežemo, da vsi proteini naenkrat vstopijo v separacijski gel, s čimer preprečimo razpotegnjenost in prekrivanje lis. Separacijski gel je bolj zamrežen in izvaja ločbo po velikosti. Majhne molekule se gibljejo hitreje, velike pa počasneje (67). SDS je amfifilna molekula, ki se nespecifično veže na protein in ga pri tem denaturira. Ker ima SDS negativen naboj, bodo negativno nabiti tudi proteini, zato pod vplivom električnega polja potujejo proti anodi, ki je pozitivno nabita. Molekule proteinov se ločujejo le na osnovi velikosti (zaradi zamreženosti separacijskega gela), ker je razmerje med nabojem in dolžino polipeptidne verige v kompleksu s SDS enako za vse proteine, zato imajo enako elektroforetsko mobilnost (68).

Po koncu elektroforeze lahko proteine detektiramo na več načinov. Pri našem delu smo za detekcijo izbrali prenos western. Po končanem prenosu smo z imunodetekcijo s protitelesi določili izražanje proteinov.

Postopek:

Najprej smo sestavili aparaturo za SDS elektroforezo. Nato smo pripravili gela za SDS PAGE. Akrilamid in bisakrilamid sta odgovorna za tvorbo gela, APS in TEMED pa sprožita polimerizacijo. Najprej smo vlili 8 % separacijski gel, ki je močno zamrežen. Na vrh gela smo nakapali še par kapljic izopropanola, da smo dobili ravno bazno linijo gela. Ko se je ločevalni gel strdil, smo odlili alkohol in gel sprali z deionizirano vodo. Nato smo vlili 5 % koncentracijski gel, ki je manj zamrežen in ne izvaja separacije po velikosti in obliki. Vanj smo vstavili glavniček, da med strjevanjem gela naredi žepke v katere smo nanašali vzorce. Ko se je gel strdil, smo odstranili glavniček.

Iz koncentracije proteinov v vsakem vzorcu smo izračunali volumen proteinov v vsakem vzorcu z maso 25 µg. Celokupni volumen vzorca, ki smo ga nanašali v žepke, je bil 40 µL in je bil sestavljen iz volumna proteinov, volumna deionizirane vode in volumna nanašalnega pufru (17,23 µL). V vsako epico smo dodali ustrezno količino dH₂O, nanašalnega pufru (30 % glicerol, 0,3 % bromfenol modro, 9 % SDS, 195 mM Tris/HCl s pH 6'8, dH₂O) in proteinov ter jih vorteksirali in centrifigirali nekaj sekund. Nato smo jih 5 min kuhali na 100 °C. Po

segrevanju smo jih ohladili na ledu (-20 °C) in jih pred nanosom v žepke ponovno vorteksirali in centrifugirali. V prvi žepki smo nanесли 4 μL označevalca velikosti proteinov (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard), v ostale žepke pa 40 μL vzorca. Elektroforezo smo izvajali v tris-glicin elektroforeznem pufru pri električni napetosti 100 V približno 2 uri oziroma toliko časa, da je elektroforezna fronta pripotovala skoraj do konca gela. Nato smo aparaturo previdno razstavili ter izvedli prenos western.

3.5.4 Prenos western in imunodetekcija

Prenos western se uporablja za detekcijo proteinov po elektroforezi. Ločene proteine iz gela moramo prenesti na nitrocelulozno membrano, razvrstitev molekul je enaka kot na gelu. Ta prenos je bodisi kapilaren bodisi elektroforezen. Proteini se na membrano vežejo ireverzibilno preko močnih hidrofobnih interakcij. Položaj proteina na membrani lahko določimo z vezanjem označenih protiteles in dobimo podatek o velikosti proteina. Navadno uporabljamo z encimom ali radioaktivno označena protitelesa. Preden s protitelesi detektiramo želeni protein, membrano inkubiramo v raztopini govejega serumskega albumina ali v 5 % raztopini mleka v prahu. S tem dosežemo, da se vsa nezasedena hidrofobna površina membrane pokrije in tako preprečimo kasnejšo nespecifično vezavo protiteles na morebitna nezasedena mesta na membrani (67,68).

Imunodetekcija je metoda, ki temelji na interakciji med iskanim proteinom in protitelesi, ki ta protein prepoznajo. Membrano najprej inkubiramo v raztopini protiteles, specifičnih za iskani protein. Ta protitelesa imenujemo primarna protitelesa in so po izvoru lahko monoklonska ali poliklonska. Naslednja stopnja je inkubacija v raztopini sekundarnih protiteles, ki se vežejo na Fc-regijo primarnih protiteles. Sekundarna protitelesa so označena na več načinov. Najpogosteje je na sekundarna protitelesa kovalentno vezan določen encim (fosfataza, peroksidaza,...) (68). Pri našem delu smo uporabili sekundarna protitelesa konjugirana s hrenovo peroksidazo, proteine pa smo določevali s kemiluminiscenčno detekcijo.

Postopek:

Prenos western je potekal na posebni aparaturi iBLOT®. Na anodo smo prenesli poliakrilamidni gel in filter papir, tako da vmes ni bilo zračnih mehurčkov, ter na koncu vse skupaj prekrili s katodo. Anoda je imela že integrirano nitrocelulozno membrano. Zatem smo

aparaturu pokrili s pokrovom in jo priključili na električno napetost. Prenos je potekal 7 minut pri 20 V.

- Po prenosu smo membrano inkubirali v 5 % raztopini mleka (5 % mleko v prahu v 1x TTBS) 1 uro pri sobni temperaturi, ob zmernem stresanju.
- Nato smo membrano v kadički izpirali s TTBS 5 min, ob zmernem stresanju. To smo ponovili 3-krat.
- Membrano smo celo noč inkubirali z ustreznimi redčitvami primarnih protiteles v 3 % BSA v TTBS v hladni sobi pri 4 °C, ob zmernem stresanju. Z izjemo protitelesa proti β -aktinu, ki smo ga raztopili v 5 % mleku v TTBS. Uporabili smo naslednje redčitve osnovnih raztopin primarnih protiteles: 1:1700 proti-Bcl-xL, 1:2500 proti-Bcl-2, 1:300 proti- β -aktin, 1:2500 proti-fosfo-p150 + proti-fosfo-I κ B α , 1:2500 proti-I κ B α , 1:1500 proti-p105/p50.
- Vsako kadičko smo izpirali s TTBS 5 min, ob zmernem stresanju. To smo ponovili 3-krat.
- Inkubirali smo z raztopino sekundarnih kozjih proti-kunčjih IgG protiteles konjugiranih s HRP (1:5000 v 5 % mleku v prahu v 1x TTBS) 1 uro pri sobni T, ob zmernem stresanju. Z izjemo protiteles proti β -aktinu, ki smo jih inkubirali z raztopino sekundarnih kozjih proti-mišjih IgG protiteles konjugiranih s HRP (1:2000 v 5 % mleku v prahu v 1x TTBS).
- Ponovno smo izpirali s TTBS 6-krat po 5 min, ob zmernem stresanju.
- Inkubirali smo membrane s kemiluminiscenčnem substratom SuperSignal® West Femto (750 μ L vsakega) 5 min pri sobni T na parafilmu.
- Detekcijo smo izvedli z merjenjem kemilumniscence z napravo G-Box in programsko opremo GeneSnap.
- Po detekciji smo membrane sprali z 1x TTBS in jih prenesli v kadičke s pufrom za odstranjevanje vezanih protiteles (angl. stripping buffer). Po 1h inkubiranjem pri 60 °C smo membrane ponovno sprali s 1x TTBS in ponovili postopek označevanja s protitelesi.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 AKTIVACIJA RECEPTORJA EP₄ INDUCIRA APOPTOZO V CELICAH BURKITTOVEGA LIMFOMA

Prostaglandinski receptor EP₄ je povezan z vrsto različnih fizioloških in patofizioloških učinkov. V limfocitih B ima receptor EP₄ tumorsupresorsko funkcijo, saj njegova aktivacija posreduje inhibitorne učinke na proliferacijo mišjih malignih nezrelih in zrelih limfocitov B in poveča BCR inducirano apoptozo mišjih limfocitov B (42,43). V prvem delu diplomske naloge smo zato ovrednotili vpliv stimulacije receptorja EP₄ na fenotipski odziv humanih modelnih celičnih linij B limfoma.

4.1.1 Agonist receptorja EP₄ inhibira proliferacijo celic RAMOS in RAJI

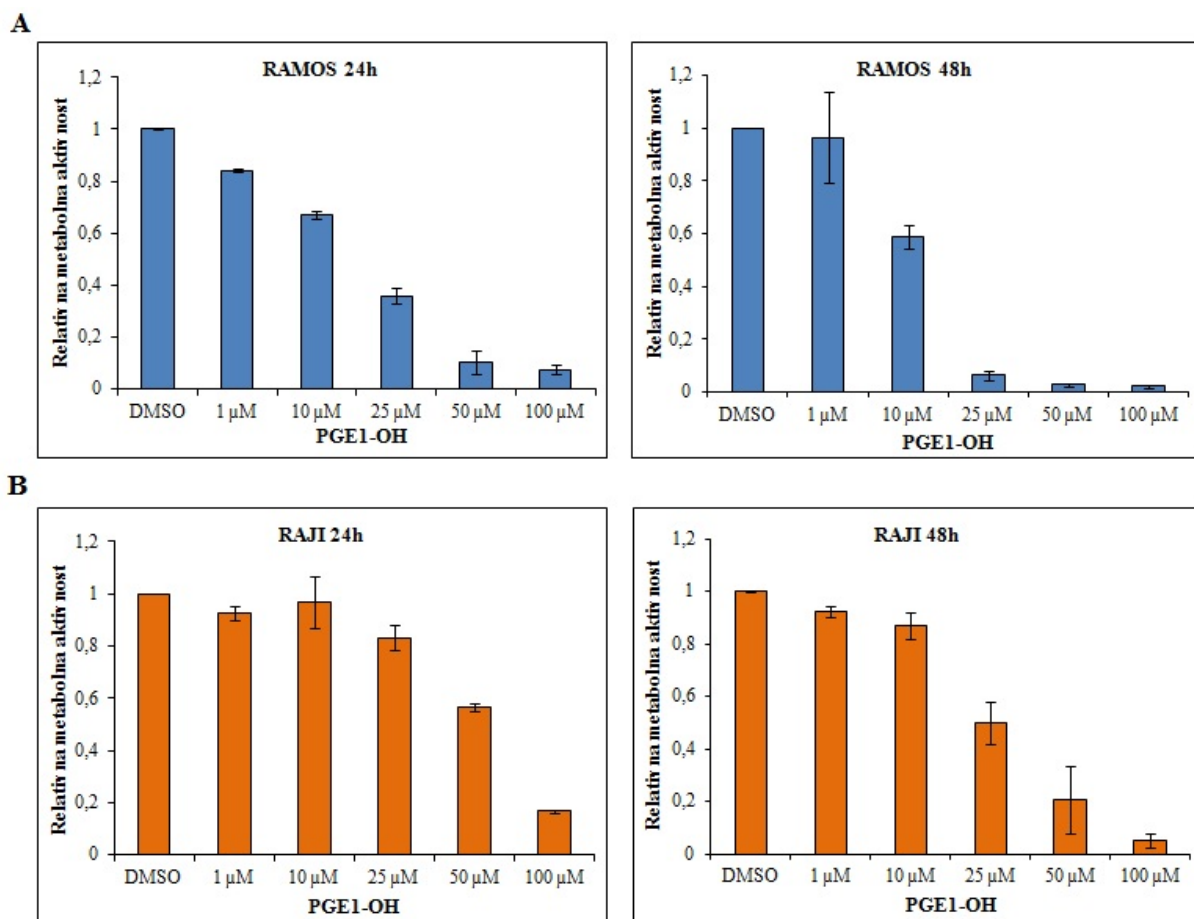
PGE₂ je naravni ligand prostaglandinskih receptorjev, ki z vezavo na receptor EP₄ zavira proliferacijo zrelih in nezrelih limfocitov B (42,43). Na podlagi teh opažanj smo želeli ovrednotiti receptor EP₄ kot potencialno terapevtsko tarčo pri uravnavanju proliferacije različnih levkemij in limfomov. S testom MTS smo ocenili farmakološki odziv celic Burkittovega limfoma na stimulacijo receptorja EP₄ s PGE1-OH, selektivnim agonistom receptorja EP₄.

Vrednotenje metabolne aktivnosti celic RAMOS in RAJI s testom MTS

Celice RAMOS in RAJI smo inkubirali v prisotnosti selektivnega agonista za receptor EP₄, PGE1-OH in merili njihovo metabolno aktivnost s testom MTS. V vdolbine na mikrotitrski ploščici (s 24 vdolbinicami) za gojenje celičnih kultur smo odpipetirali 1 mL celične suspenzije, s koncentracijo 1×10^5 celic/mL. Prvi in drugi alikvot smo inkubirali le v popolnem mediju RPMI. V tretji alikvot smo dodali DMSO, v katerem, je raztopljen PGE1-OH, ki v dodani količini ne sme izkazovati toksičnih učinkov. V naslednjih 5 alikvotov smo dodajali agonist PGE1-OH v različnih koncentracijah (1, 10, 25, 50 in 100 μ M). Nato smo z multikanalno pipeto razdelili stimulirane kulture na 2 (24, 48 h) mikrotitrski ploščici s 96 vdolbinicami. Iz vsakega alikvota različno tretirane celične kulture smo vzeli 2-krat po 100 μ L (dvojna tehnična ponovitev). Poleg kultur smo v posebne vdolbinice dodali še 2-krat po 100

μ L RPMI kot slepo kontrolo. Celice smo dali v inkubator in po 24 in 48 urah izvedli MTS, kot je opisano v poglavju materiali in metode 3.3.

Eksperiment smo ponovili še 2-krat (3 biološke ponovitve) in podatke statistično obdelali.



Slika 5: Metabolna aktivnost celic (A) RAMOS in (B) RAJI stimuliranih s PGE1-OH.

Celice RAMOS (A) in RAJI (B) smo inkubirali z različnimi koncentracijami PGE1-OH (1, 10, 25, 50 in 100 μ M), ter po 24 in 48 urah ovrednotili celično viabilnost s testom MTS. Stolpci predstavljajo celično metabolno aktivnost, normalizirano na metabolno aktivnost celic izpostavljenih topilu (DMSO).

Ugotovili smo, da je PGE1-OH kot agonist receptorja EP₄ inhibitorno vplival na metabolno aktivnost celic RAMOS in RAJI (slika 5). Zmanjšanje oz. prenehanje metabolne aktivnosti je odvisno od koncentracije agonista. Pri koncentraciji PGE1-OH 1 μ M učinek ni izražen. Pri 10 μ M je učinek dobro viden pri celicah RAMOS, saj se je metabolna aktivnost zmanjšala za 30

% v 24 urah. Pri celicah RAJI pa je učinek znaten pri koncentraciji 25 μM . Koncentracija 100 μM je bila za večino celic smrtna že po prvih 24 urah.

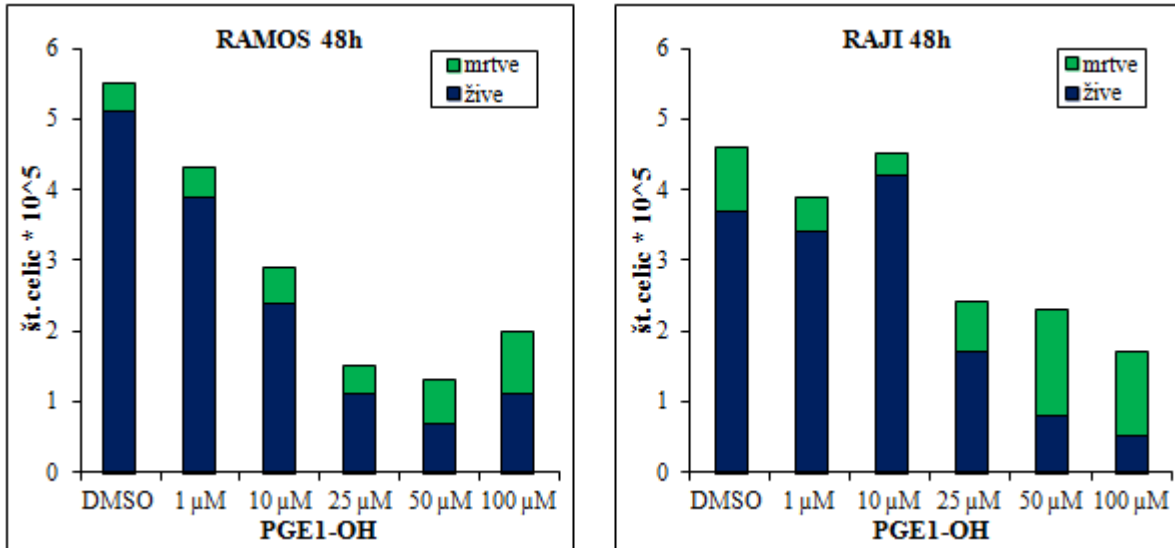
Pri celicah RAMOS smo ugotovili najhitrejši in najintenzivnejši farmakološki odziv na stimulacijo receptorja EP_4 . Ugotovljeno je bilo, da celice RAMOS izražajo receptor EP_4 v veliki količini (Priatelj M, et al, v pripravi za objavo). Vzrok za različen odziv celic je poleg ekspresije receptorja EP_4 lahko tudi diferenciacijska stopnja maligno transformiranega B limfocita. Potrdili smo domnevo, da PGE1-OH kot agonist receptorja EP_4 zmanjša metabolno aktivnost celic. Nadalje smo ovrednotili ali je zmanjšanje metabolne aktivnosti v celični kulturi celic RAMOS in RAJI posledica inhibicije proliferacije oz. indukcije celične smrti.

4.1.2 Aktivacija receptorja EP_4 vodi v celično smrt

V predhodnem eksperimentu smo ugotovili, da aktivacija receptorja EP_4 s PGE1-OH zmanjša metabolno aktivnost celic. Ali je zmanjšanje metabolne aktivnosti v celični kulturi celic RAMOS in RAJI posledica inhibicije proliferacije oz. indukcije celične smrti smo z izključitvenim testom z barvilom tripan modro določili viabilnost celic RAMOS in RAJI po aktivaciji receptorja EP_4 .

Izključitveni test s tripan modrim

Celice RAMOS in RAJI smo inkubirali z 1, 10, 25, 50 in 100 μM PGE1-OH 48 ur. Začetna koncentracija celic v posamezni vdolbini mikrotitrne ploščice je znašala 1×10^5 celic/mL. Viabilnost celic smo določili z avtomatskim števcem CountessTM, tako da smo pod sterilnimi pogoji odpipetirali 10 μL celične suspenzije in jo prenesli v mikrocentrifugirko. Dodali smo 10 μL tripankega modrila, ki obarva poškodovane in mrtve celice modro. Zmes smo dobro premešali s pipeto in jo nanесли na ploščico, ki je sestavljena iz dveh merilnih celic. Ploščico smo vstavili v instrument in po meritvi dobili naslednje rezultate: celokupno število celic, število živih celic in število mrtvih celic.



Slika 6: Vpliv PGE1-OH na viabilnost celic RAMOS in RAJI.

Celice RAMOS in RAJI smo inkubirali z različnimi koncentracijami PGE1-OH (1, 10, 25, 50 in 100 μM) 48 ur. Koncentracijo živih in mrtvih celic smo določili z avtomatskim števcem za štetje celic (CountessTM) po dodatku tripanškega modrila. DMSO označuje kontrolne (nestimulirane) celice.

Na sliki 6 vidimo, da je po 48 urni izpostavljenosti celic RAMOS in RAJI različnim koncentracijam PGE1-OH (1-100 μM) pri vseh vzorcih prišlo do zmanjšanja števila živih celic in celokupnega zmanjšanja števila celic. Odstotek mrtvih celic se pri nižjih koncentracijah PGE1-OH ni znatno povečal, kar nakazuje, da PGE1-OH v nižjih koncentracijah inhibira proliferacijo celic RAMOS in RAJI. Pri višjih koncentracijah (50 μM in 100 μM) PGE1-OH lahko opazimo, da je število mrtvih celic povečano, v primerjavi s kontrolo (DMSO) tako pri celicah RAMOS kot RAJI kar nakazuje na indukcijo celične smrti. Zmanjšanje števila živih celic in celokupnega števila celic je hitrejše pri celicah RAMOS. Celice RAMOS so bolj odzivne na stimulacijo receptorja EP₄, ker je bilo ugotovljeno, da celice RAMOS izražajo receptor EP₄ v veliki količini.

Z izključitvenim testom s tripan modrim smo ugotovili, da je PGE1-OH povzročil celično smrt, ker lahko opazimo celokupno zmanjšanje števila celic in zmanjšanje živih celic ter povečanje števila mrtvih celic.

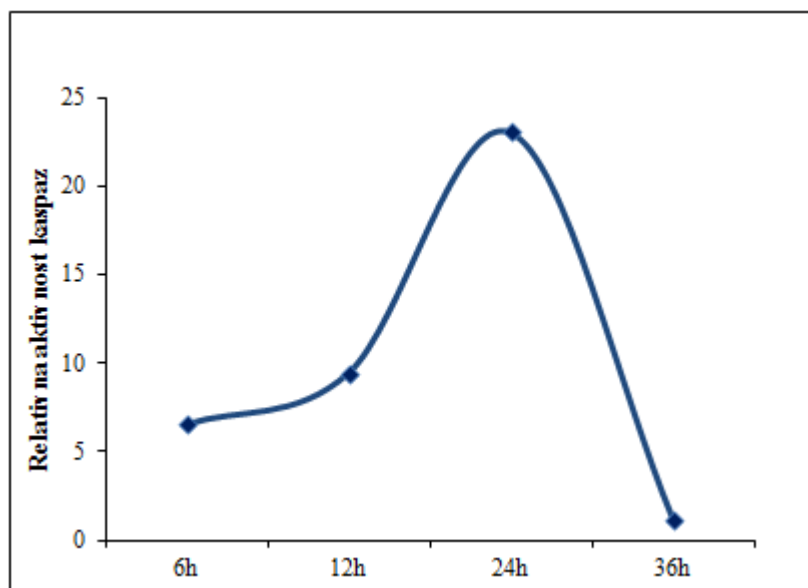
4.1.3 Aktivacija receptorja EP₄ inducira apoptozo v celicah RAMOS in RAJI

V predhodnem eksperimentu smo ugotovili, da aktivacija receptorja EP₄ vodi v celično smrt. Nadalje smo želeli ugotoviti, ali je za zmanjšanje števila živih celic ob delovanju PGE₁-OH odgovorna od kaspaz odvisna apoptoza. To smo določili z merjenjem aktivnosti kaspaz 3 in 7, ki cepita DEVD substrate v specifičnem vezavnem mestu.

Kaspaza 3 je osrednja izvršiteljska kaspaza, ki skupaj s kaspazama 6 in 7 razgrajuje številne celične proteine in se izraža v pozni fazi apoptoze. Kaspaza 3 je odgovorna za značilne morfološke spremembe v apoptotski celici (kondenzacija kromatina, fragmentacija DNA, brstenje citoplazme). Kaspaza 7 se po biokemičnih lastnostih ne razlikuje bistveno od kaspaze 3 (22).

Merjenje aktivnosti kaspaz 3 in 7

Za določanje aktivnosti kaspaz 3 in 7 v celicah RAMOS, smo uporabili peptidni substrat Ac-DEVD-AFC, ki ga kaspazi 3 in 7 cepita do produkta AFC. Celične lizate smo po dodatku 10 μ L 1 mM Ac-DEVD-AFC peptidnega substrata 30 minut inkubirali pri 37 °C in kontinuirano merili fluorescenco. Fluorescenco sproščenega AFC (7-amino-4-trifluorometil kumarin) smo merili pri valovni dolžini vzbujanja 405 nm in emisije 535 nm. Rezultat za vsak vzorec smo podali kot povečanje fluorescence v odvisnosti od časa (dF / dt) v primerjavi s kontrolo celic.



Slika 7: Aktivnost kaspaz 3 in 7 v celicah RAMOS.

Na podlagi rezultatov testa MTS, ki so pokazali, da je citotoksičnost pri 50 μM PGE1-OH najbolj izražena pri celicah RAMOS, smo le te inkubirali s 50 μM PGE1-OH do 36 ur (slika 7). Po 6 in 12 urah smo zasledili 5 do 10 kratno povečano kaspazno aktivnost v primerjavi s kontrolnimi celicami. Najvišjo stopnjo aktivnosti, 20 kratno povišanje kaspaz 3 in 7, smo izmerili po 24 urah. Po 36 urah je aktivnost kaspaz 3 in 7 ponovno padla. Povečana aktivnost kaspaz 3 in 7 nakazuje na indukcijo apoptoze po izpostavitvi celic RAMOS visokim koncentracijam PGE1-OH. Po 36 urah aktivnost kaspaz 3 in 7 močno pade. To je pričakovano, saj je do aktivacije kaspaz in nadaljnjih korakov, ki vodijo v krčenje volumna celice, izgubo stika s sosednjimi celicami, kondenzacijo kromatina, fragmentacijo DNA, brstenje membrane ter nastanek apoptotskih teles, verjetno prišlo že po 24 urah inkubacije. V tem delu diplomske naloge smo tako dokazali, da PGE1-OH sproži apoptozo v celicah RAMOS.

4.2 AKTIVACIJA RECEPTORJA EP₄ VODI V ZMANJŠANO IZRAŽANJE ANTIAPOPTOTSKEGA PROTEINA BCL-xL

Jedrni transkripcijski faktor NF κ B vključuje pet članov, in sicer: RelA (p65), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF κ B1) in p52/p100 (NF κ B2), ki so v obliki homo- ali heterodimerov vezani z inhibičnimi proteini I κ B. Ti kompleksi se nahajajo v neaktivni obliki v citoplazmi. Številni stimuli povzročajo aktivacijo IKK kompleksa, ki vodi v fosforilacijo I κ B proteinov in inducira

njihovo razgradnjo, kar omogoča sprostitvev prostih NFκB ter njihov transport v jedro, kjer regulirajo transkripcijo številnih genov (31). Geni, na katere cilja NFκB, sodelujejo pri celičnih in fizioloških funkcijah, vključno z apoptozo, proliferacijo, celično adhezijo in migracijo ter pri vnetnem in prilagodljivem imunskem odzivu. Aktivacija NFκB povzroča prekomerno izražanje BCL-xL, BCL-2, IAP1 in IAP2 in proliferativnih genov (ciklin D1, COX-2), ki lahko vodijo v rezistenco na apoptozo zaradi kemoterapije in obsevanja (38).

V prvem delu smo ugotovili, da stimulacija receptorja EP₄ s PGE1-OH izkazuje antiproliferativne fiziološke učinke na celice Burkittovega limfoma in vodi v od kaspaz odvisno programirano celično smrt. V drugem delu diplomske naloge pa bomo skušali ugotoviti ali aktivacija receptorja EP₄ zmanjša aktivacijo transkripcijskega faktorja NFκB in posledično vodi v zmanjšano izražanje antiapoptotskega proteina BCL-xL.

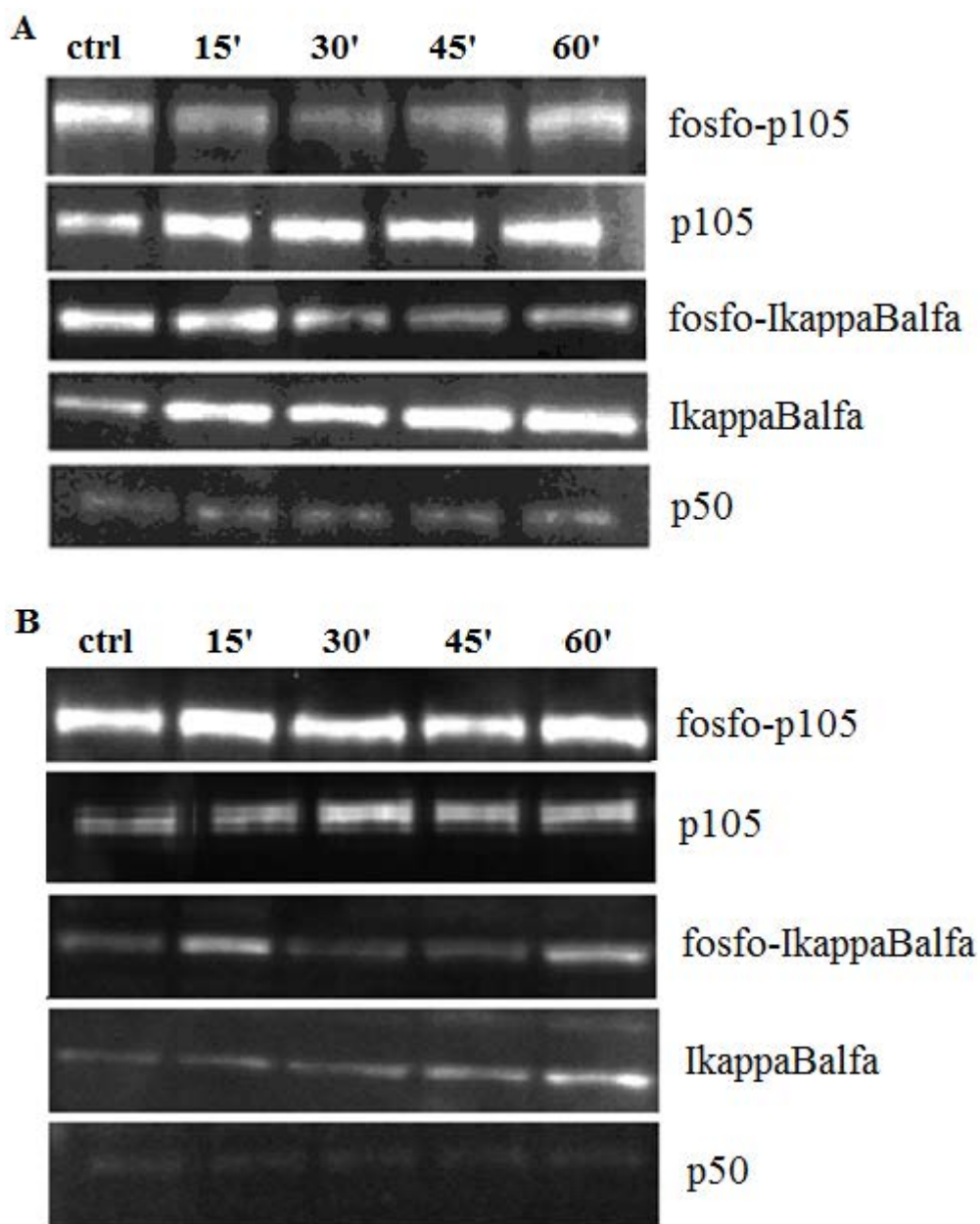
4.2.1 V celicah RAMOS in RAJI aktivacija receptorja EP₄ zmanjša aktivacijo transkripcijskega faktorja NFκB

EP₄ receptor je z G proteinom sklopljen receptor in dokazano je bilo, da njegova aktivacija povzroči porast cAMP, v nekaterih primerih pa tudi aktivira od cAMP neodvisne poti, ki vključujejo inhibicijo aktivacije transkripcijskega faktorja NFκB. Slednji preko receptorja EP₄ posreduje zaviralne učinke na celice WEHI-231, ki so mišji model za nezrele celice B (43). Zaradi te ugotovitve smo želeli preučiti vpliv PGE1-OH, selektivnega agonista receptorja EP₄, na aktivacijo NFκB v humanih B limfomih in levkemijah. Znano je, da RAMOS in RAJI celice prekomerno izražajo jedrni transkripcijski faktor NFκB. Da bi raziskali morebitno vlogo receptorja EP₄ pri modulaciji aktivacije NFκB, smo z imunodetekcijo preučili izražanje proteinov IκBα in p105 ter njihovo fosforilirano obliko v RAMOS in RAJI celicah po aktivaciji receptorja EP₄.

Ugotavljanje vpliva aktivacije receptorja EP₄ na podenote NFκB signalizacijske kaskade

Celice RAMOS in RAJI smo pri standardnih pogojih za gojenje celic inkubirali s 25 μM PGE1-OH ter po 15, 30, 45 in 60 minutah inkubacije celice lizirali in nato izmerili koncentracijo proteinov. Izražanje proteinov IκBα in p105 smo po elektroforezi SDS-PAGE in

prenosu western določili z imunodetekcijo. Enakomernost nanosa smo preverjali z določanjem izražanja proteina p50.



Slika 8: Izražanje inhibitornih proteinov I κ B v celicah (A) RAMOS in (B) RAJI po stimulaciji s PGE₁-OH.

Izražanje proteinov I κ B α , fosfo- I κ B α , p105 in fosfo-p105 v celicah RAMOS in RAJI smo določali po 15, 30, 45 in 60 minutah inkubacije s 25 μ M PGE₁-OH ter pri kontrolnih nestimuliranih celicah (ctrl). Z določanjem izražanja p50 smo preverili enakomernost nanosa.

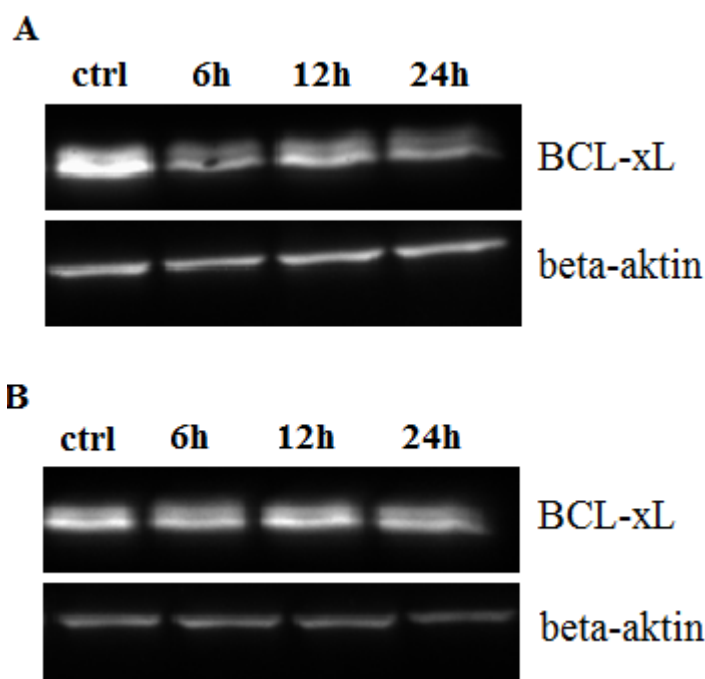
Ugotovili smo, da je stimulacija receptorja EP₄ s PGE1-OH zmanjšala raven fosfo-IκBα po 30, 45 in 60 minutah v celicah RAMOS (slika 8). PGE1-OH je povzročil zmanjšano fosforilacijo IκBα in posledično povečal nivo nefosforiliranega proteina IκBα, ki ostane v citoplazmi in tvori kompleks s transkripcijskim faktorjem NFκB, s čimer prepreči njegovo translokacijo v jedro. Stimulacija receptorja EP₄ ni vplivala na celokupno raven proteinov IκBα. Zaradi tega lahko sklepamo, da je zmanjšanje ravni fosfo-IκBα v celicah RAMOS rezultat zmanjšane fosforilacije IκBα in ne večje razgradnje IκBα v proteasomu. Poleg tega je PGE1-OH po 15 minutah tudi zmanjšal fosforilacijo p105 ter povečal nivo nefosforiliranega proteina p105 v celicah RAMOS. V makrofagih so odkrili pomemben dejavnik, ki posreduje inhibitorne učinke aktivacije receptorja EP₄, in sicer protein EPRAP, ki tvori kompleks z EP₄ in se direktno povezuje s proteinom p105. Po stimulaciji receptorja EP₄ s PGE₂ v makrofagih pride do inhibicije fosforilacije in degradacije proteina p105 preko tvorbe kompleksa EP₄-EPRAP-p105 (61,62). PGE1-OH preko inhibicije fosforilacije p105 zmanjšuje aktivacijo NFκB, saj p105 deluje kot inhibitorni protein in šele njegova fosforilacija omogoči razgradnjo do aktivnega p50, čemur sledi translokacija NFκB v jedro. V celicah RAJI ni bilo opaziti bistvenih razlik med proteinom p105 in njegovo fosforilirano obliko ter med proteinom IκBα in njegovo fosforilirano obliko. Takšen rezultat je najbrž posledica manjšega izražanja receptorja EP₄ v celicah RAJI in/ali manjše konstitutivne aktivacije transkripcijskega faktorja NFκB. Kot kontrolo nanosa smo uporabili p50, kajti njegova količina se v celicah RAMOS in RAJI ne spreminja, zato ga lahko uporabimo kot referenčni protein. Rezultati potrjujejo, da aktivacija receptorja EP₄ v celicah RAMOS zmanjša aktivacijo transkripcijskega faktorja NFκB.

4.2.2 Aktivacija receptorja EP4 vodi v zmanjšano izražanje BCL-xL v celicah RAMOS in RAJI

Bcl-2 družina proteinov igra ključno vlogo pri uravnavanju apoptoze. NFκB deluje kot preživetveni transkripcijski faktor in inducira izražanje antiapoptotskih genov družine Bcl-2 in inhibitorjev kaspaz (20). V predhodnem eksperimentu smo ugotovili, da PGE1-OH zmanjšuje aktivacijo transkripcijskega faktorja NFκB, ki regulira izražanje antiapoptotskih proteinov družine Bcl-2. Na podlagi naših ugotovitev smo preverili, če aktivacija receptorja EP₄ vodi v zmanjšano izražanje antiapoptotskega proteina BCL-xL v celicah Burkittovega limfoma.

Ugotavljanje vpliva aktivacije receptorja EP₄ na raven izražanja proteinov družine BCL-xL

Celice RAMOS in RAJI smo pri standardnih pogojih za gojenje celic inkubirali s 25 μ M PGE₁-OH ter po 6, 12 in 24 urah inkubacije celice lizirali in nato izmerili koncentracijo proteinov. Izražanje proteina BCL-xL smo po elektroforezi SDS-PAGE in prenosu western določili z imunodetekcijo. Enakomernost nanosa smo preverjali z določanjem izražanja β -aktina.



Slika 9: Izražanje proteina BCL-xL v celicah (A) RAMOS in (B) RAJI po stimulaciji s PGE₁-OH.

Izražanje proteina BCL-xL smo določali po 6, 12 in 24 urah inkubacije s 25 μ M PGE₁-OH ter pri kontrolnih nestimuliranih celicah (ctrl). Z določanjem izražanja β -aktina smo preverili enakomernost nanosa.

Dokazali smo, da je 25 μ M PGE₁-OH inhibiral izražanje proteina BCL-xL po 6, 12 in 24 urah pri celicah RAMOS (slika 9). Po 12 urah se je ekspresija v celicah RAMOS nekoliko povečala v primerjavi s celicami, ki smo jih stimulirali 6 ur s PGE₁-OH, vendar je bila manjša od kontrole. Takšen rezultat je lahko odvisen od procesa celične delitve do cikla apoptoze, saj stimulacija receptorja EP₄ sproži kaskado proapoptotskih signalov. Zmanjšanje izražanja proteina BCL-xL je intenzivnejše v celicah RAMOS. V celicah RAJI ni bilo opaziti bistvenih

razlik v izražanju BCL-xL, kar sovpada z rezultati analize fosforilacije inhibitornih proteinov NFκB, po aktivaciji receptorja EP₄ (slika 8/a). Kot kontrolo nanosa smo uporabili β-aktin, kajti njegova količina se v celicah RAMOS in RAJI ne spreminja, zato ga lahko uporabimo kot referenčni protein.

S tem testom smo potrdili domnevo, da aktivacija receptorja EP₄ zmanjšuje izražanje antiapoptotskega proteina BCL-xL.

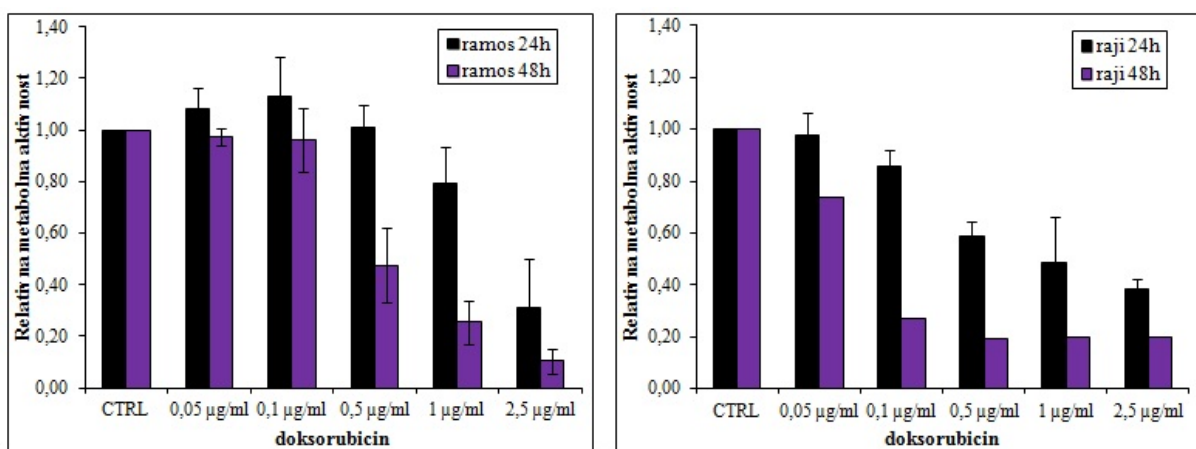
4.3 AGONIST RECEPTORJA EP₄ POVEČA CITOTOKSIČNE UČINKE DOKSORUBICINA IN BORTEZOMIBA

Znano je, da je povečana aktivacija NFκB povezana s preživetjem celic, napredovanjem malignih obolenj in rezistenco rakavih celic na učinke kemoterapevtikov, saj poveča izražanje številnih antiapoptotskih genov (35). Pokazali smo, da aktivacija receptorja EP₄ preko inaktivacije NFκB v celicah Burkittovega limfoma, vodi v zmanjšano izražanje antiapoptotskega proteina BCL-xL. V zadnjem delu diplomske naloge smo tako želeli oceniti, ali PGE1-OH poveča občutljivost celic na toksične učinke doksorubicina in bortezomiba. Sprva smo s testom MTS ovrednotili učinke doksorubicina oz. bortezomiba na metabolno aktivnost celic RAMOS in RAJI, nato pa ugotavljali ali aktivacija receptorja EP₄ te učinke poveča.

Celice RAMOS in RAJI smo gojili v prisotnosti doksorubicina/bortezomiba v različnih koncentracijah, z ali brez PGE1-OH v različnih koncentracijah. Kot kontrolo smo uporabili celice, ki smo jih gojili le v popolnem mediju RPMI. V vdolbine na mikrotitrski ploščici s 24 vdolbinicami za gojenje celičnih kultur smo sterilno odpipetirali 1 mL celične suspenzije s koncentracijo celic 1×10^5 celic/mL. Nato smo z multikanalno pipeto razdelili različno tretirane kulture na 2 (24, 48 h) mikrotitrski ploščici s 96 vdolbinicami. Iz vsakega alikvota različno tretirane celične kulture smo vzeli 2-krat po 100 μL (dvojna tehnična ponovitev). Poleg kultur smo v posebne vdolbinice dodali še 2-krat po 100 μL RPMI kot slepo kontrolo. Celice smo dali v inkubator in po 24 in 48 urah izvedli test MTS, kot je opisano v poglavju materiali in metode 3.3.

4.3.1 Vpliv doksorubicina na proliferacijo celic RAMOS in RAJI

Doksorubicin je kemoterapevtik, ki spada med antraciklinske antibiotike. Deluje v jedru, tako da zavira prepisovanje DNA in ustavi proces podvojevanja. Želeli smo ugotoviti njegov vpliv na rast in proliferacijo celic RAMOS in RAJI. Celice smo farmakološko tretirali v prisotnosti doksorubicina v različnih koncentracijah (0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ – 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Po 24 in po 48 urah smo s testom MTS določali metabolno aktivnost celic.



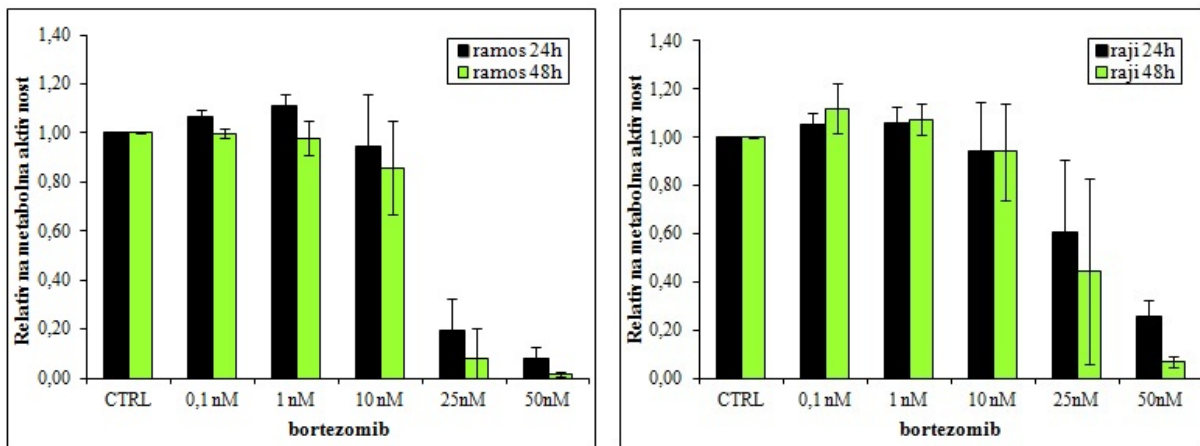
Slika 10: Metabolna aktivnost celic RAMOS in RAJI stimuliranih z doksorubicinom.

1×10^5 celic/mL smo 48 ur inkubirali z različnimi koncentracijami doksorubicina (0,05; 0,1; 0,5; 1 in 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Po 24 in 48 urah smo s testom MTS izmerili celično metabolno aktivnost, normalizirano na metabolno aktivnost kontrolnih nestimuliranih celic (ctrl).

Koncentracije doksorubicina (0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ – 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) niso izkazovale citotoksičnega učinka na celice RAMOS po 24 urah inkubacije, v primerjavi s kontrolnimi celicami (slika 10). Po 48 urah inkubacije je doksorubicin induciral citotoksične učinke na celice RAMOS pri koncentracijah višjih od 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Majhna občutljivost na toksične učinke doksorubicina je bila pričakovana, saj imajo celice RAMOS nefunkcionalno obliko tumor supresorskega gena p53 (38,39). Inaktivacija p53 je povezana z odpornostjo na DNA škodljive dejavnike. Pri celicah RAJI so različne koncentracije doksorubicina imele intenzivnejši citotoksičen učinek že po 24 urah, kljub mutaciji p53 (69).

4.3.2 Vpliv bortezomiba na proliferacijo celic RAMOS in RAJI

Bortezomib je kemoterapevtik, in sicer inhibitor proteasoma. Deluje tako, da posredno zavira aktivacijo NF κ B. Želeli smo ugotoviti njegov vpliv na rast in proliferacijo celic RAMOS in RAJI. Celice smo farmakološko tretirali v prisotnosti bortezomiba v različnih koncentracijah (0,1 nM – 50 nM). Po 24 in po 48 urah smo s testom MTS določali metabolno aktivnost celic.



Slika 11: Metabolna aktivnost celic RAMOS in RAJI stimuliranih z bortezomibom

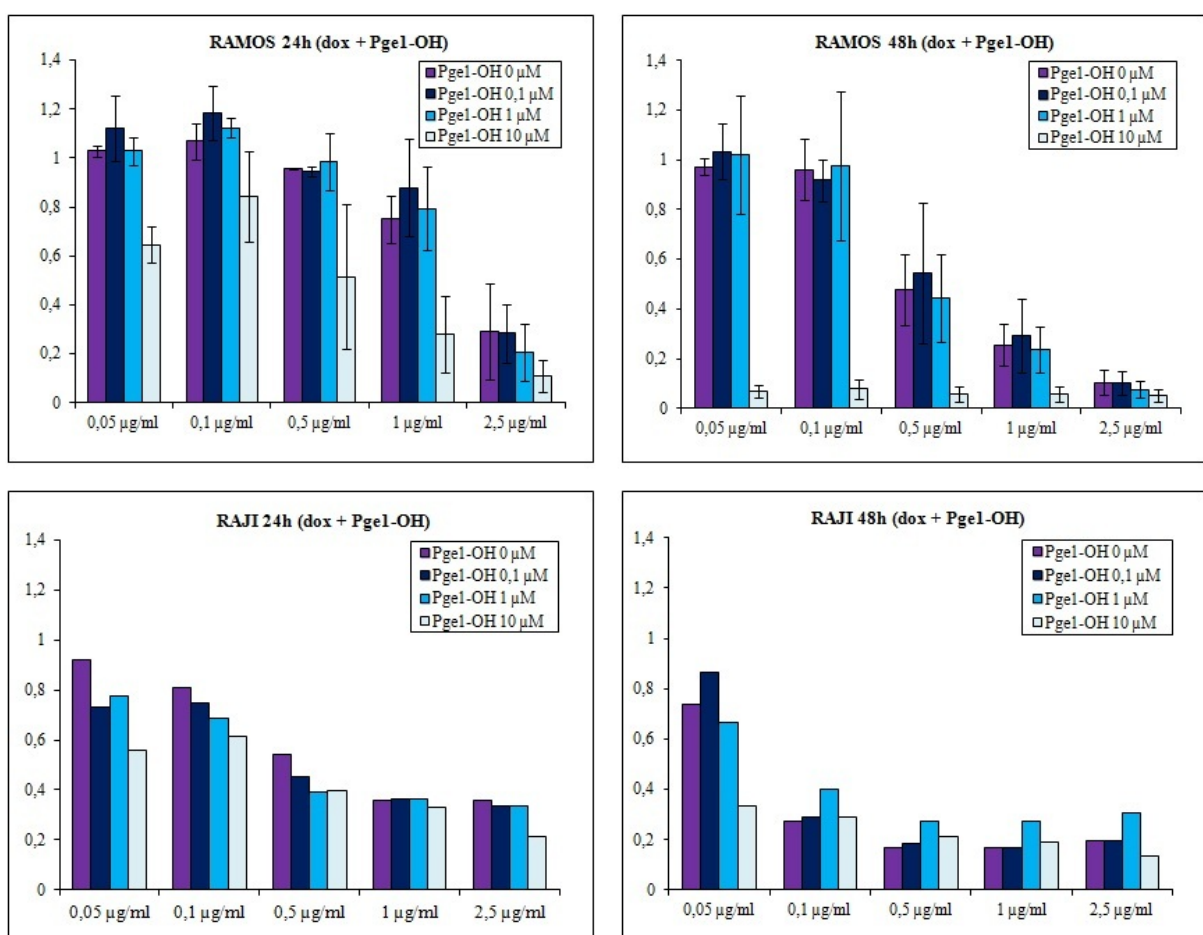
2×10^5 celic/mL smo 48 ur inkubirali z različnimi koncentracijami bortezomiba (0,1; 1, 10, 25 in 50 nM). Po 24 in 48 urah smo s testom MTS izmerili celično metabolno aktivnost, normalizirano na metabolno aktivnost kontrolnih nestimuliranih celic (ctrl).

Tako pri celicah RAMOS kot RAJI je bortezomib inducirал citotoksične učinke šele pri koncentracijah nad 25 nM v obeh časovnih točkah (slika 11).

Namen tega testa je bilo ugotoviti učinke doksorubicina in bortezomiba na celice z vidika metabolične aktivnosti. Ugotovili smo, da zmanjšata metabolno aktivnost celic in posredujeta citotoksične učinke na celice Burkittovega limfoma, vendar šele pri visokih koncentracijah; doksorubicin pri koncentracijah nad 2,5 μ g/mL pri RAMOS in pri koncentracijah nad 0,5 μ g/mL pri RAJI ter bortezomib pri koncentracijah nad 25 nM pri obeh vrstah celic. V nadaljevanju smo preverili, ali aktivacija receptorja EP₄ poveča opažene citotoksične učinke doksorubicina in bortezomiba.

4.3.3 Vpliv aktivacije receptorja EP₄ na farmakološke učinke doksorubicina

V predhodnem preizkusu smo ugotovili, da doksorubicin v koncentracijah nižjih od 2,5 ug/mL ni imel značilnega citotoksičnega učinka na celice. V nadaljevanju smo s testom MTS želeli ugotoviti, ali dodatek PGE1-OH poveča občutljivost celic RAMOS in RAJI na doksorubicin. Celice RAMOS in RAJI smo inkubirali v prisotnosti doksorubicina v različnih koncentracijah (0,05 µg/mL – 2,5 µg/mL) brez in s PGE1-OH v različnih koncentracijah (0,1 – 10 µM). Po 24 in po 48 urah smo s testom MTS določali metabolno aktivnost celic.



Slika 12: Metabolna aktivnost celic RAMOS in RAJI stimuliranih s PGE1-OH in doksorubicinom.

1x10⁵ celic/mL smo istočasno stimulirali z različnimi koncentracijami PGE1-OH (0,0, 0,1; 1 in 10 µM), in z različnimi koncentracijami doksorubicina (0,05; 0,1; 0,5; 1 in 2,5 µg/mL). Po 24 in 48 urah smo s testom MTS izmerili celično metabolno aktivnost, normalizirano na metabolno aktivnost kontrolnih nestimuliranih celic.

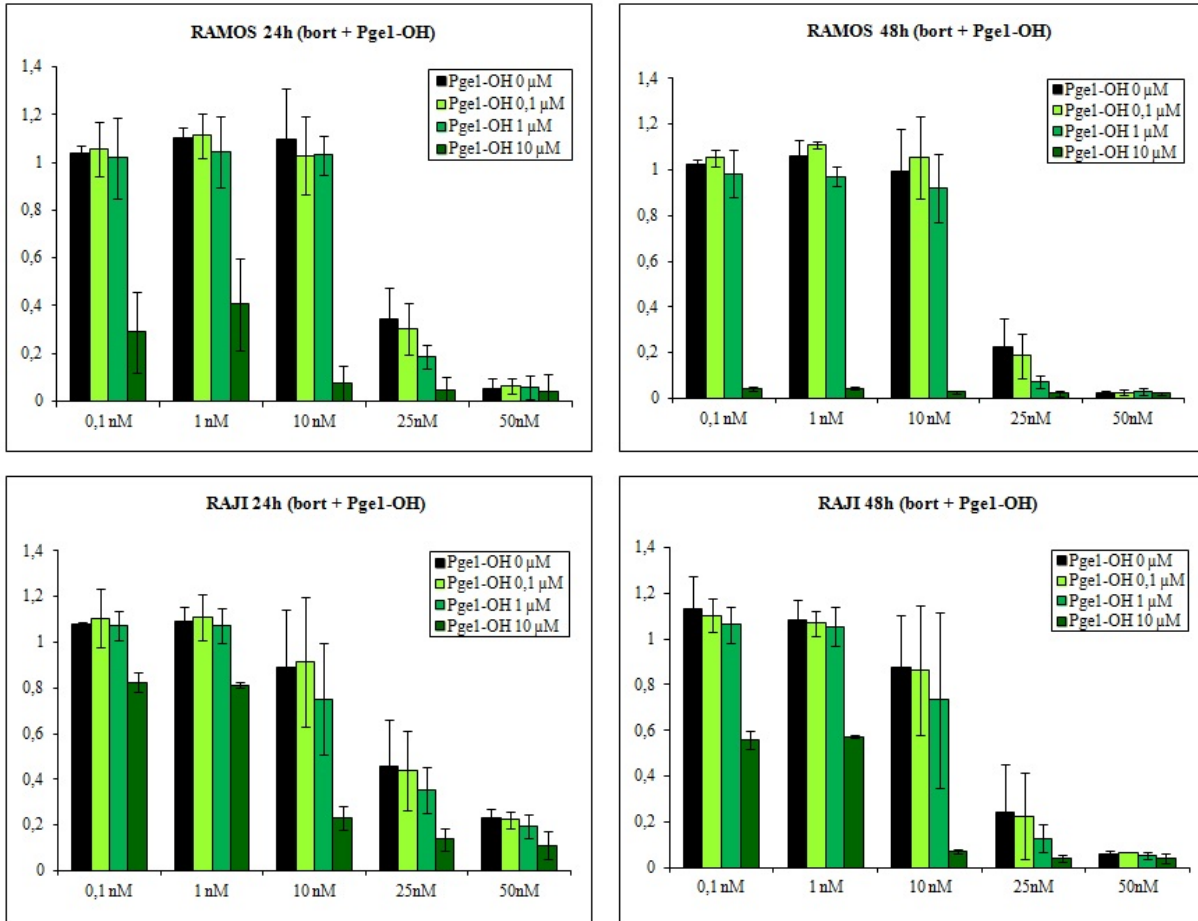
Dokazali smo, da kostimulacija celic z 10 μ M PGE1-OH deluje skupaj z doksorubicinom sinergistično na zmanjšanje metabolne aktivnosti celic RAMOS (Slika 12). Sinergizem je biološki odziv na izpostavljenost več snovem, katerih skupni učinek je večji od vsote učinkov posameznih snovi. Po 24 urah je tako 10 μ M PGE1-OH okrepil citotoksične učinke doksorubicina v celotnem koncentracijskem območju doksorubicina. Po 48 urah kombinacija 10 μ M PGE1-OH in doksorubicina vodi v popolno inhibicijo metabolne aktivnosti v celotnem koncentracijskem območju doksorubicina. Pri celicah RAJI sinergističen učinek doksorubicina in PGE1-OH ni bil tako izrazit kot na celicah RAMOS, saj smo sinergistično citotoksičen učinek na celicah RAJI opazili samo pri kombinaciji 0,05 μ g/mL doksorubicina z 10 μ M PGE1-OH.

Namen tega testa je bilo ugotoviti, če PGE1-OH poveča citotoksične učinke doksorubicina na celice. Potrdili smo domnevo, da aktivacija receptorja EP₄ poveča citotoksične učinke doksorubicina. Povečanje citotoksičnosti doksorubicina po aktivaciji receptorja EP₄ je večje pri celicah RAMOS, v primerjavi s celicami RAJI, kar sovpada z ugotovitvijo, da ima aktivacija receptorja EP₄ večji vpliv na inhibicijo aktivnosti NF κ B ter izražanje BCL-xL v celicah RAMOS, v primerjavi s celicami RAJI (slika 7/8).

4.3.4 Vpliv aktivacije receptorja EP₄ na farmakološke učinke bortezomiba

Ugotovili smo, da je bortezomib v koncentracijah nižjih od 25 nM ni izkazoval citotoksičnih učinkov na celice RAMOS in RAJI, zato smo s testom MTS želeli ugotoviti, ali dodatek PGE1-OH poveča občutljivost celic na bortezomib.

Celice RAMOS in RAJI smo inkubirali v prisotnosti bortezomiba v različnih koncentracijah (0,1 nM – 50 nM) brez in s PGE1-OH v različnih koncentracijah (0,1 – 10 μ M). Po 24 in po 48 urah smo s testom MTS določali metabolno aktivnost celic.



Slika 13: Metabolna aktivnost celic RAMOS in RAJI stimuliranih s PGE1-OH in bortezomibom.

2×10^5 celic/mL smo istočasno stimulirali z različnimi koncentracijami PGE1-OH (0,0, 0,1; 1 in 10 μM) in z različnimi koncentracijami bortezomiba (0,1; 1, 10, 25 in 50 nM). Po 24 in 48 urah smo s testom MTS izmerili celično metabolno aktivnost, normalizirano na metabolno aktivnost kontrolnih nestimuliranih celic.

Na sliki 13 vidimo, da 10 μM PGE1-OH skupaj z bortezomibom sinergistično vpliva na inhibicijo metabolne aktivnosti. Sinergistični učinki so bili izrazitejši na celicah RAMOS v primerjavi s celicami RAJI. Po 24 urah je na celice RAMOS 10 μM PGE1-OH okrepil citotoksične učinke bortezomiba pri koncentracijah 0,1; 1 in 10 nM. Pri koncentraciji bortezomiba 25 in 50 nM brez PGE1-OH ali z različnimi koncentracijami PGE1-OH (0,1 – 10 μM) ni bilo opaziti bistvenih razlik, saj bortezomib v teh koncentracijah že sam po sebi zmanjša metabolno aktivnost celic na 10 %. Po 48 urah kombinacija 10 μM PGE1-OH skupaj z bortezomibom vodi v popolno inhibicijo metabolne aktivnosti celic RAMOS, v celotnem koncentracijskem območju bortezomiba. Pri celicah RAJI je 10 μM PGE1-OH okrepil

citotoksične učinke bortezomiba v celotnem koncentracijskem območju po 24 urah koinkubacije. Po 48 urah je najmočnejše sinergistično delovala kombinacija 10 μ M PGE1-OH z vsemi koncentracijami bortezomiba, razen pri najvišji koncentraciji bortezomiba, ki že sama po sebi skoraj popolnoma inhibira celično proliferacijo celic RAJI. Inhibicija proteasoma z 10 nM bortezomibom je najmočnejše sinergistično delovala z 10 μ M PGE1-OH, saj se je zmanjšala proliferacija RAJI celic za 70 % glede na učinek 10 nM bortezomiba brez dodatka PGE1-OH. Pri RAMOS je inhibicija proteasoma z 0,1 nM bortezomibom najmočnejše sinergistično delovala z 10 μ M PGE1-OH, saj se je zmanjšala proliferacija celic za 90 % glede na učinek 0,1 nM bortezomiba brez dodatka PGE1-OH po 48 urah.

Namen tega testa je bilo ugotoviti, ali PGE1-OH poveča citotoksične učinke bortezomiba na celice RAMOS in RAJI. Potrdili smo domnevo, da PGE1-OH in bortezomib delujeta sinergistično, iz česar sledi, da aktivacija receptorja EP₄ poveča toksične učinke bortezomiba. Povečanje toksičnosti bortezomiba po aktivaciji receptorja EP₄ je bilo izrazitejše na celicah RAMOS, kar sovpada z ugotovitvijo, da ima aktivacija receptorja EP₄ večji vpliv na inhibicijo aktivnosti NF κ B ter izražanje BCL-xL v celicah RAMOS, v primerjavi s celicami RAJI (slika 7/8).

5 SKLEP

Burkittov limfom spada med agresivnejše limfome zrelih limfocitov B. V patogenezi Burkittovega limfoma so vpletene številne genetske in biokemijske nenormalnosti med drugim: aktivacija proto-onkogenega C-myc (8,15), inaktivacija tumor supresorskega gena p53 (11), infekcija z onkogenim virusom EBV (8,9) ter povečana konstitutivna aktivnost NF κ B transkripcijskega faktorja (35,37). Kombinacije citostatikov, ki se uporabljajo v terapiji Burkittovega limfoma imajo za posledico visoko stopnjo preživetja, vendar imajo številne toksične učinke. Zaradi neželenih stranskih učinkov so v razvoju nove terapijske strategije, ki so usmerjene k znanim molekularnim in genetskim nepravilnostim Burkittovega limfoma (7,15).

Receptor EP₄ smo ovrednotili kot potencialno tarčo za zdravljenje oz. podporno terapijo nekaterih vrst B levkemij in limfomov. V limfocitih B ima receptor EP₄ tumorsupresorsko funkcijo, saj njegova aktivacija posreduje inhibitorne učinke na proliferacijo mišjih malignih nezrelih in zrelih limfocitov B in poveča BCR inducirano apoptozo (42,43). V predhodnih študijah je bilo ugotovljeno, da aktivacija receptorja EP₄ povzroči porast cAMP, v nekaterih primerih pa tudi aktivira od cAMP neodvisne poti, ki vključujejo inhibicijo aktivacije transkripcijskega faktorja NF κ B (43). Geni, na katere cilja NF κ B, sodelujejo pri celičnih in fizioloških funkcijah, vključno z apoptozo, proliferacijo, celično adhezijo in migracijo ter pri vnetnem in adaptivnem imunskem odzivu. Aktivacija NF κ B povzroča prekomerno izražanje BCL-xL, BCL-2, IAP1 in IAP2 in proliferativnih genov (ciklin D1, COX-2), ki lahko vodijo v rezistenco na apoptozo zaradi kemoterapije in obsevanja (38).

V diplomski nalogi smo želeli ugotoviti ali velja podobno tudi za humani celični liniji Burkittovega limfoma, RAMOS in RAJI.

V prvem delu smo s testom MTS ugotovili, da so celice, odvisno od koncentracije agonista, po stimulaciji receptorja EP₄ metabolno manj aktivne. Z merjenjem aktivnosti kaspaz 3 in 7 smo potrdili programirano celično smrt na preiskovanih celicah RAMOS po aktivaciji receptorja EP₄.

V drugem delu naloge smo s pomočjo prenosa po westernu ugotovili, da je aktivacija receptorja EP₄ zmanjšala aktivacijo NF κ B, saj se je zmanjšala raven fosfo-I κ B α in fosfo-p105 ter povečala raven nefosforiliranih proteinov I κ B α in p105 v celicah RAMOS. V celicah RAJI

ni bilo opaziti bistvenih razlik med proteinoma I κ B α in p105 ter njunima fosforiliranima oblikama. Potrdili smo tudi domnevo, da aktivacija receptorja EP₄ zmanjšuje izražanje antiapoptotskega proteina BCL-xL v celicah RAMOS, medtem ko v celicah RAJI nismo zasledili bistvenih sprememb.

Nadalje smo ugotovili, da doksorubicin in bortezomib s PGE1-OH delujeta sinergistično in tako ojačata citotoksične učinke na celice RAMOS in RAJI.

V okviru diplomske naloge smo odkrili do sedaj še neprepoznano potencialno uporabo agonistov receptorja EP₄ kot novih učinkovin pri izboljšanju terapije B celičnih levkemij in limfomov.

6 LITERATURA

1. Glaser M: Kronične levkemije. *Med razgl* 2005; 44: 33-41.
2. Zver S. Akutne levkemije. *Onkologija – raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka*, Novaković S, et al. Mladinska knjiga, 1. izdaja, Ljubljana, 2009: 382-389.
3. Andolšek D. Bolezni krvi in krvotvornih organov. *Interna medicina*, glavni uredniki: Kocjančič A, Mravlje F, Štajer D. *Littera picta*, 3. izdaja, Ljubljana, 2005: 1256-1258.
4. Chiorazzi N, et al: Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 2005; 352: 804-815.
5. Rui L, Goodnow CC: Lymphoma and the control of B cell growth and differentiation. *Curr Mol Med* 2006; 6: 291-308.
6. Kuppers R: Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 251-262.
7. Blum KA, Lozanski G, Byrd JC: Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood* 2004; 104: 3009-3020.
8. Ferry JA: Burkitt's lymphoma: Clinicopathologic features and differential diagnosis. *The oncologist* 2006; 11: 375-383.
9. Scholtysik R, Kreuz M, Klapper W, et al: Detection of genomic aberrations in molecularly defined Burkitt's lymphoma by array based, high resolution, single nucleotide polymorphism analysis. *Haematologica* 2010; 95: 2047-2055.
10. Thorley-Lawson DA, Allday MJ: The curious case of the tumour virus: 50 years of Burkitt's lymphoma. *Nat Rev Micro* 2008; 6: 913-924.
11. Crawford DH: Biology and disease associations of Epstein Barr virus. *The royal society* 2001; 356: 461-473.
12. Chabay P, Lara J, Lorenzetti M, et al: Epstein Barr virus in relation to apoptosis markers and patients outcome in pediatric B-cell Non-Hodgkin lymphoma. *Cancer letters* 2011; 307: 221-226.
13. De Jong D: Novel lymphoid neoplasms – the borderland between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt's lymphoma. *Haematologica* 2009; 94: 894-896.

14. Hummel M, Bentink S, Berger H, et al: A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med* 2006; 354: 2419-2430.
15. Jezeršek Novaković B. Maligni limfomi. *Onkologija – raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka*, Novaković S, et al. Mladinska knjiga, 1. izdaja, Ljubljana, 2009: 374-380.
16. Stein R, Mattes MJ, Cardillo TM, et al: CD74: A new candidate target for the immunotherapy of B-cell neoplasms. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 5556s-5563s.
17. Thomas DA, Faderl S, Corte J, et al: Treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia with hyper-CVAD and imatinib mesylate. *Blood* 2004; 103: 4396-4407.
18. Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW: Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology* 2004; 163-183.
19. Zelenetz AD, Advani RH, Buadi F, et al: Non-Hodgkin's lymphomas: Clinical practice guidelines in oncology. *Journal of NCCN* 2010; 8: 288-334.
20. <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm>
21. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR: The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 2001; 92: 57-70.
22. Pižem J, Cör A: Kaspaze. *Med Razgl* 2001; 40: 283-291.
23. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN: Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol* 2005; 84: 627-639.
24. Nuñez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N: Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 1998; 17: 3237-3245.
25. Riedl SJ, Salvesen GS: The apoptosome: signaling platform of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007; 8: 405-413.
26. Vidic I, Šuput D, Milisav I: Modulatorji apoptoze kot nova zdravila. *Farm vestn* 2006; 57: 150-154.
27. Cory S, Adams JM: The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 647-56.
28. Reed JC: Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 1998; 17: 3225-36.

29. Letai A, Bassik MC, Walensky LD, et al: Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2002; 2: 183-92.
30. Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA: Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 178-194.
31. Luqman S, Pezzuto JM: NF κ B: A Promising Target for Natural Products in Cancer Chemoprevention. *Phytother. Res.* 2010; 24: 949-963.
32. Jost PJ, Ruland J: Aberrant NF- κ B signaling in lymphoma: mechanisms, consequences and therapeutic implications. *Blood* 2007; 109: 2700-2707.
33. Luo J, Kamata H, Karin M: IKK/NF- κ B signaling: balancing life and death-a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest.* 2005; 115: 2625-2632.
34. Sethi G, Sung B, Aggarwal BB: Nuclear Factor- κ B Activation: From Bench to Bedside. *Experimental Biology and Medicine* 2008; 233: 21-31.
35. Zhang H, Yan D, Shi X, L, et al: Transmembrane TNF- α mediates forward and reverse signaling, inducing cell death or survival via the NF- κ B pathway in Raji Burkitt lymphoma cells. *Journal of Leukocyte Biology* 2008; 84: 789-797.
36. Cahir-McFarland ED, Davidson DM, Schauer SL, et al: NF-kappaB inhibition causes spontaneous apoptosis in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 6055-6060.
37. Nazari M, Ghorbani A, Hekmat-Doost A, et al: Inactivation of nuclear factor- κ B by citrus flavanone hesperidin contributes to apoptosis and chemo-sensitizing effect in Ramos cells. *Eur J Pharmacol* 2011; 650: 526-533.
38. Zand H, Rahimipour A, Salimi S, Shafiee SM: Docosahexaenoic acid sensitizes Ramos cells to Gamma-irradiation-induced apoptosis through involvement of PPAR-gamma activation and NF-kappaB suppression. *Mol Cell Biochem* 2008; 317: 113-120.
39. Call JA, Gail Eckhardt S, Ross Camidge D: Targeted manipulation of apoptosis in cancer treatment. *Lancet Oncology* 2008; 9: 1002-1011.
40. Dey I, Lejeune M, Chadee K: Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. *British journal of pharmacology* 2006; 149: 611-623.

41. Fujino H, Salvi S, Regan JW: Differential regulation og phosphorylation of the cAMP response element-binding protein after activation of EP2 and EP4 prostanoid receptors by prostaglandin E2. *Mol Pharmacol.* 2005; 68: 251-259.
42. Murn J, Alibert O, Wu N, et al: Prostaglandin E2 regulates B cell proliferation through a candidate tumor suppressor, Ptger4. *Journal of Experimental Medicine* 2008; 205: 3091-3103.
43. Prijatelj M, Celhar T, Mlinaric-Rascan I: Prostaglandin EP4 receptor enhances BCR-induced apoptosis of immature B cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2011; 95: 19-26.
44. Hoshino T, Tsutsumi S, Tomisato et al: Prostaglandin E2 protects gastric mucosal cells from apoptosis via EP2 and EP4 receptor activation. *J Biol Chem* 2003; 278: 12752-12758.
45. Kabashima K, Saji T, Murata T, et al: The prostaglandin receptor EP4 supresses colitis, mucosal damage and CD14 cell activation in the gut. *J. Cli. Invest.* 2002; 109: 883-893.
46. Kitamura T, Itoh M, Noda T, et al: Combined effects of prostaglandin E receptor subtype EP1 and subtype EP4 antagonists on intestinal tumorigenesis in adenomatous polyposis coli gene knockout mice. *Cancer Sci* 2003; 94: 618-621.
47. Martineau LC, McVeigh LI, Jasmin BJ, Kennedy CRJ: p38 MAP kinase mediates mechanically induced COX-2 and PGE EP4 receptor expression in podocytes: implications for the actin cytoskeleton. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286: F693-701.
48. Miyaura C, Inada M, Suzawa T, et al: Impaired bone resorption to prostaglandin E2 in prostaglandin E receptor EP4-knockout mice. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 19819-19823.
49. Kobayashi Y, Mizoguchi T, Take I, et al: Prostaglandin E2 enhances osteoclastic differentiation of precursor cells through protein kinase A-dependent phosphorylation of TAK1. *Journal of Biological Chemisrty* 2005; 280: 11395-11403.
50. Bradbury D, Clarke D, Seedhouse C, et al: Vascular endothelial growth factor induction by prostaglandin E2 in human airway amooth muscle cells is mediated by E

- prostanoid EP2/EP4 receptors and SP-1 transcription factor binding sites. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 29993-30000.
51. Hata NA, Breyer RM: Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: Multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacology & Therapeutics* 2004; 103: 147-166.
 52. Ushio A, Takikawa Y: Induction of Bcl-xL is a possible mechanism of antiapoptotic effect by prostaglandin E2 EP4-receptor agonist in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Hepatology Research* 2004; 29: 173-179.
 53. Higaki S, Gebhardt BM, Lukiw WJ, et al: Effect of immunosuppression on gene expression in the HSV-1 latently infected mouse trigeminal ganglion. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002; 43: 1862-1869.
 54. Kabashima K, Sakata D, Nagamachi M, et al: Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells. *Nat Med* 2003; 9: 744-749.
 55. Nataraj C, Thomas DW, Tilley SL, et al: Receptors for prostaglandin E₂ that regulate cellular immune responses in the mouse. *J Clin Invest* 2001; 108: 1229-1235.
 56. Fedyk ER, Phipps RP: Prostaglandin E2 receptors of the EP2 and EP4 subtypes regulate activation and differentiation of mouse B lymphocytes to IgE-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 10978-10983.
 57. Hull MA, Ko SCW, Hawcroft G: Prostaglandin EP receptors: Targets for treatment and prevention of colorectal cancer. *Mol Cancer Ther.* 2004; 3: 1031-1039.
 58. Fujino H, Xu W, Regan JW: Prostaglandin E2 induced functional expression of early growth response factor-1 by EP4, but not EP2, prostanoid receptors via the phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem.* 2003; 278: 12151-6.
 59. Largo R, Díez-Ortego I, Sanchez-Pernaute O, et al: EP2/EP4 signalling inhibits monocyte chemoattractant protein-1 production induced by interleukin 1beta in synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis.* 2004; 63: 1197-204.
 60. Gomez PF, Pillinger MH, Attur M, et al: Resolution of inflammation: prostaglandin E2 dissociates nuclear trafficking of individual NF-kappaB subunits (p65, p50) in stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. *J Immunol.* 2005; 175: 6924-30.

61. Takayama K, Sukhova GK, Chin MT, et al: A novel prostaglandin E receptor 4-associated protein participates in antiinflammatory signaling. *Circulation research* 2006; 98: 499-504.
62. Minami M, Shimizu K, Okamoto Y, et al: Prostaglandin E receptor type 4-associated protein interacts directly with NF- κ B1 and attenuates macrophage activation. *J Biol. Chem* 2008; 283: 9692-9703.
63. <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CRL-1596&Template=cellBiology>
64. <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CCL-86&Template=cellBiology>
65. http://www.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-assays/celltiter-96-aqueous-non_radioactive-cell-proliferation-assay-_mts_/
66. Protein Assay. Bio-Rad Laboratories SIG 120197, LIT 448 RevD.
67. Štrukelj B, Kos J: *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*. Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana 2007; 146-148, 174.
68. Kuhelj R: *Biokemija v praksi: načela in tehnike, s priložo: Renko M, Kuhelj R, Bevec T, et al: Navodila za eksperimentalno delo pri laboratorijskih vajah iz biokemije*. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 2003; 68-71, 73-74.
69. Fan S, El-Deiry WS, Bae I, et al: p53 Gene Mutations Are Associated with Decreased Sensitivity of Human Lymphoma Cells to DNA Damaging Agents. *Cancer Research* 1994; 54: 5824-5830.