

**UNIVERZA V LJUBLJANI**  
**FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**REBEKA DOLJAK**

VREDNOTENJE SINERGISTIČNEGA DELOVANJA AGONISTA  
RECEPTORJA EP4 IN TERAPEVTSKIH MONOKLONSKIH PROTITELES  
*IN VITRO*

**SYNERGYSTIC EFFECTS OF EP4 RECEPTOR AGONISTS AND  
THERAPEUTIC MONOClonAL ANTIBODIES *IN VITRO***

MAGISTRSKO DELO  
MAGISTRSKI ŠTUDIJ INDUSTRIJSKE FARMACIJE

Ljubljana, 2015

**Magistrsko naložko sem opravljala na Univerzi v Ljubljani; Fakulteti za farmacijo, na Katedri za klinično biokemijo pod mentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič Raščan, mag. farm.**

## ZAHVALA

*Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Ireni-Mlinarič Raščan, mag. farm. za strokovne nasvete in za vprašanja, ki so spodbudila moj raziskovalni duh.*

*Delovni mentorici Tijani Markovič se zahvaljujem za praktične nasvete, usmerjanje pri laboratorijskem delu in za nesebično pomoč med pisanjem magistrske naloge.*

*Za dostopnost in prijaznost se zahvaljujem tudi vsem zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo.*

*Nenazadnje se zahvaljujem še svojim staršem, ki so mi omogočili študij ter prijateljem ki so mi stali ob strani.*

## IZJAVA

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

Rebeka Doljak

### Komisija za zagovor:

Predsednica komisije: prof.dr. Julijana Kristl

Mentorica: prof.dr. Irena Mlinarič-Raščan

Član komisije: doc.dr. Jožko Cesar

# KAZALO VSEBINE

<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>II</b>
<b>KAZALO SLIK.....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC.....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO ENAČB .....</b>	<b>V</b>
<b>POVZETEK.....</b>	<b>VI</b>
<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Limfociti B .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. Aktivacija limfocitov B ter klonska selekcija .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Maligne bolezni limfocitov B .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2.1. Kronična limfocitna levkemija.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2.2. Limfomi.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2.3. Zdravljenje kronične limfocitne levkemije in Burkittovega limfoma .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3. Apoptoza .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3.1. NF-κB v apoptozi .....</b>	<b>7</b>
<b>1.4. Mehanizmi celične smrti z anti-CD20 in anti-CD52 monoklonskimi protitelesi .....</b>	<b>7</b>
<b>1.5. Izzivi pri zdravljenju B celičnih limfomov in B-celičnih levkemij .....</b>	<b>9</b>
- Pomanjkanje komponent sistema komplementa .....	<b>10</b>
- Polimorfizmi Fc receptorja.....	<b>10</b>
- Mutacije antigena CD20 in znižanje ekspresije CD20.....	<b>10</b>
- Zmanjšanje ekspresije genov Bak in Bax.....	<b>10</b>
<b>1.6. Receptor EP4 in možnost novih terapevtskih pristopov pri zdravljenju limfomov in levkemij .....</b>	<b>11</b>
<b>2. NAMEN DELA.....</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1. Materiali.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1.1. Kemikalije .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1.2. Kompleti za analize.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1.3. Pufri in raztopine.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1.4. Protitelesa in fluorescenčna barvila.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1.5. Gojišča in sestava .....</b>	<b>16</b>

<b>3.1.6.</b>	Laboratorijska in programska oprema.....	17
<b>3.2.</b>	<b>Metode dela s celicami .....</b>	18
<b>3.2.1.</b>	Delo v celičnem laboratoriju .....	18
<b>3.2.2.</b>	Humane celične linije.....	19
<b>3.2.3.</b>	Odmrzovanje celičnih kultur .....	19
<b>3.2.4.</b>	Kultivirane celične linije .....	19
<b>3.2.5.</b>	Subkultiviranje celičnih linij .....	20
<b>3.2.6.</b>	Štetje celic .....	20
<b>3.3.</b>	<b>Limfoblastoidne celične linije.....</b>	21
<b>TEST ZA DOLOČANJE METABOLNE AKTIVNOSTI CELIC .....</b>		22
<b>3.3.1.</b>	Postopek inkubacije celic Ramos z monoklonskimi protitelesi in PGE1-OH ter MTS test viabilnosti.....	22
<b>3.3.2.</b>	Postopek inkubacije celic LCL s PgE1-OH in MTS test viabilnosti.....	23
<b>3.4.</b>	<b>Fluorescenčna mikroskopija .....</b>	23
<b>3.4.1.</b>	Fluorescenza.....	23
<b>3.4.2.</b>	Epifluorescenčna mikroskopija .....	24
<b>3.4.3.</b>	Fluorofori uporabljeni za fluorescenčno mikroskopijo .....	24
<b>3.4.4.</b>	Postopek priprave celic za mikroskopiranje.....	25
<b>3.5.</b>	<b>Pretočna citometrija.....</b>	26
<b>3.5.1.</b>	Postopek priprave celične suspenzije za analizo na pretočnem hemocitometru .....	27
<b>4.</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	28
<b>4.1.</b>	<b>Humani serum aktivira s komplementom posredovano citotoksičnost <i>in vitro</i> .....</b>	29
<b>4.2.</b>	<b>PgE1-OH in monoklonska protitelesa proti CD20 in proti CD52 zmanjšajo metabolno aktivnost malignih limfocitov B .....</b>	31
<b>4.2.1.</b>	Sinergistični učinek rituksimaba in PgE1-OH na celicah Ramos (1% serum).....	33
<b>4.2.2.</b>	Sinergistični učinek ofatumumaba in PgE1-OH na celicah Ramos (1% serum) .....	35
<b>4.2.3.</b>	Učinek alemtuzumaba in PgE1-OH na celicah Ramos (1% serum) .....	37
<b>4.2.4.</b>	Sinergistični učinek rituksimaba in PgE1-OH na celicah Ramos (2,5% serum).....	39
<b>4.2.5.</b>	Sinergistični učinek ofatumumaba in PgE1-OH na celicah Ramos (2,5% serum) .....	40
<b>4.2.6.</b>	Učinek alemtuzumaba in PgE1-OH na celicah Ramos (2,5% serum) .....	42
<b>4.3.</b>	<b>Vpliv PgE1-OH na celice LCL .....</b>	44
<b>4.3.1.</b>	Izražanje receptorja EP4.....	44

<b>4.3.2.</b>	PgE1-OH ima manjši vpliv na živost zdravih (celice LCL) v primerjavi z malignimi (Ramos) limfociti B.....	<b>45</b>
<b>4.3.3.</b>	Inter-individualna variabilnost v odzivu na PgE1-OH.....	<b>46</b>
<b>4.3.4.</b>	Korelacija med količino receptorja EP4 na LCL celicah in smrtnostjo celic.....	<b>47</b>
<b>5.</b>	<b>SKLEPI</b> .....	<b>51</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>52</b>

## KAZALO SLIK

Slika 1: Razvojne stopnje limfocitov B ter izražanje površinskih označevalcev, ki delujejo kot tarče za biološka zdravila .....	1
Slika 2: Peptidna sestava celičnega označevalca CD20 .....	5
Slika 3: Vezava anti CD20 monoklonskih protiteles in mehanizmi aktivacije celične smrti.....	9
Slika 4: Ekspresija receptorja EP4 v različnih celičnih linijah .....	11
Slika 5: Strukturna primerjava med endogenim ligandom PGE2 (levo) in sinteznim derivatom agonista receptorja EP4 (PgE1-OH) (desno). Povzeto po (8). .....	12
Slika 6: Metabolna aktivnost celic Ramos ob dodatku rituksimaba (A), ofatumumab (B) in alemtuzumab (C) ter seruma kot vira komplementa: .....	30
Slika 7: Metabolna aktivnost celic Ramos po 24 (A) in 48 urni (B) inkubaciji z rituksimabom, PgE1-OH in serumom (1%) kot virom komplementa.....	33
Slika 8: Metabolna aktivnost celic Ramos po 24(A) in 48 urni (B) inkubaciji z ofatumumabom, PgE1-OH in serumom (1%) kot virom komplementa.....	35
Slika 9: Metabolna aktivnost celic Ramos po 24(A) in 48 urni (B) inkubaciji z alemtuzumabom, PgE1-OH in serumom (1%) kot virom komplementa.....	37
Slika 10: Metabolna aktivnost celic Ramos po 24(A) in 48 urni (B) inkubaciji z rituksimabom, PgE1-OH in serumom (2,5%) kot virom komplementa.....	39
Slika 11: Metabolna aktivnost celic Ramos po 24 (A) in 48 urni (B) inkubaciji z ofatumumabom, PgE1-OH in serumom (2,5%) kot virom komplementa.....	41
Slika 12: Metabolna aktivnost celic Ramos po 24 (A) in 48 urni (B) inkubaciji z alemtuzumabom, PgE1-OH in serumom (2,5%) kot virom komplementa.....	42
Slika 13: Izražanje receptorja EP4 na celicah LCL.....	44
Slika 14 Grafični prikaz vrednosti EC50 na celicah LCL po 24 inkubacije .....	46
Slika 15: Grafični prikaz vrednosti EC50 na LCL linijah po 72 h inkubacije .....	47
Slika 16: Korelacija med povprečno intenzitetu fluorescence in EC50 vrednostjo na celicah LCL.....	49

## **KAZALO PREGLEDNIC**

Preglednica 1: Kemikalije .....	14
Preglednica 2: Kompleti za analize .....	14
Preglednica 3: Protitelesa in fluorescenčna barvila.....	15
Preglednica 4: Laboratorijska oprema.....	17
Preglednica 5: Kombinacijski indeks .....	32
Preglednica 6: Sinergistični učinek rituksimaba in PgE1-OH .....	34
Preglednica 7: Sinergistični učinek ofatumumaba in PgE1-OH .....	36
Preglednica 8: Vrednotenje vpliva alemtuzumaba in PgE1-OH na celice Ramos s programom CompuSyn.....	38
Preglednica 9: Sinergistični učinek rituksimaba in PgE1-OH (2,5% serum).....	40
Preglednica 10: Sinergistični učinek rituksimaba in PgE1-OH (2,5% serum).....	42
Preglednica 11: EC50 vrednosti po 24 urah inkubacije LCL celic s PgE1-OH.....	45
Preglednica 12: EC50 vrednosti po 72 urah inkubacije LCL celic s PgE1-OH.....	47
Preglednica 13: Delež receptorja EP4 na LCL linijah in povprečne EC50 vrednosti.....	48

## **KAZALO ENAČB**

Enačba 1: Enačba za računanje koncentracije celic s hemocitometrom .....	21
--	----

## POVZETEK

Maligne bolezni limfocitov B, med katere sodita kronična limfocitna levkemija (KLL) in Burkittov limfom, predstavljajo širok spekter hematoloških obolenj z različnimi citogenetskimi in histopatološkimi lastnostmi. Zanje je značilno nenadzorovano razraščanje v levkocitno vrsto usmerjenih celic. Zdravljenje je za posamezen podtip levkemij ali limfomov natančno določeno in se glede na odzivnost na terapijo prilagaja. Ker se vedno pogosteje pojavlja rezistenca levkemičnih tumorskih celic na standardne terapije, se v ta namen iščejo nove terapije ter individualiziran pristop zdravljenja pacientov.

Aktivacija B celičnega receptorja (BCR) na limfocitih B sproži povečano ekspresijo *Ptger4*, ki kodira prostaglandinski receptor EP4. V predhodnih raziskavah so ugotovili, da agonist receptorja EP4 aktivira apoptozo malignih limfocitov B preko NF-κB in cAMP signalnih poti. Prostaglandinski receptor EP4 tako predstavlja potencialno tarčo za zdravljenje B celičnih levkemij in limfomov. Med sodobna biološka zdravila za zdravljenje B celične kronične limfocitne levkemije uvrščamo monoklonska protitelesa proti površinskim antigenoma CD20 (rituksimab, ofatumumab) in CD52 (alemtuzumab). Monoklonska protitelesa proti površinskemu antigenu CD20 blokirajo NF-κB signalno pot, s čimer pripomorejo k apoptizi limfocitov B. Dejstvo, da tako agonist receptorja EP4 kot tudi monoklonska protitelesa proti antigenu CD20 modulirajo NF-κB signalno pot v malignih limfocitih B, nas je vodilo k postavitvi hipoteze, da skupaj delujejo sinergistično. Vrednotili smo živost celic Ramos po inkubaciji z različnimi koncentracijami agonista EP4 receptorja PgE1-OH ter z monoklonskimi protitelesi rituksimab, ofatumumab in alemtuzumab. Živost smo spremljali preko relativne metabolne aktivnosti. Ugotovili smo, da agonist receptorja EP4 v kombinaciji z monoklonskima protitelesoma proti površinskemu označevalcu CD20 (rituksimab in ofatumumab) deluje sinegristično in s pomočjo programa CompuSyn dokazali, da gre za sinergistični učinek. Monoklonsko protitelo alemtuzumab, ki deluje proti površinskemu označevalcu CD52, je imelo v kombinaciji s PgE1-OH manjše učinke na živost celic Ramos. Učinek agonista receptorja EP4 smo preverjali tudi na desetih limfoblastoidnih celičnih linijah (LCL), ki so nam služile kot *in vitro* model limfocitov B zdravih darovalcev.

Z vrednotenjem EC50 vrednosti na celicah LCL, smo dokazali, da ima agonist receptorja EP4 manjši učinek na zdravih kot na maligno preobraženih limfocitih B. Opazili smo tudi inter-individualno variabilnost v odzivu na agonist receptorja EP4.

S tem delom doprinašamo k iskanju novih terapevtskih pristopov zdravljenja kronične limfocitne levkemije in Burkittovega limfoma.

## ABSTRACT

Malignant diseases of B lymphocytes represent a broad spectrum of haematologic malignancies with different cytogenetic and histopathologic characteristics with the common characteristic of uncontrolled spreading of white blood cells. B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL) and Burkitt's lymphoma are one of the most prominent ones. The treatment differs between types of leukemia or lymphoma and regarding to the responsiveness of the patient, the treatment is adjusted. Nowadays resistance of tumor cells to standard therapies is becoming a major problem. Therefore, novel treatments and individualized approaches are needed.

Activation of B-cell receptor (BCR) on B lymphocytes up-regulates the expression of the gene *Ptger4*, coding for the prostaglandin receptor EP4. It was demonstrated, that the agonist of the EP4 receptor triggers the apoptosis of malignant B lymphocytes through the NF- $\kappa$ B and cAMP signaling pathways.

Prostaglandin receptor EP4 represents a potential target for treating B cell malignancies. Monoclonal antibodies directed against surface antigens CD20 (rituximab, ofatumumab) and CD52 (alemtuzumab) are the most widely used biological therapeutics for treating B-cell chronic lymphocytic leukemia. The anti-CD20 monoclonal antibodies block the NF- $\kappa$ B signaling pathway, thus aiding to the apoptosis of the B lymphocytes. The fact that the agonist of the EP4 receptor and the anti-CD20 monoclonal antibodies modulate the NF-  $\kappa$ B signaling pathway in the malignant B lymphocytes, led us hypothesize that they act synergistically. We evaluated the viability of Ramos cells (Burkitt's lymphoma cell line) after the incubation with different concentrations of PgE1-OH in combination with monoclonal antibodies rituximab, ofatumumab and alemtuzumab. The cell viability was assessed by the relative metabolic activity assay. We demonstrated that EP4 receptor agonist has a synergistic effect in combination with anti CD20 monoclonal antibodies (rituximab and ofatumumab). We confirmed the latter with the program CompuSyn, which evaluates the synergistic effects of multiple drugs. The monoclonal antibody alemtuzumab, directed against the CD52 surface

antigen had less effect on the viability of Ramos cells in combination with PgE1-OH compared to rituximab and ofatumumab.

Next, we measured the effect of the EP4 receptor agonist PgE1-OH on ten lymphoblastoid cell lines (LCL), which served us as an *in vitro* model of B lymphocytes of healthy donors. By evaluating the EC50 values of LCL cells, we demonstrated that the EP4 receptor agonist has less effect on healthy cells than on malignant B lymphocytes. We observed an inter-individual variability in the response to the EP4 receptor agonist PgE1-OH.

With our research we contribute to the development of novel therapeutic approaches for the treatment of the Non-Hodgkin's lymphomas.

## SEZNAM OKRAJŠAV

<b>APAF-1</b>	kaspaze aktivirajoči dejavnik ( <i>angl. apoptotic protease-activating factor 1</i> )
<b>ADCC</b>	s protitelesi posredovana citotoksičnost ( <i>angl. antibody dependent cell cytotoxicity</i> )
<b>ALL</b>	akutna limfoblastna levkemija
<b>AML</b>	akutna mieloična levkemija
<b>ATM</b>	gen, ki kodira protein kinazo, odgovorno za nadzor celičnega cikla ( <i>angl. ataxia telangiectasia mutated</i> )
<b>BCR</b>	B-celični receptor
<b>Bcl-2</b>	B-celični limfom 2 ( <i>angl. B-cell lymphoma 2</i> )
<b>Bax</b>	z Bcl-2 povezan protein x ( <i>angl. Bcl-2 associated x protein</i> )
<b>CDC</b>	s komplementom posredovana citotoksičnost ( <i>angl. complement dependent cytotoxicity</i> )
<b>cAMP</b>	ciklični adenozin monofosfat ( <i>angl. cyclic adenosine monophosphate</i> )
<b>COX</b>	ciklooksigenaza
<b>DMSO</b>	dimetilsulfoksid
<b>EP4</b>	prostaglandinski receptor EP4 ( <i>angl. prostaglandin E2 receptor, type 4</i> )
<b>FBS</b>	fetalni goveji serum ( <i>angl. fetal bovine serum</i> )
<b>FISH</b>	fluorescenčna in situ hibridizacija ( <i>angl. fluorescence in situ hybridisation</i> )
<b>FITC</b>	fluorescein izotiocianat
<b>FADD</b>	s Fas povezana domena smrti ( <i>angl. Fas associated death domain</i> )

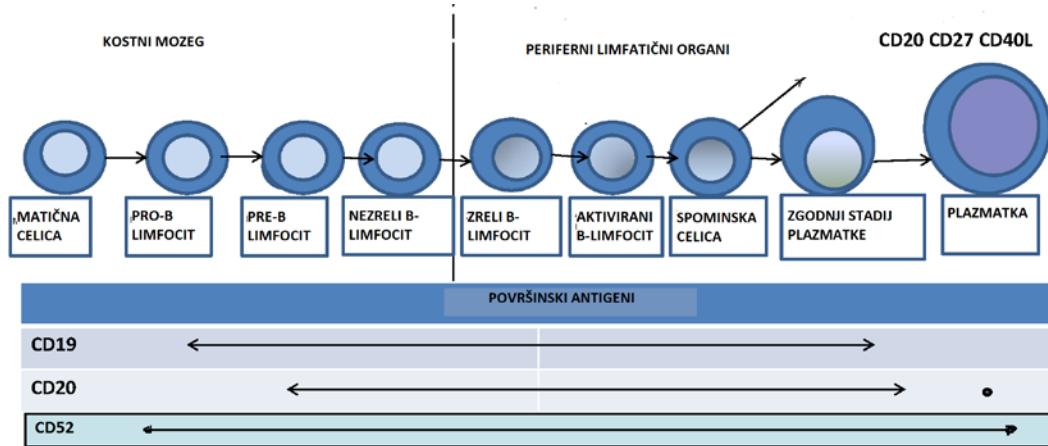
<b>KLL</b>	kronična limfocitna levkemija ( <i>angl.chronic lymphocytic leukemia</i> )
<b>LCL</b>	limfoblastoidne celične linije ( <i>angl. lymphoblastoid cell lines</i> )
<b>MFI</b>	povprečna intenziteta flurescence ( <i>angl. median fluorescence intensity</i> )
<b>NF-κB</b>	jedrni dejavnik kappa B ( <i>angl. nuclear factor kappa B</i> )
<b>NHL</b>	ne-Hodgkinov limfom
<b>NK celice</b>	naravne celice ubijalke
<b>mCRP</b>	membranski komplement regulatorni proteini ( <i>angl.membrane complement regulatory proteins</i> )
<b>MTS</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol)
<b>PBS</b>	fosfatni pufer ( <i>angl. phosphate buffer solution</i> )
<b>PgE1-OH</b>	prostaglandin E1 alkohol
<b>PGE2</b>	prostaglandin E2
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>TRAF-2</b>	z receptorjem za dejavnik tumorske nekroze povezan faktor ( <i>angl. TNFR associated factor</i> )
<b>TNF</b>	dejavnik tumorske nekroze ( <i>angl. tumor necrosis factor</i> )
<b>TNFR</b>	receptor dejavnika tumorske nekroze ( <i>angl. tumor necrosis factor receptor</i> )

# 1. UVOD

## 1.1. Limfociti B

Limfociti B so krvne celice, ki so glavni akterji pri humornem ali pridobljenem imunskega odziva. Njihova ključna naloga je sinteza protiteles proti različnim antigenom in so glavni mediator sekundarnega imunskega odziva. Limfociti se razvijejo iz multipotentne celice v kostnem mozgu, nato pa potujejo v priželjc, kjer dozorijo v limfocite T, ali pa ostanejo v kostnem mozgu, kjer dozorijo v limfocite B (1). Naivni limfociti B se soočijo z antigenom v sekundarnih limfatičnih organih, kjer pride do negativne klonske selekcije, pri čemer se odstranijo avtoreaktivni limfociti B, ki z B celičnim receptorjem (BCR receptorjem) reagirajo s telesu lastnimi antigeni (2). Ne-avtoreaktivni limfociti B se ob prisotnosti antiga v sekundarnih limfatičnih organih aktivirajo in se preobrazijo v plazmatke ali spominske celice (3), te pa ob ponovnem stiku z istim antigenom hitro sintetizirajo protitelesa in omogočajo takojšen imunski odziv.

Za zrele limfocite B so značilni celični označevalci HLA-DR, CD19, CD20, CD21, CD24, CD52 in mIg (4).



Slika 1: Razvojne stopnje limfocitov B ter izražanje površinskih označevalcev, ki delujejo kot tarče za biološka zdravila

Iz matične celice se razvijejo progenični limfociti, ki že izražajo celične označevalce CD19 in CD52. Na razvojni stopnji pre-B limfocit se oblikuje celični označevalci CD20. Nezreli limfociti že sintetizirajo κ ali λ lahke verige in izražajo obliko BCR receptorja. Nezreli limfociti se izplavijo v krvni obtok, kjer dozorijo in se srečajo v perifernem limfatičnem tkivu z antigeni. Povzeto po (5) (6).

### **1.1.1. Aktivacija limfocitov B ter klonska selekcija**

B celični receptor (BCR) je transmembranski receptor na limfocitih B, na katerega se lahko vežejo različni antigeni. Stimulacija B-celičnega (BCR) receptorja vodi v fosforilacijo tirozina na številnih proteinih med temi CD19, CD22, CD79a in CD79b, kot tudi fosforilacijo kinaz in fosfolipaz (7). Vezava antigena na BCR receptor na zrelih limfocitih B sproži kaskado reakcij, ki aktivirajo imunski odgovor organizma, medtem ko vezava antigena na BCR receptor nezrelih limfocitov sproži apoptozo. Poleg tega, da vezava telesu lastnega antigena na BCR receptor nezrelih limfocitov B aktivira apoptozo, zviša ekspresijo gena *Ptger4*, ki kodira prostaglandinski receptor EP4. Prostaglandinski receptor EP4 je tako eden izmed mediatorjev apoptoze in nova obetavna tarča za modulacijo apoptoze limfocitov B (8).

## **1.2. Maligne bolezni limfocitov B**

Levkemije so maligne bolezni krvotvornih organov, za katere je značilna proliferacija enega dominantnega klena nenormalnih nefunkcionalnih krvnih celic, ki se kopijo v kostnem mozgu, sekundarnih krvotvornih organih ali v krvi. Glede na vrsto celic jih delimo na mieloične in limfocitne levkemije, glede na hitrost in invazivnost pa na akutne in kronične levkemije (9,10). Akutne levkemije so heterogena skupina klonskih bolezni, za katere je značilna pridobljena somatska mutacija in nadzorovanost rasti multipotentne matične celice. Značilne so recipročne kromosomske translokacije, ki zajamejo gene, ki nadzorujejo delitev in dozorevanje hematopoetičnih matičnih celic (npr. C-myc in Bcl). Kronične levkemije so skupina kronično potekajočih bolezni, za katere je značilno zvečano nastajanje krvnih celic zaradi motnje na ravni matične krvne celice, potek bolezni je dolgotrajen (11).

### **1.2.1. Kronična limfocitna levkemija**

Kronična limfocitna levkemija je najpogostejsa oblika levkemije v Zahodnem svetu. Prizadene dvakrat več moških kot žensk, incidenca pojavljanja je najvišja v Severni Ameriki in v Evropi (12). Kronično limfocitno levkemijo ločimo od ostalih levkemij predvsem na podlagi celičnih označevalcev, citogenetskih, histoloških, molekularnogenetskih preiskav kostnega mozga, bezgavk ali drugega prizadetega tkiva (11).

Najpogostejše kromosomske nepravilnosti so trisomija 12, delecija 13q14, delecija 11q22-23, delecija 6q21 in delecija 17p13 (p53 lokus) (13). Pri okoli 80% bolnikov preiskava FISH pokaže spremenjen kariotip: 20 % bolnikov ima trisomijo 12, pri več kot 50% je značilna delecija 13q14 (11). Delecija 17p13 je povezana z delecijo p53, delecija 11q22-23 pa z izgubo gena za ATM. Oba gena (ATM in p53) regulirata apoptozo in v primeru odsotnosti prispevata k rezistenci na kemoterapijo (14).

### **1.2.2. Limfomi**

Limfomi so skupina malignih tumorjev limfatičnega sistema, za katere je značilna nekontrolirana klonska ekspanzija v perifernih limfatičnih organih (15). Praviloma so monoklonske limfoidne lezije, kar pomeni, da imajo po delitvi ene same neoplastične celice njeni hčerinski celici in po delitvah, ki sledijo, vse celice potomke enake funkcionalne in morfološke lastnosti. Nastanejo z maligno preobrazbo ene celice limfatične vrste T, B ali naravnih celic ubijalk (NK). Glede na izvor maligne celice, histologijo, klinično sliko, potek in prognozo se maligni limfomi delijo na Hodgkinove in Ne-Hodgkinove limfome (NHL); glavna razlika med Hodgkinovimi in Ne-Hodgkinovimi limfomi pa je prisotnost Reed – Steinbergovih celic. Prevladujejo Ne-Hodgkinovi limfomi in sicer tisti, ki izvirajo iz B-limfocitov.

Ne-Hodgkinovi limfomi so heterogena skupina tumorjev krvnih celic. Najbolj pogosti histološki oblici NHL sta difuzni B velikocelični limfom in folikularni limfom (10). Za večino B limfomov z zrelim fenotipom so značilne translokacije, ki vključujejo genski segment za imunoglobulinsko verigo in protoonkogenski segment (npr. c-Myc). Za folikularni B celični Ne-Hodgkinov limfom je značilna translokacija dela gena, ki kodira Bcl2 gen na promotor IGHJ gena, kar vodi v konstitutivno izražanje proteina BCL-2 in preprečuje apoptozo celic (16). Translocirajo se lahko tudi geni, ki kontrolirajo celični cikel (npr. p53, ciklin D1), aktivacijo NF-κB, in signalno transdukcijo BCR receptorja. Za Burkittov limfom je značilno prekomerno izražanje Bcl-2, ki blokira apoptozo celice ali C-Myc, pogoste pa so tudi točkovne mutacije v C-Myc genu (17).

### **1.2.3. Zdravljenje kronične limfocitne levkemije in Burkittovega limfoma**

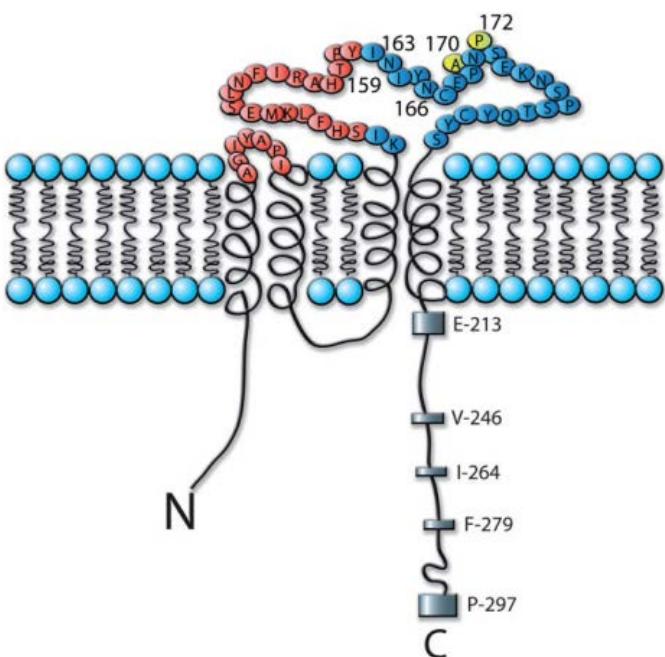
Zdravljenje levkemij ali limfomov je odvisno od agresivnosti tumorja, stadija v času diagnoze in starosti pacienta (18). Terapija obsega kemoterapijo in/ali imunoterapijo. Kemoterapija vključuje kombinacijo različnih citostatikov, medtem ko imunoterapija vključuje monoklonska protitelesa. Zdravljenje poteka v ciklih, opredeli se, kolikokrat na mesec in glede na rezultate, koliko časa bo bolnik prejemal terapijo. Kronično limfocitno levkemijo in Burkittov limfom zdravimo s kombinacijo zdravil kot so na primer fludarabin, ciklofosfamid in rituksimab (FCR) (18). Ta pristop se uporabi najprej in ima v 95% primerov takojšen učinek. Pri bolnikih pri katerih ima terapija FCR takojšnji učinek, jih 70% popolnoma ozdravi. Druga linija terapije vključuje vinkristin, mitoksantron, doksorubicin, prednizolon in rituksimab, ki je nepogrešljiv člen terapije. Iščejo se nove možnosti terapije, ki bi preprečile rezistenco oziroma ugotovile vzroke rezistence že takoj, da se lahko izognemo nepotrebnu izpostavljanju imunoterapevtikom in ubremo drugačno terapijo pri pacientih, ki so zaradi različnih mutacij neodzivni na rituksimab (19). Poleg rituksimaba se za zdravljenje NHL uporabljajo še druga monoklonska protitelesa, med drugimi tudi ofatumumab in alemtuzumab (20).

Rituksimab je himerno monoklonsko protitelo, ki se uporablja za zdravljenje Ne-Hodgkinovih limfomov, ki so CD20 pozitivni (21). Ima humano  $\gamma$ -1 in κ konstantno regijo ter mišje variabilne regije. Veže se na celični označevalce CD20 ter preko različnih mehanizmov sproži signalno transdukcijo za apoptozo. Zraven indukcije apoptoze pa so mehanizmi delovanja rituksimaba s komplementom posredovana citotoksičnost in s protitelesi posredovana citotoksičnost. Pri samostojni rabi rituksimaba se je pokazala učinkovitost pri 50% pacientov, ki se niso odzivali na prejšnjo (FCR) terapijo. Kljub temu je pri 60% pacientov, ki so se odzvali pozitivno na prvo terapijo, prišlo do rezistence na rituksimab (22, 23). Evropska agencija za zdravila (EMA) ga je odobrila leta 1998, FDA pa leta 1997 (21).

Ofatumumab je popolnoma humano anti-CD20 monoklonsko protitelo druge generacije, ki se veže na majhno in veliko ekstracelularno zanko celičnega označevalca CD20. Mehanizmi delovanja so s komplementom posredovana citotoksičnost in s protitelesi posredovana citotoksičnost.

Ofatumumab se predpisuje za zdravljenje kronične limfocitne levkemije v kolikor je pacient rezistenten na fludarabin in alemtuzumab. Evropska agencija za zdravila (EMA) ga je odobrila leta 2008, FDA pa leta 2009 (21).

Znano je, da je uspešnost zdravljenja s protitelesi proti antigenu CD20 odvisna od količine celičnega antiga CD20 na limfocitih B, ta pa se razlikuje med posameznimi pacienti (24). Če primerjamo ofatumumab in rituksimab se oba vežeta na CD20 receptor (Slika 2). Ker je vezavno mesto ofatumumaba bližje celični membrani, naj bi se komponente komplementa hitreje in močneje vezale na protitelo zaradi česar ofatumumab sproži močnejšo od komplementa posredovano citotoksičnost kot rituksimab (25, 26).



Slika 2: Peptidna sestava celičnega označevalca CD20

Z rdečo barvo so označene aminokisline ki prispevajo k vezavi ofatumumaba, z rumeno pa aminokisline ki prispevajo k vezavi rituksimaba, ne pa ofatumumaba. Povzeto po (27).

Alemtuzumab je humanizirano anti-CD52 monoklonsko protitelo, ki ga je FDA odobrila leta 2001 za zdravljenje kronične limfocitne levkemije odporne na fludarabin. CD52 je površinski antigen izražen na T in B limfocitih. Čeprav so funkcija receptorja CD52 in signalne poti delovanja alemtuzumaba še dokaj neraziskane so Nuckel in sodelavci dokazali, da inkubacija limfocitov B pacientov z B-KLL z alemtuzumabom in sekundarnim protitelesom sproži

apoptozo preko povečane ekspresije kaspaz 3 in 9. Alemtuzumab ni imel vpliva na izražanje anti-apoptotičnega proteina Bcl-2 in pro-apoptotičnega proteina Bax, medtem ko sta protitelesi proti CD20 rituksimab in ofatumumab njuno izražanje znižali (17, 28, 29). Mehanizem citotoksičnosti *in vivo* je tudi s protitelesi posredovana citotoksičnost (17).

### 1.3. Apoptoza

Apoptoza je intrinzično programirana celična smrt in ima pomembno vlogo pri uravnavanju tkivne homeostaze, še posebno v tkivih, kjer se celice hitro delijo. Apoptoza sproži aktivacija celičnih proteaz – kaspaz. Apoptotične celice za razliko od zdravih celic izražajo na svoji površini fosfatidilserin, katerega prepozna fagociti, ti se vežejo nanj ter izvršijo fagocitozo tako »označene« celice (30). Dve izmed najbolj preučevanih in poznanih poti apoptoze sta intrinzična ter ekstrinzična pot.

Intrinzično pot apoptoze sprožijo notranje poškodbe celice kot so poškodbe DNK, pomanjkanje hranilnih snovi, hipoksija, virusna okužba, rakasta transformacija, porast  $\text{Ca}^{2+}$  ionov ipd. Ti dejavniki aktivirajo proteine na membrani mitohondrija (proteini družine Bax), ti pa sprožijo luknjanje membrane in izhajanje citokroma C in drugih apoptogenih proteinov v citosol. Vezava citokroma C na kaspaze aktivirajoči dejavnik (Apaf1) v citosolu sproži oligomerizacijo v heptamerni kompleks, ki veže prokaspazo-9 in tvori proteinsko strukturo apoptosom (31, 32). Proteini družine Bcl-2 so eni izmed efektorjev intrinzične smrti celice. Pri Burkittovem limfomu, kronični limfocitni levkemiji in ostalih hematoloških obolenjih je najpogostejša povečana ekspresija anti-apoptotičnih proteinov družine Bcl-2: Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1 (9).

Ravno zaradi te signifikantne vpletjenosti potekajo na področju zdravljenja hematoloških obolenj klinične študije novih potencialnih učinkovin, ki bi blokirale Bcl-2 protein (9). Druga pot apoptoze je ekstrinzična pot, pri kateri zunanjji faktorji, kot sta dejavnik tumorske nekroze (TNF) ter ligand receptorja smrti Fas (Fas ligand), aktivirajo receptorje smrti na celici.

Vezava TNF na receptor sproži kaskado reakcij, ki vodi do aktivacije jedrnega transkripcijskega faktorja NF-κB in c-Jun, slednja pa dalje sprožita prepisovanje genov, ki regulirajo celični cikel, onkogezo ipd (33).

### **1.3.1. NF-κB v apoptozi**

Jedrni transkripcijski dejavnik NF-κB je proteinski kompleks, ki se odziva na različne celične dražljaje (stres, UV sevanje, citokini, bakterijski antigeni), in z izražanjem različnih pro- in anti-apoptotičnih proteinov modulira odziv celice. Rel/NF-κB je družina transkripcijskih dejavnikov, ki so vpleteni v izražanje celičnih in virusnih genov, med temi genov, ki regulirajo imunski odziv (*TRAF1/2, TNFR1*), celični cikel (ciklin D1, MYC, p53, Rb), reakcije akutne faze in virusno replikacijo.

V normalnih telesnih celicah inhibitor κB (IκB) tesno regulira aktivnost NF-κB. NF-κB transkripcijski dejavniki se vežejo na kontrolne elemente κB, ki so prisotni v promotorskih regijah genov, ki regulirajo celično diferenciacijo, proliferacijo, preživetje in apoptozo (28). Komponente NF-κB signalne poti so tako dobra tarča za kemoterapevtike, ki senzitizirajo celice.

Pod vplivom različnih dražljajev NF-κB domena disociira od inhibitorja IκB in se translocira iz citoplazme v jedro, kjer se veže na promotorske elemente genov za anti-apoptotična proteina Bcl-XL in Bcl-2 in regulira njuno izražanje. Konstitutivna aktivnost NF-κB je značilna za veliko malignih tumorjev, med njimi tudi za Hodgkinove in Ne Hodgkinove limfome (15). Medtem ko je signalna pot anti-CD52 protiteles še dokaj neraziskana, pa anti-CD20 monoklonska protitelesa blokirajo NF-κB pot in pripomorejo k apoptozi nezrelih in zrelih limfocitov B. NF-κB transkripcijsko signalno pot modulirajo tudi agonisti receptorja EP4 in kemosenzitizirajo maligne limfocite B, ter s tem odpirajo nove možnosti za zdravljenje levkemij in limfomov (34).

### **1.4. Mehanizmi celične smrti z anti-CD20 in anti-CD52 monoklonskimi protitelesi**

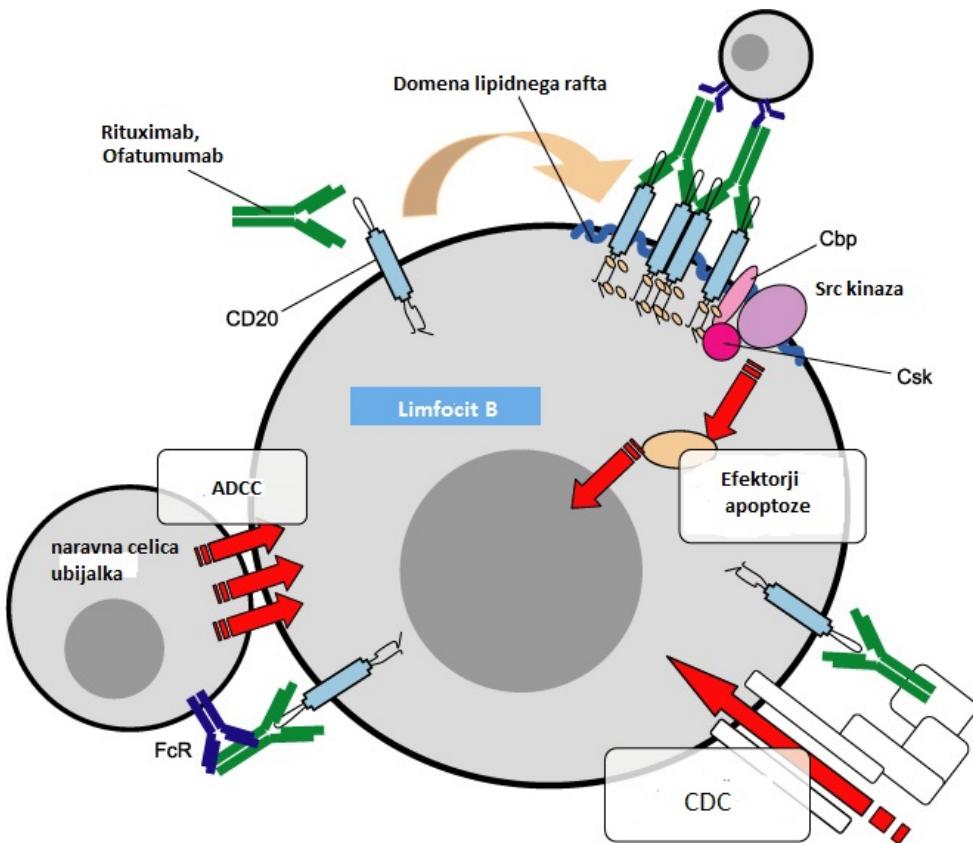
Anti-CD20 monoklonska protitelesa so izredno učinkovita zdravila v terapiji B-celičnih limfomov in levkemij zaradi dveh razlogov; prvi je ta, da je CD20 selektivni receptor na membrani limfocitov B in omogoča dobro prijemališče (35). Drugi razlog je, da se CD20

receptor po vezavi protitelesa internalizira razmeroma počasi in s tem omogoča daljši časovni razpon, ko je protitelo vezano na receptor in rekrutira sistem komplementa (36). Anti-CD52 monoklonsko protititelo alemtuzumab se uporablja pri zdravljenju kronične limfocitne levkemije, če bolnik razvije rezistenco na osnovno zdravljenje.

Mehanizmi posredovanja celične smrti monoklonskih protiteles so:

- S komplementom posredovana citotoksičnost (CDC)
- S protitelesi posredovana citotoksičnost (ADCC)
- Apoptoza

V *in vivo* je prevladujoči mehanizem s komplementom posredovana celična smrt in apoptoza, sicer pa je mehanizem citotoksičnosti različen med protitelesi (20, 37). S komplementom posredovano citotoksičnost aktivira vezava C1q plazemskih proteinov na Fc regijo monoklonskega protitelesa. Pri zdravljenju kronične limfocitne levkemije se ob infuziji rituksimaba drastično zmanjša število C1q serumskih proteinov, saj preživele celice izločajo komplement regulatorne proteine, ki inhibirajo delovanje komplementa. Slednje vodi v pojav rezistence, ki je vedno večji problem zdravljenja z rituksimabom (7, 38). Efektorji citotoksičnost anti-CD20 in anti-CD52 protiteles so lahko tudi granulociti, makrofagi in naravne celice ubijalke, ki prepoznajo z Fc $\gamma$  receptorjem vezana protitelesa na antigen in sprožijo lizo celice (38). Slika 3 prikazuje različne poti celične smrti po vezavi rituksimaba ali ofatumumabu na celični označevalec CD20 (Slika 3).



**Slika 3: Vezava anti CD20 monoklonskih protiteles in mehanizmi aktivacije celične smrti**

Monoklonska protitelesa lahko sprožijo celično smrt preko treh različnih mehanizmov: preko komplementa (CDC), s protitelesi posredovano celično smrt (ADCC) ali preko aktivacije apoptoze. Povzeto po: (39)

## 1.5. Izzivi pri zdravljenju B celičnih limfomov in B-celičnih levkemij

Rezistenza na rituksimab je aktualni problem zdravljenja Ne- Hodgkinovih limfomov, zato potekajo študije v smeri razvoja novih monoklonskih protiteles, ki bi se vezala na druge celične označevalce na površini celice namesto na CD20. Pri alemtuzumabu, ki ga uporabljamo za zdravljenje na rituksimab odporne B celične kronične limfocitne levkemije (40) je pomanjkljivost zdravljenja ta, da CD52 receptor ni selektiven za limfocite B. Tumorske celice razvijejo različne mehanizme rezistence na terapijo in se izognejo celični smrti. Prisotne pa so lahko še številne kromosomske nepravilnosti, ki omejujejo popolno remisijo pacientov. Najpogostejevi vzroki za pojav rezistence na terapijo so opisani v nadaljevanju.

### **- Pomanjkanje komponent sistema komplementa**

Eden izmed vzrokov rezistence na anti-CD20 protitelesa je inhibicija sistema komplementa. Zdrave in tumorske celice imajo na svoji membrani komplement regulatorne proteine (mCRP), ki preprečijo aktivacijo kaskade sistema komplementa. Tumorske celice izražajo več teh površinskih antigenov (CD46, CD55, CD59) in s tem onesposobijo s komplementom posredovano citotoksičnost (7, 41).

### **- Polimorfizmi Fc receptorja**

Rezvani in kolegi so z analizo gena FCG3RA, ki kodira Fc receptor na naravnih celicah ubijalkah ter na makrofagih pokazali, da je eden izmed vzrokov za neučinkovitost zdravljenja z anti CD20 protitelesi polimorfizem v Fc $\gamma$ RIIIA receptorju. Na mestu 158, kjer je valin, pride do substitucije s fenilalaninom; tako dobimo homozigote in heterozigote s to mutacijo (158V/V, 158F/V, 158 F/F). Polimorfizmi vodijo v slabšo odzivnost na terapijo, saj efektorske celice ne prepoznajo kompleksa protitelo-limfocit in ne sprožijo ADCC (7, 42).

### **- Mutacije antiga CD20 in znižanje ekspresije CD20**

Kronična izpostavljenost celic rituksimabu povzroči rezistenco. Pri eni izmed študij, so dokazali, da je prišlo do spremembe v fenotipu celic Burkittovega limfoma Raji, saj so povečale sintezo komplement inhibitornih proteinov CD55 in CD59 in znižale ekspresijo CD20 (43). Druga raziskovalna skupina Mishime in sodelavcev je ugotovila, da lahko pride do mutacij v receptorju CD20 in sicer v C-terminalnem delu proteina. (40, 22).

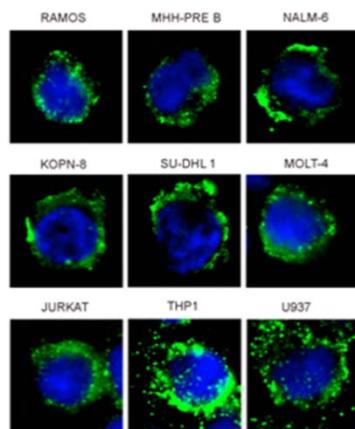
### **- Zmanjšanje ekspresije genov Bak in Bax**

Ena izmed možnosti neodzivnosti na terapijo in pojava rezistence po nekaj ciklih terapije je lahko tudi znižanje ekspresije pro-apoptotičnih genov Bak in Bax iz družine Bcl-2. Testiranje limfocitov B, ki se odzivajo na rituksimab (Raji, RL in SUDHL-4) ter hčerinskih rezistentnih celic je pokazalo, da je ekspresija transkriptov pro-apoptotičnih proteinov družine Bcl-2 nižja pri rezistentnih linijah v primerjavi z nerezistentnimi celičnimi linijami.

Študija dokazuje, da večkratna terapija z rituksimabom vodi v rezistenco (41), ker maligno transformirani limfociti B z znižanjem ekspresije pro-apoptotičnih genov iz družine Bcl-2 uidejo apoptozi (23).

## 1.6. Receptor EP4 in možnost novih terapevtskih pristopov pri zdravljenju limfomov in levkemij

Prostaglandini (eikozanoidi) so večkrat nenasičene maščobne kisline s petčlenskim obročem v njihovi zgradbi, ki se sintetizirajo iz arahidonske kisline in sodijo med tkivne hormone (slika 5). Prostaglandine (PG) sintetizirajo ciklooksiгенaze (COX) ter različne prostanoidne sintaze iz polinenasičene maščobne kisline–arahidonske kisline oziroma cis-5,8,11,14-eikozatetraenojske kisline (44, 45). Primarni metaboliti arahidonske kisline so: PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , PGD<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> in TXA<sub>2</sub>. Ekspresija genov za prostanoidne sintaze je v različnih tkivih različna, tako imamo za PGE<sub>2</sub> na primer visoko ekspresijo v fibroblastih, monocitih ter v epitelijskih in endotelijskih celicah (44, 46). PGE<sub>2</sub> ima različne biološke učinke posredovane preko štirih podtipov receptorjev (EP1, EP2, EP3 in EP4) na katere se veže kot endogeni ligand. Distribucija teh receptorjev je v telesnih tkivih zelo raznolika (47). Ekspresija *Ptger4*, ki kodira receptor EP4, je visoka v gastrointestinalnem traktu, maternici, koži in v krvotvornih organih.



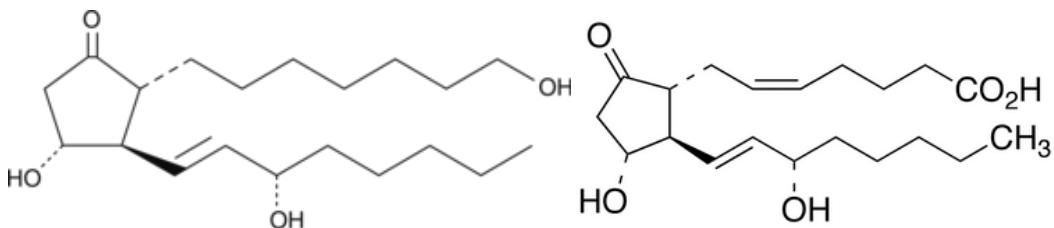
Slika 4: Ekspresija receptorja EP4 v različnih celičnih linijah

Receptor EP4 je obarvan zeleno, jedra pa modro. Receptor EP4 je prisoten na celicah Ramos, ki so maligno spremenjeni limfociti B Burkittovega limfoma. Povzeto po (48).

Receptorji za PGE<sub>2</sub> so sklopljeni z G- proteini. Receptor EP4 je z G<sub>αS</sub> sklopljeni receptor, ki stimulira adenilat ciklazo in s tem zviša intracelularni ciklični adenozin monofosfat (cAMP). (46, 49). Poleg klasične poti pa receptor EP4 aktivira tudi neklasične od cAMP neodvisne poti, ki vodijo v blokado jedrnega transkripcijskega dejavnika (NF-κB) v limfocitih B (50).

Mnoge študije so dokazale vpletenost receptorja EP4 v različnih tipih tumorjev, študije pa so bile podprte z uporabo selektivnih agonistov in antagonistov receptorja EP4 ter z mišmi, ki so jim utišali gen za receptor EP4 (44, 51). V limfocitih B ima receptor EP4 tumor supresorsko funkcijo (8). Analiza transkriptoma je pokazala, da je stimulacija BCR receptorja na nezrelih limfocitih B sprožila povečano ekspresijo *Ptger4* (52, 50).

Aktivacija receptorja EP4 tako inducira apoptozo malignih limfocitov B preko NF-κB in cAMP signalne poti ter zniža ekspresijo anti-apoptotičnega proteina BCL-XL in s tem odpira nove možnosti za zdravljenje levkemij in limfomov (34, 8).



**Slika 5:** Strukturna primerjava med endogenim ligandom PGE2 (desno) in sinteznim derivatom agonista receptorja EP4 (PgE1-OH) (levo). Povzeto po (8).

## **2. NAMEN DELA**

Namen magistrske naloge bo ovrednotiti potencialno sinergistično delovanje med agonistom receptorja EP4 ter terapevtsko relevantnimi monoklonskimi protitelesi. Najprej bomo preučevali vpliv anti-CD20 monoklonskih protiteles rituksimaba in ofatumumaba ter anti-CD52 protitelesa alemtuzumab *in vitro*. V ta namen bomo uporabili celično linijo (B-celičnega) Burkittovega limfoma Ramos, ki ji bomo dodali humani serum kot vir komplementa. Ovrednotili bomo vpliv PgE1-OH in izbranih monoklonskih protiteles na živost celic in skušali ugotoviti, ali imajo sinergistični učinek. Živost celic bomo preverjali s testom metabolne aktivnosti MTS. Uporabili bomo različne koncentracije PgE1-OH in terapevtskih monoklonskih protiteles ter seruma. Sinergistični učinek bomo ovrednotili tudi s pomočjo programa CompuSyn.

V nadaljevanju bomo uporabili deset limfoblastoidnih celičnih linij (LCL) z namenom vrednotenja selektivnega delovanja agonista receptorja EP4 in inter-individualne variabilnosti v odzivu na PgE1-OH. Limfoblastoidne celične linije so pridobljene iz krvi zdravih darovalcev, so fenotipsko limfociti B in hkrati predstavljajo dober *in vitro* model za študijo inter-individualne variabilnosti v odzivu na zdravila. Najprej bomo preverili, ali celice LCL izražajo receptor EP4 s pomočjo pretočne citometrije in fluorescenčne mikroskopije. S pomočjo testa MTS bomo vrednotili vpliv agonista receptorja EP4 na živost celic. Dočili bomo vrednosti EC<sub>50</sub> ter jih primerjali z EC<sub>50</sub> vrednostmi pridobljenimi na celicah Burkittovega limfoma Ramos. Preverili bomo tudi, ali ekspresija receptorja EP4 korelira z vplivom agonista EP4 na živost celic.

### **3. MATERIALI IN METODE**

#### **3.1. Materiali**

##### **3.1.1. Kemikalije**

Preglednica 1: Kemikalije

<i>Kemikalija</i>	<i>Proizvajalec</i>
DMSO	Merck chemicals, Darmstadt, Nemčija
Etilni alkohol 96%	KEFO, Ljubljana, Slovenija
Goveji serumski albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, MO, ZDA
PgE <sub>1</sub> -OH	Cayman Chemical, MI, ZDA
Raztopina tripanskega modrila	Sigma-Aldrich, MO, ZDA
ProLong® Gold reagent	Invitrogen
Triton-X 100	Sigma-Aldrich, MO, ZDA

##### **3.1.2. Kompleti za analize**

Preglednica 2: Kompleti za analize

<i>Komplet</i>	<i>Proizvajalec</i>
Cell titer 96® AQueous One Solution cell Proliferation assay (MTS Reagent)	Promega, Madison, WI, ZDA

##### **3.1.3. Pufri in raztopine**

###### **10 X PBS s pH 7.4:**

- 80 g NaCl
- 2 g KCl
- 36,3 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*12H<sub>2</sub>O
- 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

- ultračista  $H_2O$ , dopolnimo do 1,0 L

*Natehtali smo sestavine in jih raztopili v vodi, uravnali pH in avtoklavirali.*

#### **1 X PBS :**

- 10 X PBS redčimo 1:10 z ultračisto vodo in avtoklaviramo

#### **4% raztopina formaldehida:**

- 240 ml PBS
- 10 ml 100% formaldehida

#### **3% raztopina BSA v PBS**

- 100 ml PBS
- 3 gr BSA

#### **0,2% raztopina Tritona:**

- 100  $\mu l$  Tritona X-100
- 50 ml PBS

### **3.1.4. Protitelesa in fluorescenčna barvila**

**Preglednica 3: Protitelesa in fluorescenčna barvila**

Barvilo Hoechts 33342, $c = 100 \mu M$ (za obarvanje celičnih jeder)	Molecular probes™, Invitrogen
Poliklonsko kunčje primarno protitelo proti C-terminalnemu delu humanega receptorja EP4; 1mg/ml	Cayman chemical, MI, ZDA
Poliklonsko kunčje primarno protitelo proti N-terminalnemu delu humanega	Imgenex

receptorja EP4; 1mg/ml	
Monoklonsko sekundarno kozje protitelo proti Fc regiji kunčjega IgG konjugirano z barvilmom Alexa Fluor®488; 2 mg/ml	Imgenex
Monoklonsko mišje protitelo proti CD19 Receptorju konjugirano z barvilmom PE 555413	BD Pharmingen™
Monoklonsko mišje protitelo proti CD20 receptorju, konjugirano z barvilmom PE:555413	BD Pharmingen™

### 3.1.5. Gojišča in sestava

**RPMI medij (RAMOS, RAJI):**

- 500 ml RPMI -1640
- 50 ml toplotno deaktiviranega fetalnega govejega seruma (FBS)
- 5,5 ml antibiotika in antimikotika
- 5,5 ml L-glutamina
- 500 µl 50 µM merkaptoetanola

**RPMI medij (LCL):**

- 500 ml RPMI -1640
- 50 ml FBS
- 5,5 ml antibiotika in antimikotika
- 11 ml L-glutamina

### 3.1.6. Laboratorijska in programska oprema

Preglednica 4: Laboratorijska oprema

<i>Aparatura/Material</i>	<i>Proizvajalec</i>
Avtoklav A-21	Kambič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija
Cell-Quest®software za obdelavo podatkov na FACS	Becton Dickinson
Centrifuge (Eppendorf centrifuge 5415 R)	Hamburg, Nemčija
Centrifugirke (15 in 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija
Centrifuga Cytofuge	Statspin
Epruvete	Invitrogen
Fluorescenčni mikroskop	Olympus optical Co. GmbH, Hamburg, Nemčija
Hemocitometer	Brand Neubauer
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 komora)	Siemens
Krioviale	TPP, Trasadingen, Švica
Krovna stekla	Assistent, Sondheim, Nemčija
Mikrocentrifugirke (0,5 ml; 1,5 ml in 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija
Plastične sterilne mikrotitrskie ploščice za gojenje celičnih kultur (s 6, 12, 24 ali 96 vdolbinami)	TPP, Trasadingen, Švica
Mikrotitrski čitalec (Safire <sup>2TM</sup> Genios)	Tecan, Genios, Zürich, Švica
Multikanalne pipete (100, 300 µl)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija

Nastavki za pipete (do 10, 200 in 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)
Pretočni citometer FACS Calibur	Becton Dickinson
Programska oprema za Tecan	Magellan V3.X IVD
Računalniška programska oprema: Cell®	Olympus
Serološke pipete za enkratno uporabo (volumni: 5, 10, 25, 50 ml)	TPP, Trasadingen, Švica
Vodna kopel	Mikro+polo, Maribor, Slovenija
Vortex (Vortex GENIE 2)	Scientific industries, Orlando, Florida, ZDA
Zamrzovalnik - 80°C	Forma scientific, Midland, ON, Kanada

### 3.2. Metode dela s celicami

#### 3.2.1. Delo v celičnem laboratoriju

Za delo s celičnimi linijami potrebujemo aseptično okolje, ki ga zagotavljamo s posebnimi temu namenjenimi prostori. Pred vstopom v celični laboratorij si oblečemo haljo, ki je namenjena samo uporabi v celičnem laboratoriju, prav tako imamo obutev namenjeno nošenju le v celičnem laboratoriju, alternativa so tudi copati za enkratno uporabo. Vedno si razkužujemo zaščitne rokavice, pred in po rokovjanju z materiali iz celičnega laboratorija. S celičnimi kulturami rokujemo v komori z laminarnim pretokom zraka s HEPA filtrom (LAF komora), ki zagotavlja konstanten tok filtriranega zraka v smeri, ki preprečuje dostop kontaminantom iz okolja. Pred uporabo delovno površino komore razkužimo z 70% etanolom, ravno tako razkužimo ves material, ki ga bomo rabili ob delu in ga položimo v LAF.

Nato vklopimo UV svetilko za 15 minut. Po tem lahko prenesemo celično kulturo v LAF in pričnemo z delom (53).

### **3.2.2. Humane celične linije**

Humane celične linije so pridobljene iz maligno preobraženih ali zdravih človeških tkiv in so ustaljene oz. nesmrtnе. Normalne celice imajo omejeno količino delitev preden izgubijo sposobnost proliferacije, ta je določena s krajšanjem telomer. Ko govorimo o nesmrtnih celičnih linijah, je ta mehanizem dereguliran, ker je prišlo ali do mutacije v genih, ki nadzirajo celični cikel (npr. *TP53*, *Cdkn2a*, ki kodira P16, *pRb*), do povečane aktivnosti encima telomeraze, ali pa do deregulacije protoonkogenov. Da je celična linija nesmrtna mora zadostovati enemu izmed teh pogojev (54).

### **3.2.3. Odmrzovanje celičnih kultur**

Celične kulture LCL (limfoblastoidne celične linije), shranjene v kriovialah s 5% DMSO (dimetilsulfoksid) in celične kulture Ramos, shranjene v kriovialah z 10% DMSO v zamrzovalniku pri -80°C smo hitro odmrznili (ker je DMSO toksičen) in počasi z 1 ml pipeto prenesli v 13 ml medija. Tako preneseno kulturo smo centrifugirali za 5 minut pri 1200 rpm in peleto resuspendirali v 4 ml svežega medija.

### **3.2.4. Kultivirane celične linije**

Celice LCL so bile pridobljene iz krvi zdravih prostovoljcev v laboratoriju prof. Gurwitza na Univerzi v Tel Avivu. Celice so z Eppstein-Barrom virusom transformirani limfoblasti, ki so nesmrtni. Za raziskave smo uporabili celice desetih zdravih prostovoljcev.

Celični označevalci: CD3 -, CD10 -, CD13 -, CD19 +, CD20 +, CD34 -, CD37 +, CD38 +, cyCD79a +, CD80 +, HLA-DR +, cyIgG +, cy IgM -, cykappa -, cylambda + (55, 56).

## **RAMOS (RA 1) (ATCC CRL-1596)**

Ramos je celična linija Burkittovega limfoma, pridobljena iz peritonealne tekočine 3 letnega dečka iz leta 1972, celice so EBV negativne in izražajo zreli tip limfocitov B. Rastejo v suspenziji, podvojevalni čas je 48h (57, 56).

Celični označevalci: CD3 -, CD10 +, CD13 -, CD19 +, CD20 +, CD34 -, CD37 +, CD38 +, CD52, cyCD79a +, CD80 +, CD138 -, HLA-DR +, sm/cyIgG -, sm/cyIgM +, sm/cykappa -, sm/cylambda + (4, 58, 59).

### **3.2.5. Subkultiviranje celičnih linij**

Celične linije gojimo v inkubatorju s konstantno temperaturo, vlago in količino CO<sub>2</sub> (5% CO<sub>2</sub>, 100% vlaga, 37°C). Celice rastejo optimalno le v določenem koncentracijskem razponu, zato moramo skrbeti za subkultiviranje in vzdrževanje optimalne koncentracije. Celice Ramos smo vzdrževali pri koncentraciji  $2 \times 10^5$ - $2 \times 10^6$  celic/ml, celice LCL pa pri koncentracijah  $1 \times 10^6$ - $2 \times 10^6$  celic/ml (60). Ko so celice presegle mejo optimalne koncentracije, smo jih redčili in dodali sveži RPMI medij obogaten s hranili.

### **3.2.6. Štetje celic**

Zaoptimalno določitev redčenja, smo celice pred redčenjem prešteli. Iz plostenke smo vzeli 10 µl celične suspenzije in ji dodali enako količino tripan modrega. Nekajkrat smo premešali s pipetiranjem in kanili suspenzijo celic na hemocitometer. Tripan barva mrtve in poškodovane celice modro, žive celice pa svetijo belo. Celice smo prešteli s pomočjo invertnegra mikroskopa. Žive in mrtve celice prestejemo v štirih vidnih poljih in nato po formuli izračunamo število živih celic (Enačba 1). Pri zdravi populaciji celic, odstotek mrtvih celic ne presega 10%.

$$\check{S}t.celic / ml = \frac{A + B + C + D}{4} \times DF \times 10^4$$

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

DF.....faktor redčenja

**Enačba I: Enačba za računanje koncentracije celic s hemocitometrom**

### 3.3. Limfoblastoidne celične linije

Limfoblastoidne celične linije (LCL) predstavljajo novo *in vitro* orodje za študije inter-individualne variabilnosti v odzivu na zdravila in za identifikacijo bioloških označevalcev odziva na zdravila, vključno z biološkimi označevalci neželenih učinkov (61). Relativno lahko jih je pridobiti, poleg tega pa imortalizacija perifernih limfocitov B in s tem transformacija z EBV virusom povzroči minimalno ali nič genetskih in fenotipskih aberacij, celice pa obdržijo večino fenotipskih lastnosti limfocitov B, vključno s sposobnostjo tvorbe protiteles (54). Po imortalizaciji se DNA ne poškoduje, tako da so celice LCL tudi primarna izbira za shranjevanje posameznikovega genetskega materiala v biobankah (61). Imortalizacija celic nam tako omogoča neomejen vir celic istega donorja. Na LCL celicah bomo vrednotili vpliv PgE1-OH na živost celic in določili EC50 vrednosti. Živost celic bomo preverili s MTS testom.

## **TEST ZA DOLOČANJE METABOLNE AKTIVNOSTI CELIC**

MTS test je kolorimetrična metoda, ki vrednoti metabolno aktivnost živih celic. Spremljanje živosti celic lahko temelji tudi na preverjanju membranske integritete s privzemom specifičnega barvila, ki prehaja celično membrano, če je le ta poškodovana (npr. tripan modro, eritrozin, naftalen črno) ali na privzemu in sprostivti barvila, ki se obdrži običajno znotraj celice (neutralno rdeče, diacetil fluorescein) (63).

MTS je tetrazolijeva sol 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol), ki se v prisotnosti mitohondrijske reduktaze (NADPH, NADH) reducira v formazan, ta pa absorbira svetlobo pri 492 nm. Absorbanco nastalega formazana merimo kolorimetrično, mi smo uporabili spektrofotometer Safire TECAN genios. Količina nastalega formazana je sorazmerna količini metabolno aktivnih celic (64, 63).

### **3.3.1. Postopek inkubacije celic Ramos z monoklonskimi protitelesi in PGE1-OH ter MTS test viabilnosti**

Pripravili smo presežek celic Ramos s koncentracijo  $2,0 \times 10^5$  celic/ml. Dodali smo 1% humanega seruma glede na količino celic, ki jo rabimo in z večkratnim pipetiranjem premešali suspenzijo. Na mikrotitrsko ploščico smo napipetirali tako pripravljene celične suspenzije. Celice smo nato tretirali z različnimi koncentracijami monoklonskih protiteles (0, 1, 10 ter 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in različnimi koncentracijami PgE1-OH (0, 1 in 10  $\mu\text{M}$ ). V eni vdolbinici smo imeli samo netretirano celično suspenzijo (kontrolo). Vsako vdolbinico posebej smo premešali z 1ml pipeto in z multikanalno pipeto prenesli po 100  $\mu\text{l}$  alikvota na mikrotitrsko ploščico z 96 vdolbinicami. Za vsak alikvot smo naredili trojno tehnično ponovitev. V prvi stolpec smo napipetirali netretirane celice (kontrola), v drugi stolpec netretirane celice z 0,5% DMSO (da ovrednotimo vpliv samega DMSO-ja, ki je topilo za PgE1-OH), v ostale stolpce pa tretirane celice z monoklonskimi protitelesi in PgE1-OH v različnih koncentracijah. V zadnjem stolpcu smo dali še sam RPMI medij kot slepo kontrolo. Tako pripravljene ploščice smo inkubirali v inkubatorju ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) in po 21h in 45h dodali 10  $\mu\text{l}$  MTS reagenta v vsako vdolbinico. Po 3 urah inkubacije smo pomerili absorbanco nastalega formazana pri 492 nm. Eksperiment smo izvedli še dvakrat, da smo dobili skupaj tri biološke ponovitve.

### **3.3.2. Postopek inkubacije celic LCL s PgE1-OH in MTS test viabilnosti**

Pripravili smo presežek suspenzije limfoblastoidnih celičnih linij s koncentracijo  $3,0 \times 10^5$  celic/ml, dobro premešali in napipetirali na mikrotitrsko ploščico z 12 vdolbinicami. Celice smo nato tretirali z različnimi koncentracijami PgE1-OH (0, 1, 5, 10, 25 ter 50  $\mu\text{M}$ ). V dveh vdolbinicah smo imeli samo netretirano celično suspenzijo (kontrolo in kontrola topila), v ostalih pa smo imeli različne koncentracije PgE1-OH. PgE1-OH smo dodali v vsako vdolbinico posebej in premešali z 1ml pipeto ter z multikanalno pipeto prenesli po 100  $\mu\text{l}$  alikvota na mikrotitrsko ploščico z 96 vdolbinicami. Za vsak alikvot smo naredili trojno tehnično ponovitev. V prvi stolpec smo napipetirali netretirane celice (kontrola), v drugi stolpec netretirane celice s 0,5% DMSO, v ostale stolpce pa celice tretirane s PgE1-OH v različnih koncentracijah. V zadnjem stolpcu smo dali še sam RPMI medij kot slepo kontrola. Tako pripravljeni ploščice smo inkubirali v inkubatorju ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) in po 21h in 45h dodali 10  $\mu\text{l}$  MTS reagenta v vsako vdolbinico. Po 3 urah inkubacije pomerili absorbance nastalega formazana pri 492 nm.

## **3.4. Fluorescenčna mikroskopija**

### **3.4.1. Fluorescencija**

Pojav, ko molekula absorbira svetlobo določene valovne dolžine in preide v ekscitirano stanje, ob prehodu iz ekscitiranega v osnovno stanje pa emitira svetlobo daljše valovne dolžine, imenujemo fotoluminescenco (65), le to pa delimo na fosforescenco in fluorescenco. Del molekule, ki absorbira svetlobo in je odgovoren za fluorescenco se imenuje fluorofor. Pri preiskovanju živih celic fluorofor ne sme vplivati na fizikalno in fiziološko integriteto celice. Fluorofori so običajno aromatske spojine, ki se specifično vežejo na strukture v celici kot so Golgijev aparat, mitohondriji, jedro, citoskelet ali na endopazmatski retikulum na podlagi hidrofobnih, kovalentnih ali elektrostatskih interakcij.

Poznamo tudi fluorofore za sledenje dinamičnim procesom v celici, tako lahko s fluorofori v fluorescenčni mikroskopiji spremljamo proces apoptoze, endo in eksocitozo, fluidnost membrane ali pa enostavno želimo lokalizirati določene strukture v celici (63).

### **3.4.2. Epifluorescenčna mikroskopija**

Tip fluorescenčnega mikroskopa pri katerem uporabljam isti objektiv za zbiranje emitirane fluorescenčne svetlobe kot za zbiralec ekscitacijske svetlobe je epifluorescenčni mikroskop. Dandanes je največ fluorescenčnih mikroskopov za preiskovanje celične biologije takega tipa. Pri svojem delu smo uporabili epifluorescenčni mikroskop.

### **3.4.3. Fluorofori uporabljeni za fluorescenčno mikroskopijo**

#### **Hoechts 33342® (Eksc. Max 350 nm/ em. Max 461 nm, filter DAPI)**

Hoechts je modro fluorescenčno barvilo bis-benzimidinskega tipa. Hoechts se veže v mali žleb DNK, posebno v regije bogate z AT pari. Barvilo prosto prehaja celično membrano, tako da lahko obarvamo mrtve ali žive celice, brez da bi jih ob tem poškodovali. Značilen je velik Stokesov premik, tako da lahko Hoechts uporabljam v kombinaciji z drugimi fluorofori (66, 67). Osnovno raztopino barvila Hoechts (10 mM) smo redčili do delovne koncentracije (100 µM) s PBS.

#### **Protitelesa**

Celice LCL in Ramos smo označili s primarnim protitelesom proti receptoru EP4. Uporabili smo v kuncih proizvedena poliklonska protitelesa proti C-terminalnemu delu (Cayman chemical, ZDA) in N-terminalnemu delu (Imgenex) humanega receptorja EP4, redčena 1:100 v 3% raztopini BSA v PBS. Na primarna telesa smo vezali sekundarna v kozi proizvedena monoklonska protitelesa proti Fc regiji kunčjega IgG konjugirana z barvilm Alexa Fluor®488 proizvajalca Imgenex. Osnovno raztopino protiteles (2 mg/ml) smo redčili do delovne koncentracije 1:5000 v 3% raztopini BSA v PBS.

### **3.4.4. Postopek priprave celic za mikroskopiranje**

- Za en preparat smo potrebovali 2 ml celične suspenzije s koncentracijo  $1 \times 10^6$ /ml, delali smo v duplikatu (kontrola in tretirane celice)
- centrifugirali smo 5 minut pri 1200 rpm, odstranili supernatant in resuspendirali v 3 ml PBS
- centrifugirali smo 5 minut pri 1200 rpm, odstranili supernatant, dodali 4% raztopino formaldehida v PBS, vzorce prenesli v mikrotitrsko ploščico s 6 vdolbinami. Na dno vsake vdolbinice smo položili krovna stekelca, na stekelca pa kanili našo suspenzijo celic v formaldehidu
- inkubirali smo v inkubatorju 10 min
- odstranili smo formaldehid, spirali s PBS (3 x 1 ml)
- permeabilizirali smo z 0,5% raztopino Tritona X-100 v PBS (10 min)
- odstranili smo Triton, spirali s PBS
- inkubirali smo s primarnimi protitelesi proti EP4 (1:100 v 3% BSA v PBS) 60 min \*
- odstranili smo raztopino protiteles, spirali s PBS
- inkubirali smo s sekundarnimi protitelesi (1:5000 v 3% BSA v PBS) in z barvilom Hoechts (10uM) 60 min. \*\*
- odstranili smo raztopino protiteles in spirali s PBS
- pustili smo da so se stekelca na dnu mikrotitrsko ploščice delno osušila in nato krovna stekelca prenesli na objektna stekelca. Na objektna stekelca smo kanili kapljico Prolong Gold antifade reagenta in pokrili s krovnim stekelcem s fiksiranimi celicami

\*V kontrolo nismo dali primarnih protiteles.

\*\*Inkubirali smo v temnem prostoru.

### **3.5. Pretočna citometrija**

(ang. *Flow cytometry; tudi: FACS – fluorescence activated cell sorting*)

Pretočna citometrija je laserska tehnika, ki omogoča štetje, sortiranje in analizo različnih celic v suspenziji. Področje uporabe je zelo široko-uporablja se v imunologiji, molekularni biologiji, patologiji, rastlinski biologiji itd. (67, 68, 69). Za analizo na pretočnem citometru potrebujemo celice v suspenziji. Ko injiciramo vzorec, se celice razporedijo tridimenzionalno po prostoru s pomočjo hidrodinamičnega fokusiranja (67).

Poleg morfoloških karakteristik lahko s pretočno citometrijo določamo tudi funkcionalne karakteristike celic. Pretočni citometer ima dva do štiri fluorescenčne detektorje, ki merijo emitirano svetlobo daljše valovne dolžine od vzbujevalne laserske svetlobe. Vsak detektor zaznava določeno valovno dolžino, ta signal pretvori v električni, nato pa na podlagi matematične obdelave dobimo diagram s stranskim in prednjim sipanjem, poleg tega pa še jakost oddane fluorescenčne svetlobe. S fluorescenčnim označevanjem lahko preučujemo določeno podpopulacijo krvnih celic. Prisotnost specifičnih antigenov na njihovi površini ugotavljam z imunofluorescenčnimi tehnikami. Za določen antigen uporabimo protitelesa konjugirana s fluorokromi. V eni analizi lahko uporabimo več fluorokromov, vendar moramo zagotoviti detekcijo z različnimi detektorji valovnih dolžin (63).

Za analizo na pretočnem citometru potrebujemo celice v suspenziji. Celice ne smejo biti agregirane, koncentracija pa mora biti med  $10^5$ – $10^7$  celic/ml. Koncentracija celic vpliva tudi na hitrost sortiranja. Vzorce najpogosteje pripravljamo v izotoničnem fosfatnemu pufru PBS. Analiza celic iz tumorskih tkiv je bolj zahtevna, saj so potrebeni dodatni postopki za razgradnjo skupka in pripravo vzorca z encimskimi ali mehanskimi tehnikami .

### **3.5.1. Postopek priprave celične suspenzije za analizo na pretočnem hemocitometru**

- Pripravili smo celično suspenzijo s koncentracijo  $2,5 \times 10^5$  /ml
- centrifugirali smo 5 min pri 1200 rpm, odstranili supernatant
- fiksirali smo celice s 4% raztopino formaldehida 10 min
- centrifugirali smo 5 min pri 2300 rpm, odstranili supernatant in spirali s PBS
- permeabilizirali smo z 0,5% raztopino Tritona X-100 v PBS ( 10 min)
- centrifugirali smo 5 min pri 2300 rpm, odstranili supernatant in spirali s PBS
- inkubirali smo z 3% raztopino BSA v PBS 30 min
- inkubirali smo z raztopino primarnih protiteles proti EP4 (1:100 v 3% raztopini BSA v PBS ) 60 min \*
- centrifugirali smo 5 min pri 2300 rpm, odstranili supernatant in spirali s PBS
- inkubirali smo z raztopino sekundarnih protiteles (1:5000 v 3% BSA v PBS) 60 min\*\*
- centrifugirali smo 5 min pri 2300 rpm, odstranili supernatant in spirali s PBS
- celice smo resuspendirali v 250 ul svežega PBS
- analizirali smo na pretočnem citometru

\*V kontrolo nismo dali primarnih protiteles.

\*\*Inkubirali smo v temnem prostoru.

### **3.5.2. Statistična obdelava podatkov**

Podatke smo statistično obdelali s programom GraphPad Prism, uporabili smo test ANOVA in post-hoc test Tukey. Statistično signifikantno: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . Sinergizem monoklonskih protiteles in PgE1-OH smo ovrednotili s prosto dostopnim programom CompuSyn.

## **4. REZULTATI IN RAZPRAVA**

Monoklonska protitelesa rituksimab in ofatumumab za razliko od alemtuzumaba, katerega mehanizem delovanja še ni natančno definiran, blokirajo NF-κB signalno pot in pripomorejo k apoptozi nezrelih in zrelih limfocitov B (28, 37). Prav tako tudi agonisti receptorja EP4 kemosenzitizirajo maligne limfocite B in modulirajo NF-κB transkripcijsko signalno pot (50).

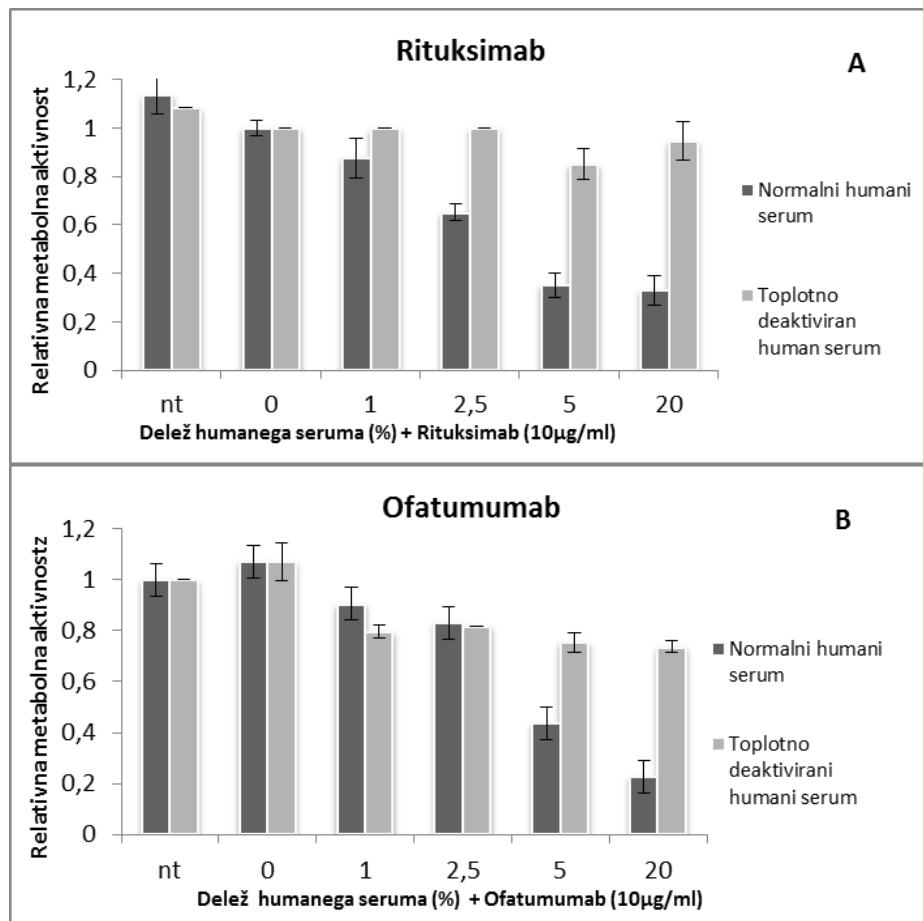
Sinergizem je biološki odziv na izpostavljenost več učinkovinam, katerih skupen učinek je večji od vsote učinkov posameznih učinkovin. Zanimalo nas je, ali monoklonska protitelesa in agonist receptorja EP4 PgE1-OH delujejo sinergistično. Znano je, da imajo nižje koncentracije učinkovin manj stranskih učinkov ter zmanjšajo ali zakasnijo pojav rezistence na zdravila (70). S kombinacijo učinkovin, ki delujeta sinergistično, bi torej lahko pripomogli k manjši toksičnosti posamezne učinkovine, hkrati pa bi tak pristop lahko pripomogel tudi pri premagovanju rezistence na terapevtska monoklonska protitelesa.

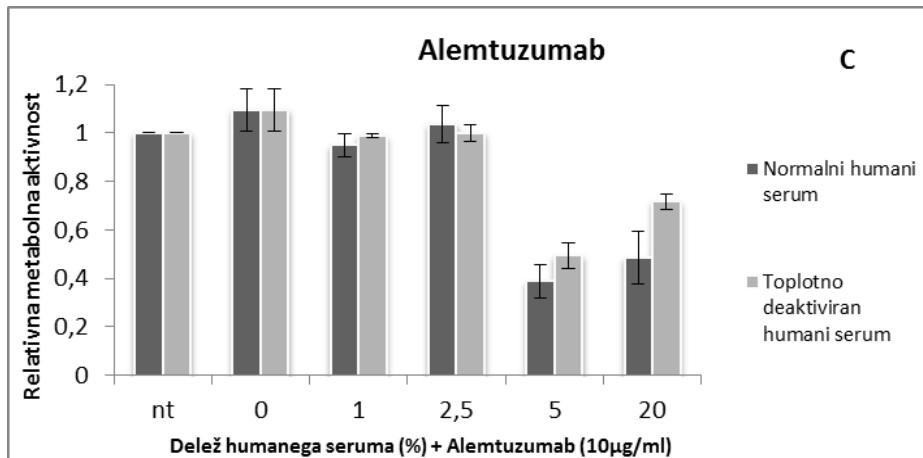
Na humanih celičnih linijah Burkittovega limfoma Ramos smo izvedli teste metabolne aktivnosti po tretiranju s PgE1-OH in monoklonskimi protitelesi ter ovrednotili učinke. Najprej smo celice Ramos inkubirali z monoklonskimi protitelesi in humanim serumom v različnih koncentracijah glede na količino celične suspenzije ter *in vitro* ovrednotili vpliv s komplementom posredovane citotoksičnosti. Nato smo celice inkubirali z monoklonskimi protitelesi, PgE1-OH in 1% ter 2,5% koncentracijami seruma, da ugotovimo ali agonist receptorja EP4 deluje kemosenzitivno na citotoksične učinke preučevanih protiteles in ali imajo monoklonska protitelesa in PgE1-OH sinergistični učinek.

#### 4.1. Humani serum aktivira s komplementom posredovano citotoksičnost *in vitro*

Najprej smo ovrednotili citotoksični vpliv preučevanih monoklonskih protiteles *in vitro*. S tem namenom smo izbrali celično linijo Burkittovega limfoma Ramos. Celice Ramos izražajo receptor EP4 (58) ter površinska označevalca CD20 in CD52, na katera se vežejo monoklonska protitelesa rituksimab, ofatumumab in alemtuzumab (59, 58, 20).

Zanimalo nas je, kakšen je citotoksični učinek protiteles rituksimab, ofatumumab in alemtuzumab *in vitro*. S tem namenom smo uporabili terapevtske koncentracije protiteles ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) (41, 20). Iz Slike 6 lahko vidimo, da sama protitelesa v terapevtskih koncentracijah nimajo pomembnega vpliva na zmanjšanje preživetja celic Ramos *in vitro*. Ko smo dodali serum kot vir komplementa, se je metabolna aktivnost celic signifikantno znižala sorazmerno z višanjem koncentracije seruma. S tem smo dokazali, da je serum deloval kot mediator citotoksičnega učinka monoklonskih protiteles *in vitro*.





**Slika 6: Metabolna aktivnost celic Ramos ob dodatku rituksimaba (A), ofatumumaba (B) in alemtuzumaba (C) ter seruma kot vira komplementa:**

Celice Ramos ( $2,0 \times 10^5$  celic/ml) smo tretirali z koncentracijami 10 µg/ml rituksimaba, ofatumumaba in alemtuzumaba. Po 24 urah smo s testom MTS pomerili metabolno aktivnost celic. Kot netretirano kontrolo (NT) smo inkubirali samo celice v prisotnosti topila (PBS). Rezultat je reprezentativen za tri neodvisno izvedene poskuse v triplikatu.

Citotoksični učinek monoklonskih protiteles je naraščal s koncentracijo seruma, največji učinek je viden pri 20% serumu, kjer je relativna metabolna aktivnost celic le še 30% pri rituksimabu, 20% pri ofatumumabu in 45% pri alemtuzumabu. Celice smo inkubirali tudi z inaktiviranim humanim serumom in monoklonskimi protitelesi. V tem primeru monoklonska protitelesa niso imela učinka, zaradi inaktivacije sistema komplementa, ki bi izvršil citotoksični učinek na celicah.

Naši rezultati so v skladu z večimi *in vitro* študijami, ki so preučevale citotoksični učinek monoklonskih protiteles rituksimaba in ofatumumaba preko sistema komplementa. Pokazali smo, da so bili učinki ofatumumaba približno 10% močnejši od rituksimaba (Slika 6), kar je v skladu z *in vitro* študijami (24, 41, 25) in tudi znani učinki v terapiji (26). Ofatumumab in rituksimab se vežeta na površinski označevalci CD20, pri čemer se receptor po vezavi protitelesa ofatumumab internalizira razmeroma počasi in s tem omogoča daljši časovni razpon da se rekrutira sistem komplementa (36, 27). Vezavno mesto rituksimaba je na večji ekstracelularni zanki CD20 označevalca, medtem ko je vezavno mesto ofatumumaba na manjši ekstracelularni zanki, ki je bližje celični membrani in omogoča boljše oprijemališče za komponente komplementa (71, 27, 72).

V magistrski nalogi smo vrednotili tudi citotoksični učinek alemtuzumaba na celicah Ramos pri različnih koncentracijah seruma. Dokazano je bilo, da alemtuzumab posreduje citotoksične učinke preko sistema komplementa na celicah bolnikov s kronično limfocitno levkemijo *in vitro* (20, 73). Premreženje alemtuzumaba na celicah Ramos s sekundarnim v kozi proizvedenem protitelesom IgG, je vodilo v lizo celic *in vitro* (20). V primerjavi z rituksimabom in ofatumumabom smo ugotovili, da alemtuzumab aktivira s komplementom posredovano citotoksičnost na celicah Ramos, vendar so za to potrebne višje koncentracije seruma.

#### **4.2. PgE1-OH in monoklonska protitelesa proti CD20 in proti CD52 zmanjšajo metabolno aktivnost malignih limfocitov B**

Zanimalo nas je, ali terapevtska monoklonska protitelesa delujejo sinergistično z agonistom receptorja EP4 *in vitro*, ter ali lahko to dosežemo z nižjimi koncentracije posameznih učinkovin. V ta namen smo izbrali 1  $\mu\text{M}$  in 10  $\mu\text{M}$  koncentraciji PgE1-OH (8). Pri koncentraciji 10  $\mu\text{M}$  PgE1-OH je živost celic Ramos po 48h približno 80%. Koncentracijo 1  $\mu\text{M}$  pa smo uporabili ker PgE1-OH v tej koncentraciji nima pomembnega vpliva na preživetje celic Ramos (48, 8). Zanimalo nas je, ali bo uporaba PgE1-OH skupaj z terapevtskimi monoklonskimi protitelesi delovala kemo-senzitivno in sinergistično ter zmanjšala preživetje celic Ramos.

Uporabljene koncentracije monoklonskih protiteles temeljijo na študijah in znanih terapevtskih koncentracijah. Pri *in vitro* študijah so uporabili terapevtske koncentracije (0,8  $\mu\text{g/ml}$  – 70  $\mu\text{g/ml}$ ) v kombinaciji s serumom (41, 20). Za študijo sinergističnih učinkov smo izbrali terapevtsko (10  $\mu\text{g/ml}$ ) (73, 20, 26), 10 krat nižjo (1  $\mu\text{g/ml}$ ) ter 10x višjo (100  $\mu\text{g/ml}$ ) koncentracijo monoklonskih protiteles.

Celice smo tretirali z 1% in 2,5 % serumom saj nas je zanimalo ali delujejo monoklonska protitelesa sinergistično s PgE1-OH. Pri višjih koncentracijah seruma (10% in 20%) je že 80% celic mrtvih pri terapevtski koncentraciji rituksimaba in ofatumumaba ter 50% pri alemtuzumabu. Serumske koncentracije smo določili tudi na podlagi že narejenih študij (41, 74, 73).

Terapevtski pristop z uporabo EP4 agonistov kot podporne terapije bi potencialno lahko zmanjšal število stranskih učinkov monoklonskih protiteles, saj bi uporabili nižje koncentracije (28, 8).

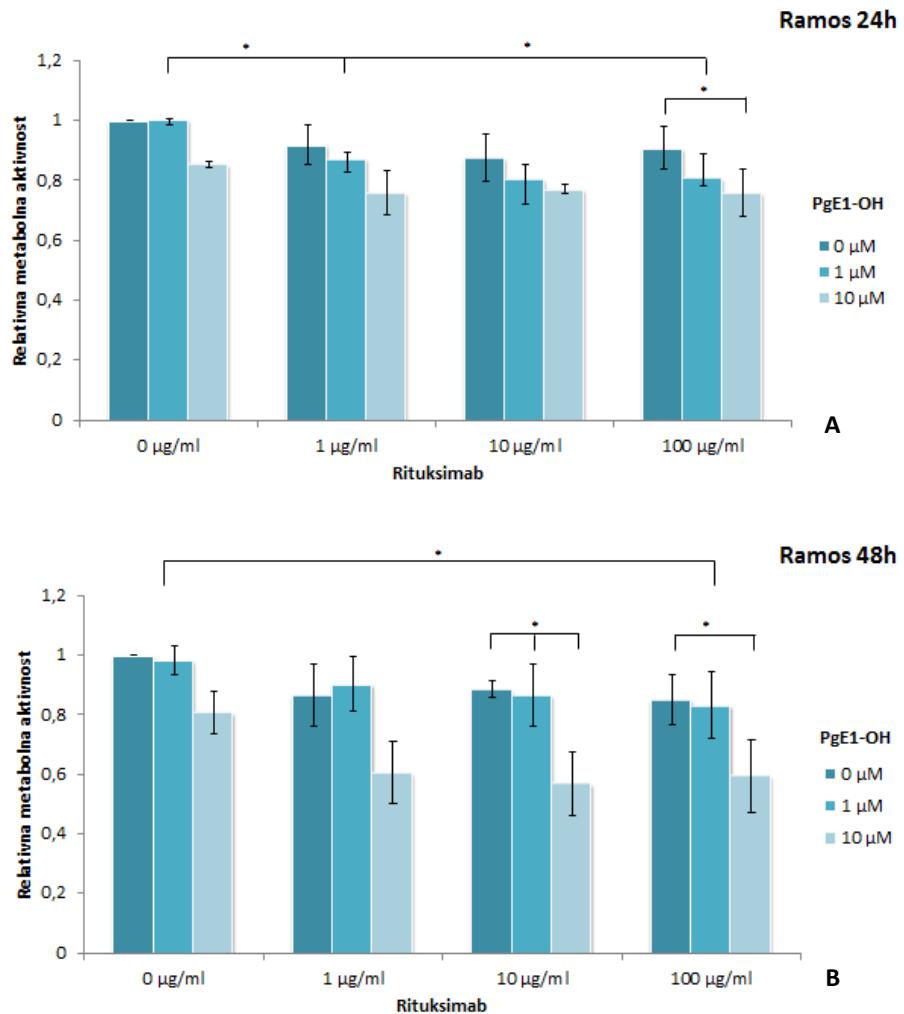
Sinergistični učinek smo potrdili še z uporabo programa CompuSyn (ComboSyn, Paramus, NJ, USA). CompuSyn je pogosto uporabljen program, ki temelji na Chou-Talalay metodi in deluje na podlagi predefiniranih matematičnih algoritmov (70, 75).

Na podlagi vnešenih podatkov vpliva PgE1-OH in rituksimaba (v določenih konecentracijah) na živost celic, smo izračunali kombinacijski indeks (CI). Kadar je CI nižji od 1 ( $CI < 1$ ), sklepamo na sinergizem (70), kadar je CI višji od 1 ( $CI > 1$ ) na antagonizem, v primeru, ko je CI enak 1 ( $CI=1$ ) pa na aditivni učinek dveh ali več spojin. V spodnji preglednici (Preglednica 5) je prikazana obrazložitev simbolov in pomena CI.

**Preglednica 5: Kombinacijski indeks**

KOMBINACIJSKI INDEKS (CI)	SIMBOL	POMEN
<0.1	++++	zelo močan sinergizem
0.1-0.3	+++	močan sinergizem
0.3-0.7	++	sinergizem
0.7-0.85	+	zmeren sinergizem
0.85-0.90	+ -	rahel sinergizem
0.90-1-10	-	skoraj aditiven
1.10-1.20	--	rahel antagonizem
1.20-1.45	---	zmeren antagonizem
1.45-3.3	----	antagonizem
3.3-10	-----	močan antagonizem
>10	-----	Zelo močan antagonizem

#### 4.2.1. Sinergistični učinek rituksimaba in PgE1-OH na celicah Ramos (1% serum)



Slika 7: Metabolna aktivnost celic Ramos po 24 (A) in 48 urni (B) inkubaciji z rituksimabom, PgE1-OH in serumom (1%) kot virom komplementa

Celice Ramos ( $2,0 \times 10^5$  celic/ml) smo inkubirali z 1% serumom. Celice smo tretirali z različnimi koncentracijami rituksimaba (0, 1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) in PgE1-OH (1 in 10  $\mu\text{M}$ ) in inkubirali za 24h ali 48h. Po 24 in 48 urah smo s testom MTS pomerili metabolno aktivnost celic. Kot kontrolo smo inkubirali samo celice v prisotnosti topila (0,5% DMSO) in rezultat normalizirali na kontrolo. Rezultat je reprezentativen za tri neodvisno izvedene poskus v triplikatu. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$ .

Celice Ramos smo inkubirali 24 in 48 ur z izbranimi koncentracijami rituksimaba in PgE1-OH (Slika 6). Ugotovili smo, da je PgE1-OH okreplil citotoksične učinke rituksimaba po 24 urah v celotnem koncentracijskem območju, učinek pa se je še povečal po 48 urah.

Po 48 urah inkubacije celic z 1 µg/ml koncentracijo rituksimaba, ki je 10x nižja od terapevtske koncentracije, in 10 µM PgE1-OH, je bilo metabolno aktivnih le še 60% celic. Ta rezultat podpira hipotezo, da bi lahko v kombinaciji s PgE1-OH uporabili nižje koncentracije rituksimaba. S statistično obdelavo podatkov smo prišli še do enega zanimivega zaključka. Po 24 urah inkubacije je bil opazen vpliv samega 10 µM PgE1-OH na zmanjšanje metabolne aktivnosti celic, medtem ko sam rituksimab ni imel signifikantnega vpliva na zmanjšanje preživetja celic v nobeni izmed testiranih koncentracij. Opazili pa smo signifikano razliko med 1 µM PgE1-OH in 10 µM PgE1-OH v prisotnosti 100 µg/ml rituksimaba, kar kaže na kemosenzitivno in sinergistično delovanje agonista receptorja EP4 in rituksimaba. Spodnja preglednica (Preglednica 6) prikazuje še obdelavo podatkov s programom Compusyn, ki potrjuje sinergistični učinek rituksimaba. Slednji je opažen že pri 24 urni inkubaciji celic Ramos z rituksimabom in 1 µM PgE1-OH (Preglednica 6).

**Preglednica 6: Sinergistični učinek rituksimaba in PgE1-OH**

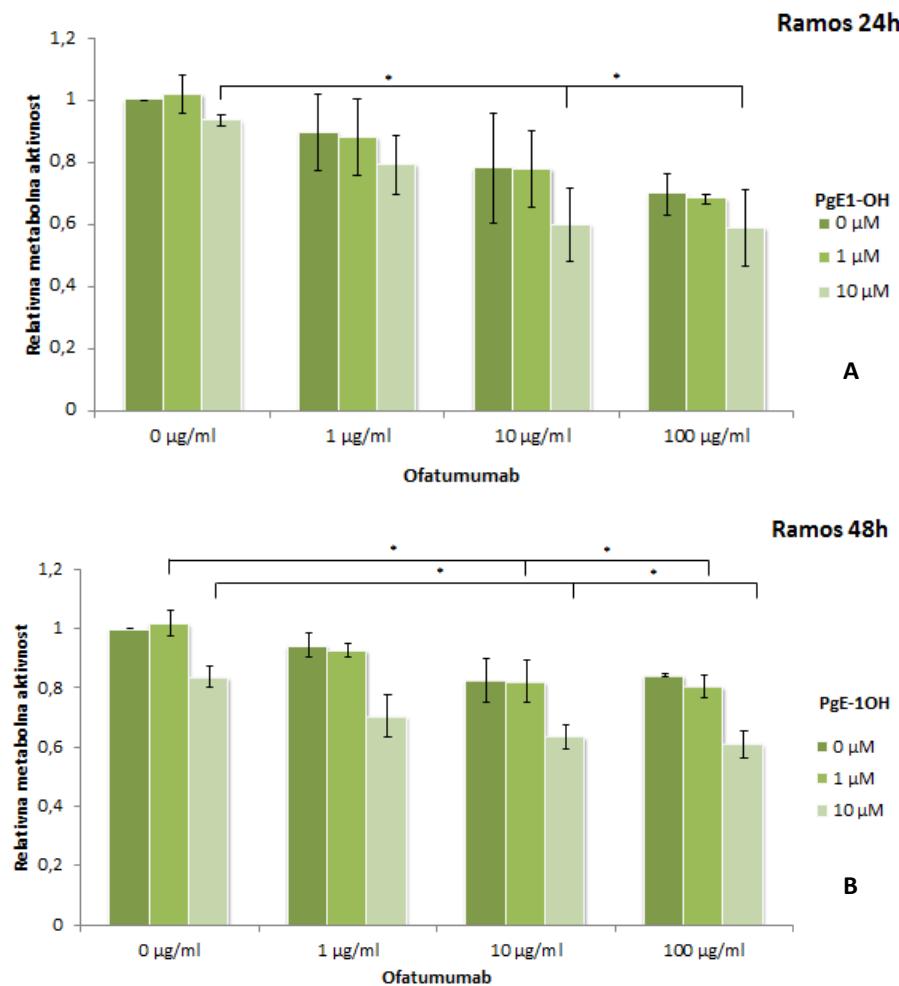
	Monoklonsko protitelo (µg/ml)	PgE1-OH (µM)	Kombinacijski indeks (CI)	Sinergizem
<b>Rituksimab 24h 1%serum</b>	1	1	0.11433	****
	10	1	0.07953	*****
	100	1	0.07953	*****
	1	10	0.62599	***
	10	10	0.65466	***
	100	10	0.62599	***
<b>Rituksimab 48h 1%serum</b>	1	1	293.913	-----
	10	1	0.95861	+-
	100	1	0.11495	****
	1	10	0.51864	***
	10	10	0.45676	***
	100	10	0.31984	***

Kljub temu da so sodobna monoklonska protitelesa v splošnem varna zdravila, imajo lahko pri posameznikih nekatere stranske učinke, med katere sodijo akutne infuzijske reakcije, imunosupresija, pojav avtoimunosti ter hiperprodukcija citokinov (74).

Pojav rezistence na rituksimab je vedno bolj pereč problem (42, 28, 7). Premagovanje rezistence preko sinergističnega učinka večih spojin pa predstavlja nepogrešljiv pristop pri zdravljenju levkemij in limfomov, saj imajo tumorske celice tako manj možnosti za prilagoditev na terapijo.

Uporaba agonistov receptorja EP4 kot podporne terapije bi lahko tudi znižala stroške zdravljenja, saj so biološka zdravila med katere sodijo monoklonska protitelesa, zelo draga. Uporaba agonista receptorja EP4 in monoklonskih protiteles bi lahko imela tudi druge ugodne farmakokonomske učinke, saj bi zaradi nižjih odmerkov monoklonskih protiteles posledično lahko preprečili oziroma omilili njihove stranske učinke.

#### 4.2.2. Sinergistični učinek ofatumumaba in PgE1-OH na celicah Ramos (1% serum)



Slika 8: Metabolna aktivnost celic Ramos po 24(A) in 48 urni (B) inkubaciji z ofatumumabom, PgE1-OH in serumom (1%) kot virom komplementa

Celice Ramos ( $2,0 \times 10^5$  celic/ml) smo inkubirali z 1% serumom. Celice smo tretirali z različnimi koncentracijami ofatumumaba (0, 1, 10, 100 µg/ml) in PgE1-OH (1 in 10µM) in inkubirali za 24h ali 48h. Po 24

in 48 urah smo s testom MTS pomerili metabolno aktivnost celic. Kot kontrolo smo inkubirali samo celice v prisotnosti topila (0,5% DMSO) in rezultat normalizirali na kontrolo. Rezultat je reprezentativen za tri neodvisno izvedene poskus v triplikatu. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Nadalje nas je zanimal učinek novejšega monoklonskega protitelesa ofatumumab v kombinaciji s PgE1-OH. Uporabili smo enake terapevtske koncentracije protitelesa ofatumumab kot pri protitelesu rituksimab. Ugotovili smo, da je agonist receptorja EP4 PgE1-OH po 24 urah inkubacije okrepil citotoksične učinke v celotnem koncentracijskem območju ofatumumaba (Slika 8). Učinki PgE1-OH so bili še močnejši po 48 urah, kjer je metabolna aktivnost celic po dodatku 10  $\mu\text{M}$  PgE1-OH opazno nižja kot pri samem ofatumumabu (Slika 8B). S statistično obdelavo podatkov smo ugotovili, da PgE1-OH in ofatumumab delujeta sinergistično, saj je citotoksični učinek na celicah večji ob prisotnosti PgE1-OH in ofatumumaba kot pa v prisotnosti vsakega posebej. Pri najvišji koncentraciji ofatumumaba in PgE1-OH je relativna metabolna aktivnost celic približno 65%.

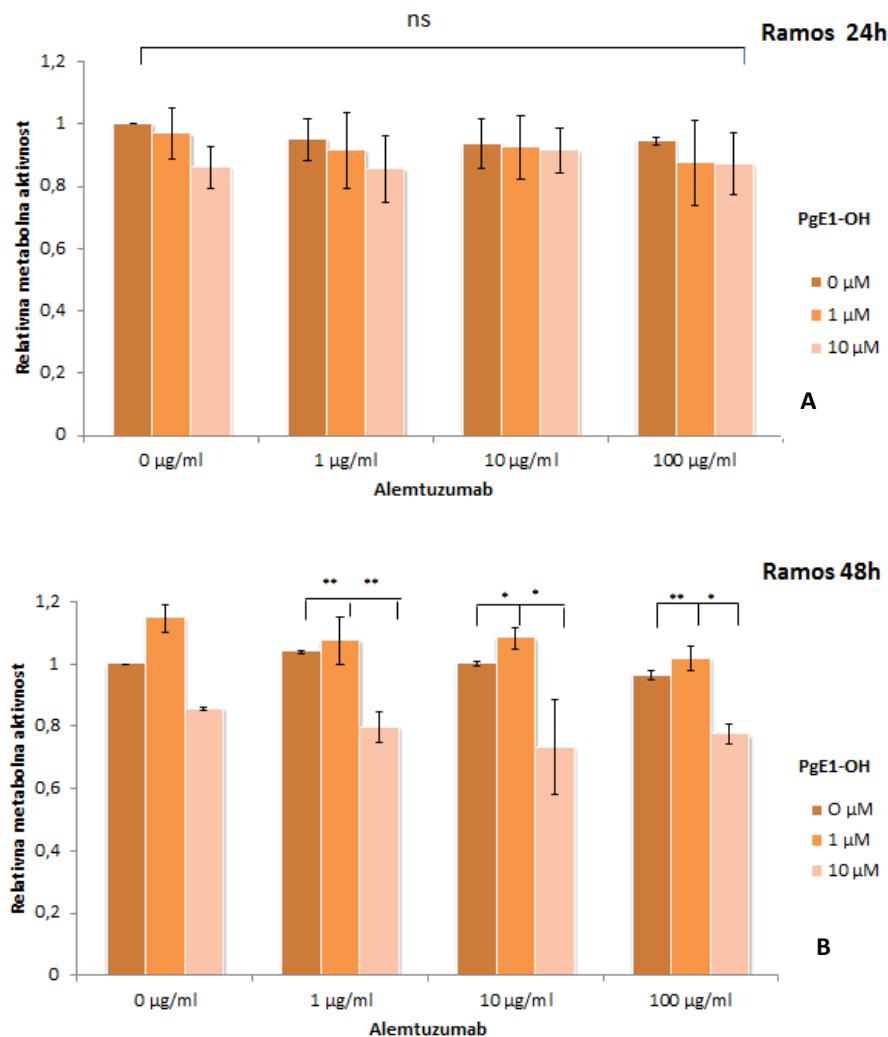
Ob primerjavi relativne metabolne aktivnosti celic po 48 urni inkubaciji z rituksimabom in ofatumumabom smo ugotovili, da sta oba ofatumumab in rituksimab v kombinaciji s PgE1-OH približno enako znižala metabolno aktivnost celic. Obdelava podatkov s programom CombuSyn je potrdila sinergistični učinek Ofatumumaba in PgE1-OH, saj je kombinacijski indeks v večini primerov veliko nižji od 1.

#### Preglednica 7: Sinergistični učinek ofatumumaba in PgE1-OH

	Monoklonsko protitelo ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	PgE1-OH ( $\mu\text{M}$ )	Kombinacijski indeks (CI)	Sinergizem
<b>Ofatumumab 24h 1%serum</b>			0.71634	++
	1	1	0.57990	***
	10	1	0.98533	+-
	100	1	0.30367	****
	1	10	0.19936	****
	10	10	0.33563	****
<b>Ofatumumab 48h 1%serum</b>			1.39845	--
	1	1	0.22071	****
	10	1	0.83964	++
	100	1	0.53030	***
	1	10	0.43034	***
	10	10	0.40152	***

Ker je znano, da obe monoklonski protitelesi proti CD20 izvršita mehanizem citotoksičnosti po isti signalni poti preko NF-κB (37, 76), je rezultat tudi v skladu z našimi pričakovanji, da agonist receptorja EP4 in monoklonska protitelesa proti CD20 delujejo sinergistično (Preglednica7).

#### 4.2.3. Učinek alemtuzumaba in PgE1-OH na celicah Ramos (1% serum)



**Slika 9: Metabolna aktivnost celic Ramos po 24(A) in 48 urni (B) inkubaciji z alemtuzumabom, PgE1-OH in serumom (1%) kot virom komplementa**

Celice Ramos ( $2,0 \times 10^5$  celic/ml) smo inkubirali z 1% serumom. Celice smo tretirali z različnimi koncentracijami alemtuzumaba (0, 1, 10, 100 µg/ml) in PgE1-OH (1 in 10µM) in inkubirali za 24h ali 48h. Po 24 in 48 urah smo s testom MTS pomerili metabolno aktivnost celic. Kot kontrolo smo inkubirali samo celice v

prisotnosti topila (0,5% DMSO) in rezultat normalizirali na kontrolo. Rezultat je reprezentativen za tri neodvisno izvedene poskuse v triplikatu. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 \*\*\* p < 0.001. Ns: ni signifikantne statistične povezave.

V naslednjem poskusu smo celice Ramos inkubirali z alemtuzumabom, (ki se veže na površinski označevalec CD52) (Slika 9) in PgE1-OH. Po 24 urni inkubaciji nismo zaznali nobenih statistično signifikantnih razlik med tretiranjem s PgE1-OH in alemtuzumabom, posamezno ali v kombinaciji. Relativna metabolna aktivnost celic je bila odvisna samo od koncentracije PgE1-OH, medtem ko alemtuzumab ni povečal citotoksičnih učinkov PgE1-OH. Po 48h je učinek PgE1-OH večji, kar smo opazili tudi v prejšnjih poskusih (Slike 7, 8). Pri koncentraciji 10 µM PgE1-OH pade po 48 h metabolna aktivnost celic na 80%. Pri tretiranju celic z naraščajočimi koncentracijami alemtuzumaba nismo opazili signifikantne razlike v primerjavi s kontrolo, pač pa je vpliv imel sam PgE1-OH. Na sliki 9 vidimo, da alemtuzumab v kombinaciji s PgE1-OH nima signifikantnega vpliva na viabilnost celic Ramos. Sklepamo lahko torej, da anti-CD52 monoklonsko protitelo alemtuzumab, ne deluje kemosenzitivno in sinergistično z agonistom receptorja EP4 na celicah Ramos *in vitro*.

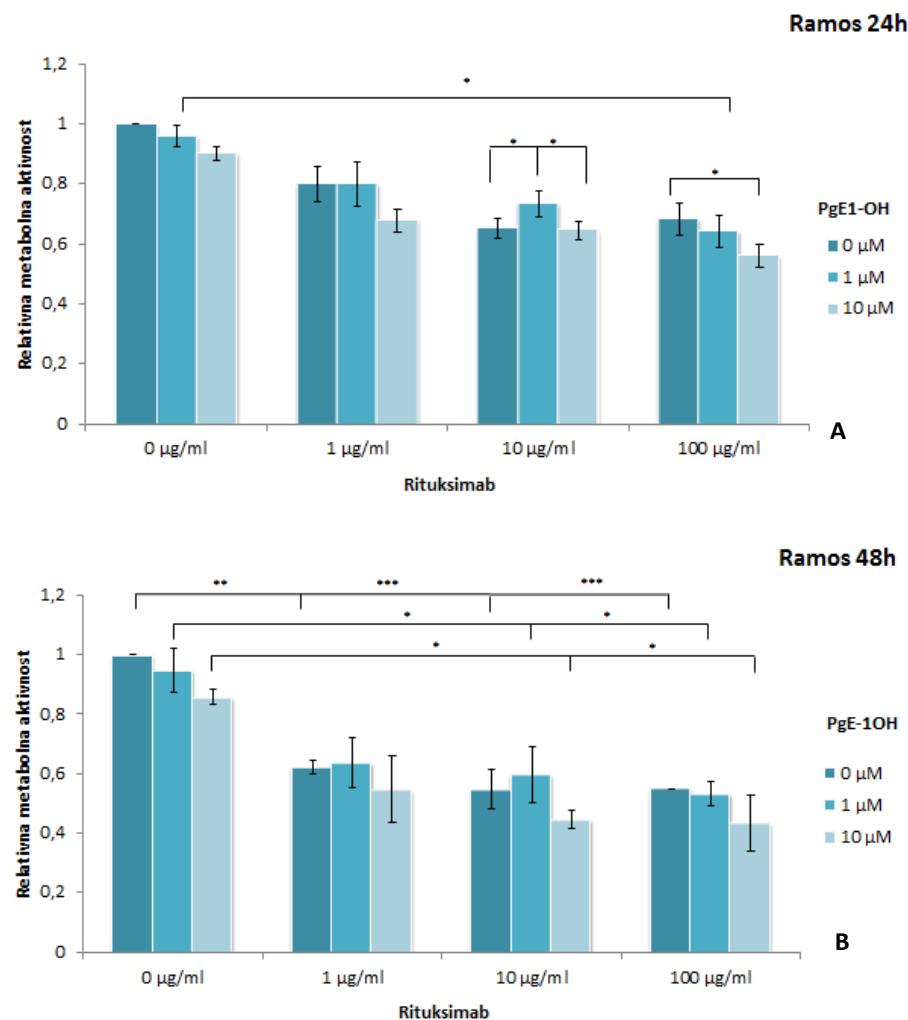
Monoklonski protitelesi proti CD20 rituksimab in ofatumumab sta imeli kemosenzitivne učinke v kombinaciji z PgE1-OH, medtem ko monoklonsko protitelo alemtuzumab, ki se veže na CD52 površinski označevalec, ni imelo sinergističnega učinka skupaj s PgE1-OH. Razlog za to bi lahko bil, da rituksimab in ofatumumab kakor tudi PgE1-OH znižajo konstitutivno aktivacijo NF-κB v malignih limfocitih B (8, 52), medtem ko za alemtuzumab ta mehanizem ni poznan (17). V spodnji preglednici (Preglednica 8) je prikazana še obdelava podatkov s programom CompuSyn.

**Preglednica 8: Vrednotenje vpliva alemtuzumaba in PgE1-OH na celice Ramos s programom CompuSyn**

	Monoklonsko protitelo ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	PgE1-OH ( $\mu\text{M}$ )	Kombinacijski indeks (CI)	Sinergizem
<b>Alemtuzumab 24h 1%serum</b>		1	1	Ni interakcije N/A
		10	1	Ni interakcije N/A
		100	1	Ni interakcije N/A
		1	10	Ni interakcije N/A
		10	10	Ni interakcije N/A
		100	10	Ni interakcije N/A
<b>Alemtuzumab 48h 1%serum</b>		1	1	Ni interakcije N/A
		10	1	Ni interakcije N/A
		100	1	Ni interakcije N/A
		1	10	0.90488 +-
		10	10	0.83684 ++
		100	10	1.02210 +-

#### 4.2.4. Sinergistični učinek rituksimaba in PgE1-OH na celicah Ramos (2,5% serum)

Pri naslednjem poskusu smo opazovali učinke rituksimaba po inkubaciji z 2,5% humanim serumom kot virom komplementa in PgE1-OH (Slika 10). Koncentracija seruma in rituksimaba sta bili izbrani na osnovi več študij (77, 41, 20).



Slika 10: Metabolna aktivnost celic Ramos po 24(A) in 48 urni (B) inkubaciji z rituksimabom, PgE1-OH in serumom (2,5%) kot virom komplementa

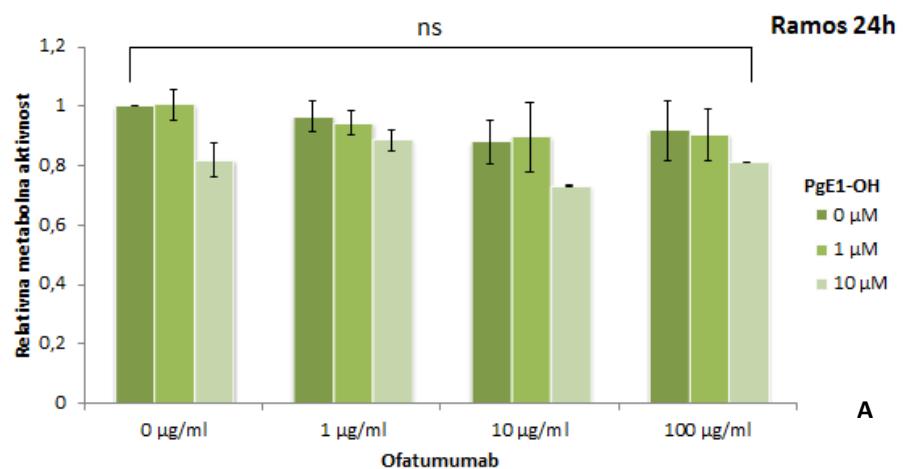
Celice Ramos ( $2,0 \times 10^5$  celic/ml) smo inkubirali z 2,5% serumom. Celice smo tretirali z različnimi koncentracijami rituksimaba (0, 1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) in PgE1-OH (1 in 10  $\mu\text{M}$ ) in inkubirali za 24h ali 48h. Po 24 in 48 urah smo s testom MTS pomerili metabolno aktivnost celic. Kot kontrolo smo inkubirali samo celice v prisotnosti topila (0,5% DMSO) in rezultat normalizirali na kontrolo. Rezultat je reprezentativen za tri neodvisno izvedene poskus v triplikatu. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

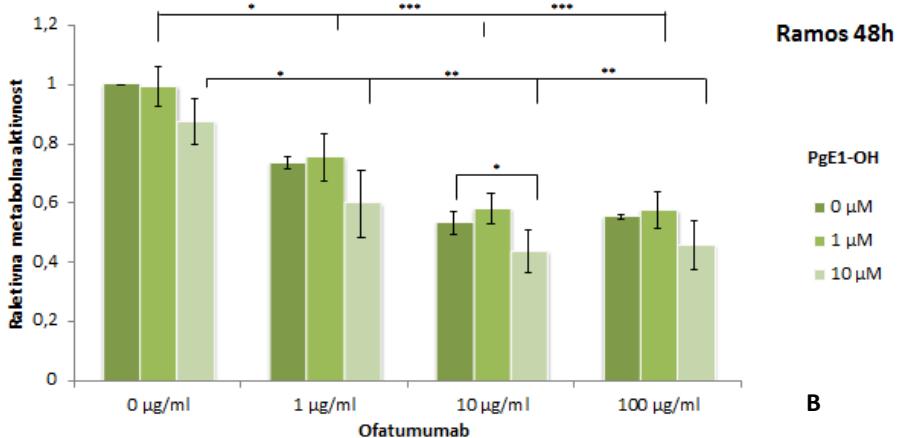
Iz slike 10 vidimo, da je relativna metabolna aktivnost celic po 24 in 48 urah inkubacije nižja kot pri enaki inkubaciji le z 1% serumom, za kar je najverjetneje odgovorna od komplementa posredovana citotoksičnost rituksimaba. Sinergistični učinek je opazen v celotnem koncentracijskem območju rituksimaba in PgE1-OH po 24h in 48h, vendar je manj izrazit kot pri 1% serumu (Slika 7). Opazne so namreč statistično signifikantne razlike ob inkubaciji celic samo z rituksimabom, ki ob prisotnosti seruma vpliva na viabilnost celic. Inkubacija za 48h je še okrepila citotoksične učinke rituksimaba v primerjavi s 24 urno inkubacijo. Rezultati obdelave podatkov s Compusyn po 24 in 48 urni inkubaciji in z 2,5% serumom so v preglednici (Preglednica 9).

Preglednica 9: Sinergistični učinek rituksimaba in PgE1-OH (2,5% serum)

	Monoklonsko protitelo ( $\mu\text{g/ml}$ )	PgE1-OH ( $\mu\text{M}$ )	Kombinacijski indeks (CI)	Sinergizem
Rituksimab 24h 2.5% serum	1	1	300.261	-----
		10	173.136	-----
		100	0.81735	++
		1	0.06363	*****
		10	0.13663	****
	100	10	0.08166	*****
Rituksimab 48h 2.5% serum	1	1	846.986	-----
		10	564.457	-----
		100	0.59994	+++
		1	0.05870	*****
		10	0.01675	*****
	100	10	0.01487	*****

#### 4.2.5. Sinergistični učinek ofatumumab in PgE1-OH na celicah Ramos (2,5% serum)





**Slika 11: Metabolna aktivnost celic Ramos po 24 (A) in 48 urni (B) inkubaciji z ofatumumabom, PgE1-OH in serumom (2,5%) kot virom komplementa**

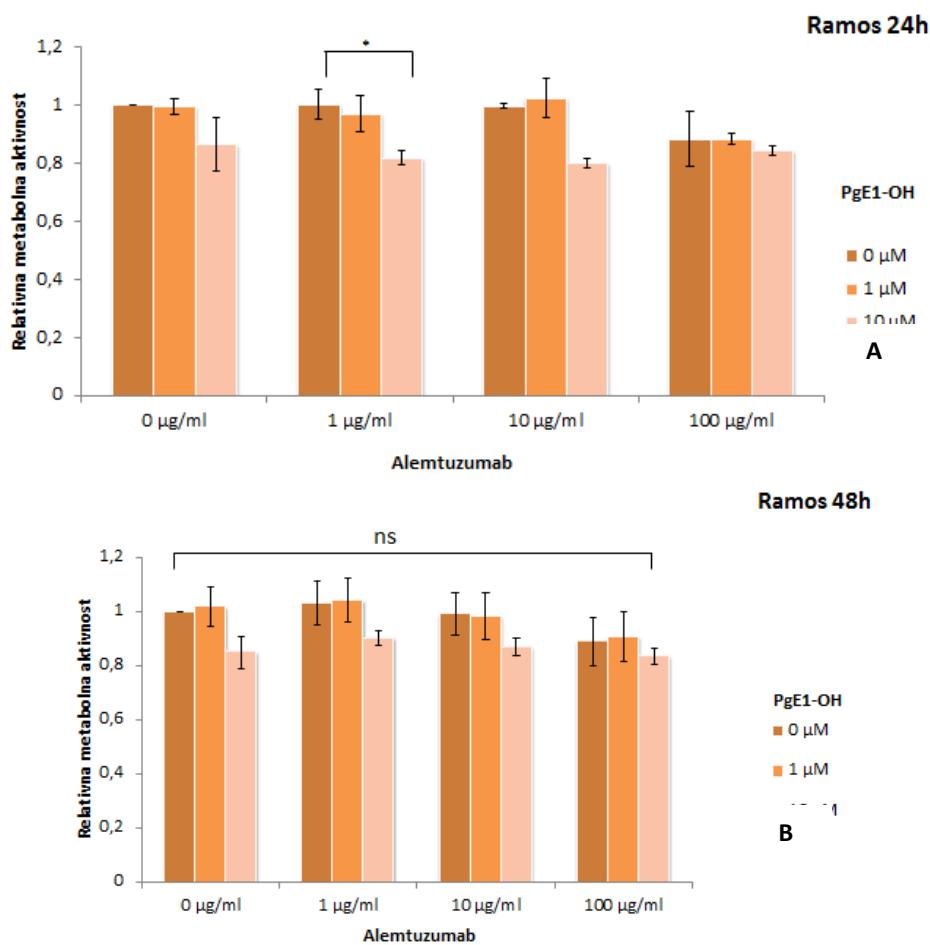
Celice Ramos ( $2,0 \times 10^5$  celic/ml) smo inkubirali z 2,5% serumom. Celice smo tretirali z različnimi koncentracijami ofatumumaba (0,1,10,100 µg/ml) in PgE1-OH (1 in 10 µM) in inkubirali za 24h ali 48h. Po 24 in 48 urah smo s testom MTS pomerili metabolno aktivnost celic. Kot kontrolo smo inkubirali samo celice v prisotnosti topila (0,5% DMSO) in rezultat normalizirali na kontrolo. Rezultat je reprezentativen za tri neodvisno izvedene poskus v triplikatu. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . Ns: ni signifikantne statistične povezave.

Po 24 in 48 urni inkubaciji celic z ofatumumabom in PgE1-OH je opazno izrazito zmanjšanje metabolne aktivnosti celic (Slika 11). Ofatumumab ima sam citotoksični učinek na celice, v kombinaciji s PgE1-OH pa je viden sinergizem (Preglednica 10). Ob primerjavi metabolne aktivnosti ob isti koncentraciji ofatumumaba v kombinaciji z 10 µM PgE1-OH in 1% serumom smo opazili izrazito zmanjšanje metabolne aktivnosti, posebno po 48 urah inkubacije, kar pomeni da komplement posreduje citotoksične učinke ofatumumaba. Pri najvišji koncentraciji ofatumumaba in PgE1-OH ter 48 urni inkubaciji je bila relativna metabolna aktivnost celic le približno 50%. Ena izmed najnovejših študij na bolnikih s kronično limfocitno levkemijo je pokazala razvoj rezistence na ofatumumab zaradi iztrošenja sistema komplementa pri uporabi ofatumumaba v terapiji bolnikov s kronično limfocitno levkemijo (78).

Preglednica 10: Sinergistični učinek rituksimaba in PgE1-OH (2,5% serum)

	Monoklonsko protitelo ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	PgE1-OH ( $\mu\text{M}$ )	Kombinacijski indeks (CI)	Sinergizem
Ofatumumab 24h 2.5% serum	1	1	0.55104	+++
	10	1	0.25252	++++
	100	1	1.32136	--
	1	10	1.22882	--
	10	10	0.80029	++
	100	10	0.98311	+-
Ofatumumab 48h 2.5% serum	1	1	3.37237	----
	10	1	0.51095	+++
	100	1	3.90583	----
	1	10	0.35466	+++
	10	10	0.52063	+++
	100	10	0.18275	++++

#### 4.2.6. Učinek alemtuzumaba in PgE1-OH na celicah Ramos (2,5% serum)



Slika 12: Metabolna aktivnost celic Ramos po 24 (A) in 48 urnih (B) inkubacijih z alemtuzumabom, PgE1-OH in serumom (2,5%) kot virom komplementa

Celice Ramos ( $2,0 \times 10^5$  celic/ml) smo inkubirali z 2,5% serumom. Celice smo tretirali z različnimi koncentracijami alemtuzumaba (0,1,10,100 µg/ml) in PgE1-OH (1 in 10µM) in inkubirali za 24h ali 48h. Po 24 in 48 urah smo s testom MTS pomerili metabolno aktivnost celic. Kot kontrolo smo inkubirali samo celice v prisotnosti topila (0,5% DMSO) in rezultat normalizirali na kontrolo. Rezultat je reprezentativen za tri neodvisno izvedene poskus v triplikatu. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Ns: ni signifikantne statistične povezave.

Po inkubaciji celic z alemtuzumabom, PgE1-OH in 2,5% serumom nismo opazili sinergističnega delovanja. PgE1-OH je zmanjšal preživetje celic pri koncentraciji 10 µM, kar je v skladu s našimi rezultati iz prejšnjih eksperimentov in objavljenimi študijami (48, 8). Alemtuzumab je imel manjši, vendar signifikanten vpliv na preživetje celic v najvišji koncentraciji (100 µg/ml), vendar pa ni okrepil citotoksičnih učinkov PgE-1OH. (Slika 12).

Iz rezultatov ugotavljamo, da se ob dodatku naraščajočih koncentracij PgE1-OH relativna metabolna aktivnost celic Ramos relativno malo zmanjšuje ob uporabi alemtuzumaba, ta vpliv lahko pripisemo le PgE1-OH. Sinergistično delovanje PgE1-OH opazimo v kombinaciji z različnimi koncentracijami ofatumumaba in rituksimaba. Sinergistični učinek je bolj izrazit pri dodatku 1% seruma, kar kaže na pomen skupnega mehanizma apoptoze, ki ni odvisen od aktivacije komplementa.

Rezistenca na monoklonska protitelesa rituksimab in ofatumumab zaradi pomanjkanja ali inhibicije komponent komplementa postaja zmeraj bolj pereč problem (7, 41). Izvedene so bile številne študije, ki so preučevale komplement inhibitorne proteine (mCRP), med katere sodita tudi celična označevalca CD55 in CD59. Študije so pokazale, da izražanje CD55 in CD59 vpliva na učinkovitost terapije z monoklonskimi protitelesi. Ugotovili so, da je izražanje le teh v na rituksimab rezistentni celični liniji Ramos povisano in posledično vpliva na citotoksično kapaciteto rituksimaba (20, 41).

Rituksimab, ofatumumab in alemtuzumab se odmerjajo v standardnih koncentracijah in odmerkih (74, 79). V eni izmed študij so prišli do ugotovitve, da so standardni odmerki morda previsoki glede na količino limfocitov B, zaradi česar se porablja več sistema komplementa kot bi ga sicer rabili za izvršitev citotoksičnosti (79, 78).

Ugotovili smo, da rituksimab in ofatumumab v kombinaciji s PgE1-OH zmanjšata preživetje celic Ramos. Nadaljna obdelava podatkov s programom CompuSyn je potrdila sinergistično delovanje preizkušanih monoklonskih protiteles proti CD20 s PgE1-OH. Pri rituksimabu in

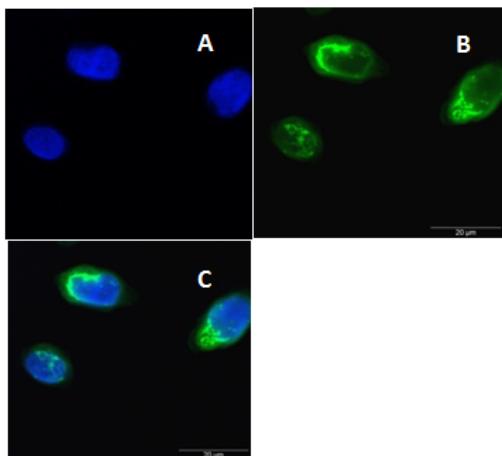
ofatumumabu je sinergizem dosežen že pri 1% serumu in koncentraciji 10 in 100 µg/ml monoklonskih protiteles in 10 µM PgE1-OH. Rezultati za alemtuzumab ne izkazujejo trenda naraščanja sinergističnega učinka z večanjem koncentracije PgE1-OH in monoklonskih protiteles.

### 4.3. Vpliv PgE1-OH na celice LCL

V prvem delu magistrske naloge smo preučevali sinergističen vpliv monoklonskih protiteles in agonista receptorja EP4 na maligno spremenjenih limfocitih B, pri čemer smo uporabili celično linijo Burkittovega limfoma Ramos. V drugem delu magistrske naloge nas je zanimalo, kakšen vpliv ima PgE1-OH na zdrave limfocite B, ter ali so med posamezniki razlike v odzivu na PgE1-OH. Zanimalo nas je tudi, ali je učinek EP4 agonista odvisen od ekspresije receptorja EP4 na celicah. V ta namen smo uporabili limfoblasotidne celične linije, ki so bile pridobljene iz krvi zdravih darovalcev na Univerzi v Tel Avivu (61). Celice so transformirane z Eppstein Barr virusom in so fenotipsko limfociti B, saj tudi izražajo površinske označevalce CD19 in CD20 ter proizvajajo protitelesa (61). Uporabili smo celice desetih zdravih darovalcev.

#### 4.3.1. Izražanje receptorja EP4

Najprej smo želeli preveriti, ali celice LCL izražajo receptor EP4. V ta namen smo celice opazovali s fluorescenčnim mikroskopom po postopku opisanem v poglavju 3.4. Označili smo jih s sekundarnimi fluorescenčnimi protitelesi in opazovali količino in prisotnost receptorja EP4 na celicah. Celice smo obarvali tudi z barvilm Hoechts, ki obarva jedra modro (slika 13).



Slika 13: Izražanje receptorja EP4 na celicah LCL

Po protokolu za fluorescenčno mikroskopijo smo pripravili  $1 \times 10^6$ /ml LCL celic. Jedra celic smo obarvali z barvilo Hoechta (modra, A) in protitelesom za receptor EP4 (zelena, B). 100 X povečava.

S fluorescenčno mikroskopijo smo potrdili, da celice LCL izražajo receptor EP4. V nadaljevanju smo preverjali količino receptorja EP4 na celicah LCL s pomočjo pretočne citometrije.

Količino receptorja EP4 smo opazovali kot povprečno intenziteto fluorescence MFI (*Median fluorescence intensity*) ter v nadaljevanju (poglavlje 4.3.4.) primerjali ali je smrtnost celic odvisna od količine receptorja EP4.

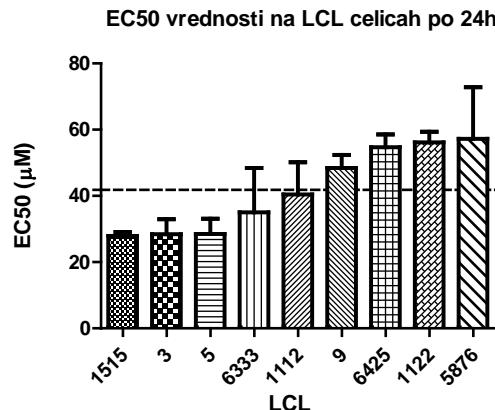
#### **4.3.2. PgE1-OH ima manjši vpliv na živost zdravih (celice LCL) v primerjavi z malignimi (Ramos) limfociti B**

Na *in vitro* modelu celic LCL smo ovrednotili učinkovitost delovanja agonista receptorja EP4. Po 24 urni inkubaciji opazimo vidne razlike v EC50 vrednostih med posameznimi linijami. EC50 je vrednost, pri kateri učinkovina doseže 50% maksimalnega učinka. Poskus smo naredili v dveh bioloških ponovitvah. Med posameznimi biološkimi ponovitvami smo izračunali povprečno EC50 vrednost za vsako linijo, ter izračunali povprečno vrednost glede na vse linije (Preglednica 11). Med linijami smo nato primerjali EC50 vrednosti glede na povprečje in ugotovili, da imajo posamezniki različno občutljivost na tretiranje s PgE1-OH, kar se kaže v različnih EC50 vrednostih. Na sliki 14 je grafični prikaz.

Ugotovili smo, da so EC50 vrednosti PgE1-OH višje na celicah LCL zdravih posameznikov ( $41,86 \mu\text{M}$ ) kot na celicah Ramos ( $30,8 \mu\text{M}$ ), kar kaže tendenco na selektivnega delovanja PgE1-OH na maligno spremenjenih limfocitih B (8).

**Preglednica 11: EC50 vrednosti po 24 urah inkubacije LCL celic s PgE1-OH**

LCL	3	5	9	1112	5876	1515	6425	1122	6333	skupno
EC50 ( $\mu\text{M}$ )	28,46	28,50	48,41	40,42	57,21	27,88	54,72	56,17	35,02	<b>41,86</b>
SD	4,50	4,57	3,96	9,78	15,61	1,24	3,85	3,22	13,44	<b>12,51</b>



**Slika 14 Grafični prikaz vrednosti EC50 na celicah LCL po 24 inkubacije**

Po inkubaciji LCL s PgE1-OH za 24h smo obdelali podatke in predstavili inter-individualno variabilnost med različnimi linijami in razliko v EC50 glede na čas inkubacije. Razlika med biološkimi ponovitvami je prikazana kot  $\pm$  SD.

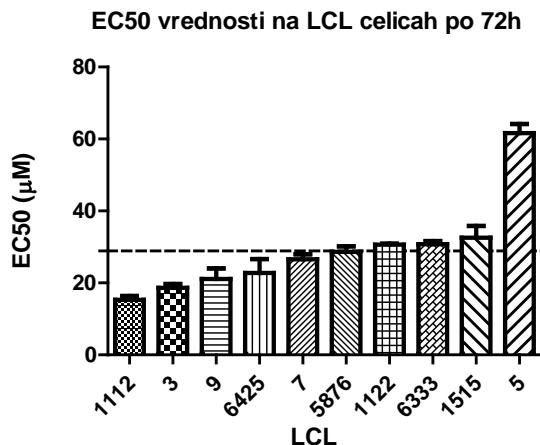
#### **4.3.3. Inter-individualna variabilnost v odzivu na PgE1-OH**

Zanimalo nas je, ali se posemezne celične LCL pridobljene iz krvi zdravih posameznikov, razlikujejo v odzivu na agonist receptorja EP4. V ta namen smo celice inkubirali za dalj časa (72h) s PgE1-OH in določili EC50 vrednosti za posamezno celično linijo. Čas inkubacije 72 h smo izbrali na podlagi predhodnih študij, ki so preučevale inter-individualne razlike v odzivu na spojine (61, 62, 80, 81, 82).

Po 72 urni inkubaciji celic LCL z naraščajočimi koncentracijami PgE1-OH (opisano v poglavju 3.3.2.) smo ugotovili, da so EC50 vrednosti nižje kot po 24h tretiranju. V odzivu na tretiranje s PgE1-OH smo opazili tudi določeno stopnjo inter-individualnih razlik med posameznimi celicami LCL, pridobljenih iz krvi zdravih darovalcev. Preglednica 12 prikazuje razlike v EC50 med linijami po 72 urni inkubaciji, Slika 15 pa prikazuje razlike v EC50 vrednosti posamezne linije glede na povprečno vrednost.

Preglednica 12: EC50 vrednosti po 72 urah inkubacije LCL celic s PgE1-OH

LCL	3	5	9	1112	5876	1515	6425	1122	6333	7	Skupno
EC50 ( $\mu\text{M}$ )	18,66	61,61	21,13	15,31	28,67	32,58	23,14	30,62	30,73	26,57	<b>28,90</b>
SD	1,07	2,53	2,89	1,07	1,53	3,24	3,32	0,29	0,93	1,42	<b>12,82</b>



Slika 15: Grafični prikaz vrednosti EC50 na LCL linijah po 72 h inkubacije

Po inkubaciji LCL s PgE1-OH za 72h smo obdelali podatke in predstavili inter-individualno variabilnost med različnimi linijami in razliko v EC50 glede na čas inkubacije. Razlika med biološkimi ponovitvami je prikazana kot  $\pm$  SD.

Ker se posamezni bolniki na terapijo različno odzivajo, je personalizirana terapija bistvenega pomena. Naši rezultati kažejo na to, da se celice LCL, ki so bile izolirane iz krvi zdravih posameznikov, različno odzivajo na tretiranje z agonistom receptorja EP4. Vzrok za to je lahko, da imajo posamezniki drugačno mutacijo za določen gen. Znani so tudi polimorfizmi v genu za receptor EP4, kar bi tudi lahko vodilo v različne odzive na PgE1-OH (83, 49).

#### 4.3.4. Korelacija med količino receptorja EP4 na LCL celicah in smrtnostjo celic

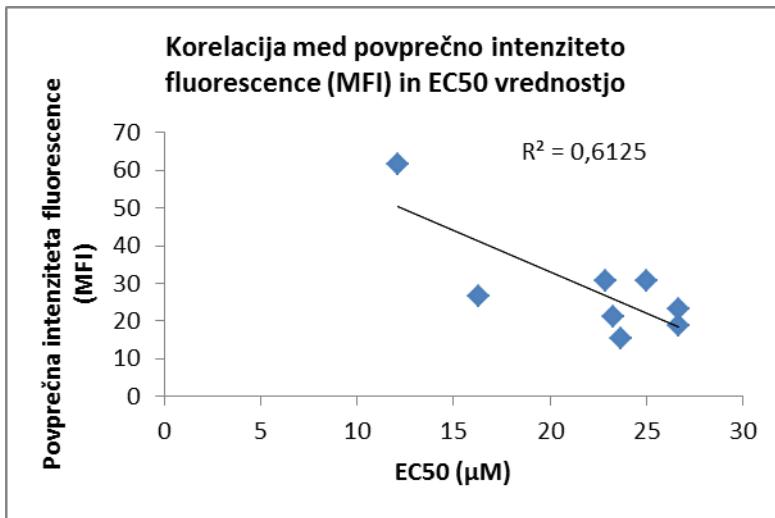
Na LCL celicah smo s pretočno citometrijo ovrednotili količino receptorja EP4 in ugotovili bistvene razlike med posameznimi linijami. Skušali smo ugotoviti, ali obstaja korelacija med količino receptorja EP4 na celicah in dobljeno EC50 vrednostjo (8). Pri vrednotenju korelacije

med ekspresijo receptorja EP4 in vrednostmi EC50 na celicah desetih LCL linij nismo ugotovili signifikantne korelacijske ( $r^2 = 0,6125$ ) (Preglednica 13, Slika 16). Ker gre za biološke ponovitve bi se mogoče boljša korelacija pokazala ob testiranju na večji populaciji. Vpliv PgE1-OH na preživetje celic tako ni odvisen samo od količine receptorja EP4 na površini celic, vendar lahko imajo nanj vpliv tudi drugi znotrajcelični efektorski mehanizmi. Povečana ekspresija receptorja EP4 pa sicer nakazuje na nižje vrednosti EC50, kar bi lahko pomenilo, da je za citotoksično delovanje potrebnega manj PgE1-OH. Receptorja EP4 na zdravih B limfocitih (LCL celice) je tudi manj v primerjavi z B celicami Burkittovega limfoma Ramos (9).

**Preglednica 13: Delež receptorja EP4 na LCL linijah in povprečne EC50 vrednosti**

Delež receptorja EP4 smo vrednotili preko povprečne intenzitete fluorescence (MFI)

LINIJA	EC50 ( $\mu\text{M}$ ) 72h	MFI
5	61,61	12,1
1515	32,58	Nd
1112	15,31	23,7
3	18,66	26,7
9	21,13	23,3
6425	23,14	26,7
7	26,57	16,3
6333	30,73	25
1122	30,62	22,9
5876	28,67	Nd



Slika 16: Korelacija med povprečno intenziteto fluorescence in EC50 vrednostjo na celicah LCL

Povprečno intenzitete fluorescence in EC50 vrednosti posameznih linij smo želeli primerjati in grafično prikazati ali obstaja korelacija.

Celice LCL so tudi dober *in vitro* model za iskanje novih bioloških označevalcev odziva na zdravila (61). V nadaljnih raziskavah bi bilo tako smiselno testirati več celičnih linij, določiti linije z visoko in nizko občutljivostjo, ter s pomočjo mikromrež iskatи nove biološke označevalce v odzivu na agoniste receptorja EP4. S spremeljanjem inhibicije rasti posameznih celic LCL lahko določimo »mejne« celice LCL npr. z najmanjšo in največjo občutljivostjo na učinkovino. Nadaljnja analiza transkriptoma »mejnih« celic pa bi lahko omogočila iskanje novih kliničnih bioloških označevalcev, ki predvidevajo posameznikov odziv na učinkovino (61, 62).

Pri limfomih in levkemijah imamo prisoten širok spekter mutacij, ki vodijo v neodzivnost na zdravljenje. Prav tako se tumorske celice nenehno prilagajajo vplivom iz okolja in se adaptirajo na določeno terapijo. Pomemben je razvoj novih zdravil in oblikovanje novih načinov zdravljenja. Naša *in vitro* študija je dala obetavne rezultate v vrednotenju agonista receptorja EP4 in novih možnosti terapij. Čeprav trenutno na tržišču še ni EP4 agonista, ki bi uspešno prestal vse klinične študije, pa je Rivenprost (ONO-4819CD) leta 2009 zaključil drugo klinično fazo testiranja za zdravljenje ulceroznega kolitisa, vendar še ni prešel v tretjo fazo (84). Alprostadil (ozioroma prostaglandin E1; kislina), ki se rahlo stukturno razlikuje od PgE1-OH (alkohol), je zaključil 3. fazo kliničnih študij (intravensko 20 µg).

Slednji podatki so zelo obetavni, saj pomeni da so strukturno podobni analogi PgE1-OH že bili ovrednoteni glede varnosti uporabe pri ljudeh (85).

## 5. SKLEPI

Temeljno izhodišče za magistrsko naloge je bilo dejstvo, da EP4 agonisti kemosenzitizirajo limfocite B in modulirajo NF-κB transkripcijsko signalno pot (9, 17). Anti-CD20 monoklonska protitelesa, ki se uporablja za zdravljenje B-celičnih limfomov in levkemij prav tako delujejo preko NF-κB signalne poti in znižajo nivo anti-apoptotičnih proteinov kot so Bcl-2, Bcl-xL.

V magistrski nalogi smo ugotovili, da sočasna administracija monoklonskih protiteles z agonistom receptorja EP4 PgE1-OH, dodatno imunosenzitizira celice in ima sinergistični učinek. Tezo smo potrdili s farmakološkim pristopom. Ugotovili smo, da agonist receptorja EP4 in CD20 monoklonska protitelesa proti CD20 delujejo sinergistično na celični liniji Ne-Hodgkinovega limfoma Ramos. Tretiranje Ramos celic z alemtuzumabom, ki se veže na površinski označevalce CD52 ni pokazalo sinergističega učinka. Sinergistični učinek monoklonskih protiteles proti CD20 in PgE1-OH smo potrdili tudi s pomočjo programa CompuSyn.

V nadaljevanju dela smo s farmakološkim pristopom ovrednotili učinke PgE1-OH na celicah LCL zdravih darovalcev. Ugotovili smo, da so EC50 vrednosti na LCL celicah višje kot pri celicah Ramos, kar kaže na selektivno delovanje PgE1-OH na maligno spremenjenih celicah. EC50 vrednosti so se med zdravimi posamezniki razlikovale, nakazali pa so se tudi trendi v povezavi ekspresije receptorja EP4 in preživetjem celic LCL po tretiranju s PgE1-OH. Analiza transkriptoma »mejnih« celic bi nadalje lahko omogočila iskanje novih kliničnih bioloških označevalcev, ki predvidevajo posameznikov odziv na agonist receptorja EP4, kar bi vodilo k bolj personalizirani terapiji.

Menimo, da je naša *in vitro* študija dala obetavne rezultate v vrednotenju agonista receptorja EP4 in novih možnosti terapij za zdravljenje levkemij in limfomov.

## 6. LITERATURA

1. **Lebein T W, Tedder T F:** B lymphocytes: How they develop and function. *Blood* 2008; 112: 1570-1580.
2. **Gerondakis S, Siebenlist U:** Roles of the NF-KB pathway in lymphocyte development and function. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2857169/pdf/cshperspect-NFK-a000182.pdf>. (15.9.2014)
3. **Roitt, I M:** *Essential Immunology 8th edition*, Blackwell Scientific publications, Oxford 1994: 5-371
4. **ATCC:** <http://www.atcc.org/products/all/CRL-1596.aspx> (26.6.2014)
5. **Hamdy, M R:** Recent advances in the management of refractory vasculitis, *InTech*: <http://www.intechopen.com/books/updates-in-the-diagnosis-and-treatment-of-vasculitis/recent-advances-in-the-management-of-refractory-vasculitis> (15.9.2014)
6. **Krumbholz M, Derfuss T, Hohlfeld R, Meinl E:** *B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy*. *Nature reviews neurology* 2012; 8: 613-623.
7. **Rezvani R A, Maloney G D:** Rituximab resistance. *Best practise and research clinical haematology* 2011; 2: 203-216.
8. **Gobec M, Prijatelj M, Marković T, Delić M; Mlinarič-Raščan I:** Chemo-sensitizing effects of EP4 receptor-induced inactivation of nuclear factor kB. *European journal of Pharmacology* 2014; 742: 81-88.
9. **Kuppers R:** Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nature reviews* 2005; 4: 251-262.
10. **Bonavida, B:** *Sensitization of cancer cells for Chemo/Immuno/Radio therapy*. Human Press, Los Angeles 2008.
11. **Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D:** Interna medicina, tretja izdaja. Založba Littera Picta, Ljubljana 2005: 1256-1257
12. **Zenz T, Mertens D, Kuppers R, Dohner H, Stilgenbauer S:** From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Reviews Cancer* 2010; 10: 37-50.
13. **Chiorazzi N, Kanti Rai R, Ferrarini M:** Chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of medicine* 2005; 352: 804-815.
14. **Lozanski G, Heerema N A, Flinn I W, Smith L, Harbison J, Webb J, Moran M, Lucas M, Lin T, Hackbart M:** Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions. *Blood* 2004; 103: 3278-3283.

15. **Fujioka S, Sclabass G M, Schmidt Z C, Niu J, Frederick W A, Dong Q A, Abbruzzese J L, Evans D B, Baker C, Chiao P J:** The function of multiple IkappaB : NF-kappaB complexes in the resistance of cancer cells to Taxol-induced apoptosis, *Oncogene* 2003; 22: 1365-1370.
16. **Willis G T, Dyer J S:** The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. *Blood Journal* 2000; 96: 808-818.
17. **Nuckel H, Frey U, Roth A, Duhrsen U, Siffert W:** Alemtuzumab induces enhanced apoptosis in vitro in B-cells from patients with chronic lymphocytic leukemia by antibody dependent cellular cytotoxicity. *European journal of Pharmacology* 2005; 514: 217-224.
18. **Slovensko združenje bolnikov z limfomom in levkemijo:** [www.limfom-levkemija.org](http://www.limfom-levkemija.org). (12.1.2015)
19. **Sacchi F, Federico M, Dastoli G, Fiorani C:** Treatment of Non Hodgkin's lymphoma with anti CD20 monoclonal antibody Rituximab. *Clinical reviews in Oncology/Haematology* 2001; 37: 13-25.
20. **Stanglmaier M, Reis S, Hallek M:** Rituximab and alemtuzumab induce a nonclassic caspase-independent apoptotic pathway in B-lymphoid cell lines and in chronic lymphocytic leukemia. *Annals of Hematology* 2004; 83: 634-645.
21. **EMA.** European medicines agency:  
[http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/home/Home\\_Page.jsp&mid=](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/home/Home_Page.jsp&mid=) (7.10.2014)
22. **Roszman E D, Lundin J, Lenkei R:** Variability in B-cell antigen expression: implications for treatment of B-cell lymphomas and leukemias with monoclonal antibodies. *The haematology journal* 2001; 2: 300-306.
23. **Olejniczak A, Scott H, Hernandez I, James L:** Acquired resistance to Rituximab is associated with chemotherapy resistance resulting from decreased Bax and BAk expression. *Clinical Cancer research* 2008; 14: 1550-1060.
24. **Tsimberidou M A:** Ofatumumab in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Drugs of today*. 2010; 46: 451-461.
25. **Hagenbeek A, Gadeberg O, Johnson P et. Al:** First clinical use of ofatumumab, a novel fully human anti-CD20 monoclonal antibody in relapsed or refractory follicular lymphoma: results of phase 1/2 trial. *Blood* 2008; 111: 5486-5495.
26. **Pawluczkowycz A W, Beurskens F J, Beum P W, Lindorfer M A, Taylor P R:** Binding of submaximal C1q promotes complement-dependent cytotoxicity (CDC) of B-cells opsonized with anti-CD20 mAbs Ofatumumab (OFA) or Rituximab (RTX): Considerably higher levels of CDC are induced by OFA than by RTX. *Journal of Immunology* 2009; 183: 749-758.
27. **Ruuls R S, Van Bueren L J, Van den Winkel J, Parren W H:** Novel human antibody therapeutics: The age of Umabs. *Biotechnology journal* 2008; 3: 1157-1171.

28. **Jazirehi A R, Bonavida B:** Cellular and molecular signal transduction pathways modulated by rituximab (rituxan, anti-CD20 mAb) in non Hodgkin's lymphoma: implications in chemosensitization and therapeutic intervention. *Oncogene* 2005; 24: 2121-2143.
29. **Suzuki E, Umezawa K, Bonavida B:** Rituximab inhibits the constitutively activated PI3K-Akt pathway in B-NHL cell lines: involvement in chemosensitization to drug-induced apoptosis. *Oncogene* 2007; 26: 6184-6193.
30. **Cooper G M, Hausman R E:** *The cell: A molecular approach 4th edition*, ASM press, Washington 2007.
31. **Reed J C, Pellecchia M:** Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. *Blood* 2005; 106: 408-418.
32. **Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y:** Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 1999; 399: 483-487.
33. **Chen G, Goeddel D V:** TNF-R1 signalling: A beautiful pathway. *Science* 2002; 296: 1634-1637.
34. **Prijatej M, Celhar T, Mlinaric-Rascan I:** Prostaglandin EP4 receptor enhances BCR-induced apoptosis of immature B cells. *Prostaglandin and other lipid mediators* 2011; 95: 19-26.
35. **Mathas S, Rickers A, Boomer K, Dorken B, Mapara M Y:** Anti-CD20- and B-cell receptor-mediated apoptosis: Evidence for shared intracellular signalling pathways. *Cancer research* 2000; 60: 7170-7176.
36. **Glennie J M, French R R, Cragg S M, Taylor P:** Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Molecular Immunology* 2007; 44: 3823-3837.
37. **Jazirehi A R, Huerta-Yepez S, Cheng G, Bonavida B:** Rituximab (Chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) inhibits the constitutive nuclear factor-kB signalling pathway in Non-Hodgkin's lymphoma B-cell lines: Role in sensitization to chemotherapeutic drug-induced apoptosis. *Cancer research* 2005; 65: 264-275.
38. **Weiner G J:** Seminars in haematology. *Rituximab: mechanisms of action* 2010; 47: 115-123.
39. **Science signalling:** <http://stke.sciencemag.org/content/2004/241/pe30/F1> (5.7.2014)
40. **Mishima Y, Terui Y, Takeuchi K, Matsumoto-Mishima A, Matsusaka S, Utsubo-Kuniyoshi R, HatakeR:** The identification of irreversible rituximab-resistant lymphoma caused by CD20 gene mutations. *Blood cancer journal* 2011; 4: 1-8.
41. **Takei K, Yamazaki T, Sawada U, Ishizuka H, Aizawa S:** Analysis of changes in CD20, CD55, and CD59 expression on established rituximab-resistant B-lymphoma cell lines. *Leukemia research* 2006; 30: 625-631.

42. **Cartron G, Trappe R U, Celigny-Solal P:** Interindividual variability of response to rituximab: From biological origins to individualized therapies. *Clinical Cancer Research* 2011; 17: 19-30.
43. **Davis A T, Czerwinski K D, Levy R:** Therapy of B-cell lymphoma with anti-CD20 antibodies can result in the loss of CD20 antigen expression. *Clinical Cancer Research* 1999; 5: 611-615.
44. **Konya V, Marsche G, Schuligoi R, Heinemann A:** E-type prostanoid receptor 4 (EP4) in disease and therapy. *Pharmacology and therapeutics* 2013; 138: 485-502.
45. **Sigal E:** The molecular biology of mammalian arachidonic acid metabolism. *American journal of physiology* 1991; 260: L13-28.
46. **Breyer M R, Carey K B, Mayers A S, Breyer D M:** Prostanoid receptors: Subtypes and signaling 2001; 41: 661-690.
47. **Kudo I, Murakami M:** Prostaglandin E synthase, a terminal enzyme for prostaglandin E2 biosynthesis. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2005; 38: 633-638.
48. **Prijatelj M:** Doktorska disertacija: Prostaglandinski receptor EP4 regulira delovanje limfocitov B. Ljubljana, Fakulteta za Farmacijo 2011
49. **Brock T G:** EP1 through EP4: Targeting GPCRs in cancer. *Caymanchem*. <https://www.caymanchem.com/app/template/Article.vm/article/2176>. (22.5.2014)
50. **Prijatelj M, Celhar T, Gobec M, Mlinaric-Rascan I:** EP4 receptor signalling in immature B cells involves cAMP and NF- $\kappa$ B dependent pathways. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2012; 64: 1090-1098.
51. **Singh T, Vaid M, Katiyar N, Sharma S, Katiyar S K:** Berberine, an isoquinoline alkaloid, inhibits melanoma cancer cell migration by reducing the expressions of cyclooxygenase-2, prostaglandin E (2) and prostaglandin E (2) receptors. *Carcinogenesis* 2011; 32: 86-92.
52. **Murn J, Alibert O, Wu N, Tendil S, Gidrol X:** Prostaglandin E2 regulates B cell proliferation through a candidate tumor suppressor, Ptger4. *The journal of experimental medicine* 2008; 13: 3091-3103.
53. **Invitrogen. Vanderbilt university:** <http://www.vanderbilt.edu/vibre/CellCultureBasicsEU.pdf>. (31.8.2014)
54. **Maqsood M, Matin M M, Bahrami A R, Ghasroldasht M M:** Immortality of cell lines: challenges and advantages of establishment. *Cell biology International* 2013; 37: 1038-1045.
55. **DSMZ:** [http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-319.html?tx\\_dsmzresources\\_pi5%5BreturnPid%5D=192](http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-319.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=192). (26.6.2014)
56. **DSMZ:** [http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-603.html?tx\\_dsmzresources\\_pi5%5BreturnPid%5D=192](http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-603.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=192). (26.6.2014)

57. **ATCC:** <http://www.atcc.org/products/all/CCL-86.aspx>. (26.6.2014)
58. **Saito Y, Nakahata S, Yamakawa N, Kaneda K, Ichihara E, Suekane A, Morishita K:** CD52 as a molecular target for immunotherapy to treat acute myeloid leukemia with high EVI1 expression. *Leukemia* 2011; 25: 921-931.
59. **Guyre C A, Gomes D, Smith K A, Kaplan J M, Perricone M:** Development of an in vivo antibody-mediated killing (IVAK) model, a flow cytometric method to rapidly evaluate therapeutic antibodies. *Journal of immunological methods* 2008; 333: 51-60.
60. **ATCC:** <http://www.atcc.org/products/all/CRL-1805.aspx#culturemethod>. (26.6.2014)
61. **Morag A, Kirchheimer J, Rehavi M, Gurwitz D:** Human lymphoblastoid cell line panels: novel tools for assessing shared drug pathways. *Pharmacogenomics* 2010; 11: 327-340.
62. **Morag A, Oved K, Gurwitz D:** Sex differences in human lymphoblastoid cell sensitivities to antipsychotic drugs. *Journal of Molecular Neuroscience* 2013; 49: 554-558.
63. **Vaje iz biomedicinske analitike: Pretočna citometrija:** [http://wwwffa.uni-lj.si/fileadmin/datoke/KB/Gradivo/PC\\_gradivo\\_BMA.pdf](http://wwwffa.uni-lj.si/fileadmin/datoke/KB/Gradivo/PC_gradivo_BMA.pdf) (10.10.2014)
64. **Andrejc D:** *Indukcija apoptoze v humanih celičnih linijah limfocitov B s stimulacijo receptorja EP4*. Ljubljana : Fakulteta za Farmacijo, 2010.
65. **Wikipedia:** [http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence\\_microscope](http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence_microscope). (20.6.2014)
66. **Spring K R, Davidson W M:** Nikon microscopy. <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html>. (20.6.2014)
67. **Shapiro H M:** *Practical flow cytometry Fourth edition*, John Wiley and sons, New Jersey 2003; 230-245.
68. **Adams D:** University of Michigan Flow core. *Introductory core operation course*. <http://medicine.umich.edu/medschool/research/office-research/biomedical-research-core-facilities/flow-cytometry>. (24.6.2014)
69. **Garner D L, Evans K M, Seidel G E:** Sex-sorting sperm using flow cytometry/cell sorting. *Methods in Molecular Biology* 2013; 927: 279-295.
70. **Chao C T:** Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou -Talalay method. *Cancer research* 2010; 440-446.
71. **Robak T, Robak E:** New anti-CD20 monoclonal antibodies for the treatment of B-cell lymphoid malignancies. *Biodrugs* 2011; 25: 13-25.

72. **Osteborg A:** Ofatumumab, a human anti-CD20 monoclonal antibody. *InformaHealthcare*. <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1517/14712590903586239>. (6.9.2014)
73. **Zent S C, Secreto C R, LaPlant B R, Bone N D:** Direct and complement dependent cytotoxicity in CLL cells from patients with high risk early stage chronic lymphocytic leukemia (CLL) treated with alemtuzumab and rituximab. *Leukemia Research* 2008; 32: 1894-1856.
74. **Brennan F R, Morton L D, Spindeldreher S, Kiessling A, Allenspach R, Hey A, Muller P, Frings W, Sims J:** Safety and immunotoxicity assessment of immunomodulatory monoclonal antibodies. *Landes Bioscience* 2010; 2: 233-255.
75. **Chou T C:** Theoretical basis, experimental design, and computerized stimulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacology Reviews* 2006; 58: 621-682.
76. **Vega I M, Jazirehi R A, Huerta-Yepez S, Bonavida B:** Rituximab-induced inhibition of YY1 and Bcl-XL expression in Ramos Non-Hodgkin's lymphoma cell line via inhibition of NF- $\kappa$ B activity: Role of YY1 and Bcl-XL in Fas resistance and chemoresistance, respectively. *The journal of Immunology* 2005; 175: 2174-2183.
77. **Ziolkowska E, Franiak-Pietryga I, Cebula-Obrzut B, Blonski J Z, Robak T, Smolewski P, Wolowiec A K:** Type of serum influences the rituximab dependent cytotoxicity and apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells in vitro\*. *Postepy Hig Med Dosw* 2012; 66: 730-738.
78. **Baig N A, Taylor R P, Lindorfer M A, Church A K, LaPlant B, Petinger A M, Shanafelt T D, Nowakowski G S, Zent C S:** Induced resistance to Ofatumumab-mediated cell clearance mechanisms, including complement-dependent cytotoxicity in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Immunology* 2014; 192: 1620-1629.
79. **Beurskens F J, Lindorfer M A, Farooqui M, Beum P V, Engelberts P, Mackus W J:** Exhaustion of cytotoxic effector systems may limit monoclonal antibody-based immunotherapy in cancer patients. *Journal of Immunology* 2012; 188: 3532-3541.
80. **Fry R C, Svensson J P, Valiathan C, Wang E, Hogan B J, Bhattacharya S, Bugny J M, Whittaker C E, Samson L D:** Genomic predictors of interindividual differences in response to DNA damaging agents. *Genes Dev* 2008; 22: 2621-2626.
81. **Wen Y, Gorsic L K, Wheeler H E, Ziliak D M, Huang R S, Dolan M E:** Chemotherapeutic-induced apoptosis: a phenotype for pharmacogenomic studies. *Pharmacogenetics and Genomics* 2011; 21: 476-488.
82. **Stark A L, Zhang W, Mi S, Duan S, O'Donnell P H, Huang R S, Dolan M E:** Heritable non-genetic factors as variables of pharmacologic phenotypes in lymphoblastoid cell lines. *Pharmacogenomics Journal* 2010; 10: 505-512.

83. **Glas J, Seiderer J, Czamara D:** PTGER4 expression-modulating polymorphisms in the 5p13.1. region predispose to Crohn's disease and affect NF-KB and XBP1 binding sites. *Harvard.edu.* <http://dash.harvard.edu/handle/1/11181080>. (7.12.2014)

84. **ClinicalTrials.gov:** <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00296556?term=rivenprost&rank=1>. (6.8.2014)

85. **ClinicalTrials.gov:** <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01263925?term=alprostadil&rank=3>. (6.8.2014)