

Uloga epigenetski usmjerene terapije u liječenju difuznog B-velikostaničnog limfoma

Kalac, Matko

Doctoral thesis / Disertacija

2010

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:865015>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Matko Kalac, dr.med.

**Uloga epigenetski usmjerene terapije u
liječenju difuznog B-velikostaničnog
limfoma**

DISERTACIJA

Zagreb, 2010

Disertacija je izrađena u Herbert Irving Comprehensive Cancer Centru Sveučilišta Columbia



Saint Nicholas Avenue 1130
New York, NY, 10032
Sjedinjene Američke Države

Mentor:

prof.dr. Branimir Jakšić

Voditelji rada:

prof. dr. Branimir Jakšić

Owen A. O'Connor, MD, PhD

Ljudi bez kojih ova teza ne bi bila napisana:

1. prof. dr. Branimir Jakšić, najljepša hvala za punu podršku u svim mojim „pothvatima“
2. Doc. (soon to be prof.) dr. Radovan Vrhovac, you rock!
3. profesori Owen O'Connor i Benjamin Tycko
4. Anna Mrzljak, Saša Trbović, prof. dr. Slobodanka Ostojić-Kolonić
5. prof. dr. Zdenko Kovač
5. Nathalie Aulner, Yukiko Kitagawa, Sharifah Haron, Marianna de Julio, Qiong Shen, Enrica Marchi, Luigi Scotto, Danielle Bongero, Govind Bhagat i Venkatraman E. Seshan
6. mama, tata, Mislav, Martina i Domagoj
7. last, but far from least Koshy

Hvala!

Sadržaj prema poglavljima

1. Uvod.....	1
1.1. Biološka osnova epigenetskog pristupa u potencijalnom liječenju difuznog B-velikostaničnog limfoma.....	1
1.1.1. Acetilacija i deacetilacija histona.....	1
1.1.2. Metilacija DNK.....	5
1.1.3. Poveznica između acetilacije histona i metilacije DNK.....	9
1.2. Difuzni B-velikostanični limfom i epigenetske promjene.....	10
1.3. Epigenetski orijentirana terapija.....	11
1.3.1. Inhibitori histonske deacetilaze (HDACi).....	11
1.3.2. Hipometilirajuće tvari.....	13
1.4. Pistup farmakologije i biologije sustava u istraživanju novih lijekova.....	15
2. Cilj disertacije.....	17
3. Hipoteze.....	18
4. Materijali i metode.....	19
4.1. Stanične linije.....	19
4.2. Istraživani lijekovi i molekule.....	19
4.3. Citotoksični testovi.....	20
4.4. Analiza apoptoze putem protočne citometrije.....	21
4.5. Analiza staničnog ciklusa.....	21
4.6. Aktivacija kaspaznog sustava.....	22
4.7. Izolacija bjelančevina za Western blotting.....	22
4.8. Western blotting.....	23
4.9. Imunofluorescencija.....	23
4.10. Životinjski modeli.....	24

4.11. Izolacija DNK.....	25
4.12. Analiza metilacije genoma.....	25
4.13. Izolacija RNK.....	27
4.14. Profiliranje genske ekspresije.....	28
4.15. Statistička analiza.....	28
4.16. Humani materijal.....	29
5. Rezultati.....	32
5.1. Inhibitori histonske deacetilaze i hipometilirajuće tvari u kombinaciji polučuju sinergistički učinak u zaustavljanju rasta i indukciji apoptoze stanica difuznog B-velikostaničnog limfoma u <i>in vitro</i> uvjetima.....	32
5.1.1. Određivanje vrijednosti polovice maksimalne inhibitorne koncentracije (IC50) u staničnim linijama DLBCL.....	32
5.1.2. Analiza apoptoze inducirane HDACi i hipometilirajućim tvarima metodom protočne citometrije u staničnim linijama difuznog B-velikostaničnog limfoma....	36
5.1.3. Određivanje sinergističkog učinka kombinacije inhibitora histonske deacetilaze i decitabina u <i>in vitro</i> uvjetima.....	39
5.1.4. Aktivacija kaspaznog sustava u limfomskim stanicama.....	45
5.1.5. Analiza staničnog ciklusa.....	49
5.1.6. Učinak kombinacije panobinostata i decitabina na acetilaciju histona.....	50
5.1.7. Utjecaj redoslijeda primjene panobinostata i decitabina na vijabilnost stanica.....	53
5.1.8. Kombinacija panobinostata i decitabina u primarnim DLBCL uzorcima....	55
5.2. Kombinacija panobinostata i decitabina u <i>in vivo</i> pokusu s ljudskim limfomskim ksenograftom u SCID beige miševima.....	56
5.3. Analiza metilacije genoma u limfomskim stanicama tretiranim inhibitorom histonske deacetilaze i hipometilirajućom tvari.....	62
5.4. Profiliranje genske ekspresije u limfomskim stanicama tretiranim inhibitorom histonske deacetilaze i hipometilirajućom tvari – korelacija prema metilaciji genoma.....	68
6. Rasprava.....	71
7. Zaključci.....	79

8. Kratki sadržaj disertacije.....	80
9. The role of epigenetically oriented therapy in the treatment of diffuse large B-cell lymphoma – Contribution in developing systems pharmacology and biology.....	81
10. Citirana literatura.....	82
11. Biografija.....	88

Popis kratica:

ABC DLBCL – eng. activated B-cell like diffuse large B-cell lymphoma, difuzni B-velikostanični limfom porijekla aktiviranih B-stanica

AML – akutna mijeloična leukemija

AUC – eng. area under the curve, površina ispod krivulje

AV – aktualna vrijednost uzorka pri ispitivanju sinergije dvaju lijekova

bp – eng. base pair, bazni par

BRCA1 – eng. breast cancer 1 gen

CD – eng. cluster of differentiation, stanični diferencijacijski antigen

GCB DLBCL – eng. germinal center B-like diffuse large B-cell lymphoma, difuzni B-velikostanični limfom porijekla germinalnog centra

CpG – citozin-gvanin dinukleotid vezan fosfodieterskom vezom

DLBCL – eng. diffuse large B-cell lymphoma, difuzni B-velikostanični limfom

DMSO - dimetilsulfoksid

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

DNMT – DNA metiltransferaza

eng. – engleski

FCS – eng. fetal calf serum – teleći fetalni serum

FDA – eng. Food and Drug Administration, američka agencija za hranu i lijekove

HAT – eng. histone acetyltransferase, histonska acetiltransferaza

HDAC – eng. histone deacetylase, histonska deacetilaza

HDACi – eng. histone deacetylase inhibitor, inhibitor histonske deacetilaze

HSP90 - eng. heat shock protein 90, stresna bjelančevina 90

kb – kilo-bazni par tj. 1000 bp

kDa - kilodalton

m – metar

M - mol

MBD (1, 2, i 3), MeCP – eng. Methyl-CpG binding domain protein, methyl-CpG binding protein, bjelančevine sa svojstvom vezivanja za metilirani CpG otok

MDS – mijelodisplastični sindrom

MGMT – O-6-metilgvanin-DNK metiltransferaza

MLH1 – MutL homolog 1

Mr – molekularna masa

MTD – maksimalna tolerabilna doza

NAD⁺ - nikotinamid adenin dinukleotid

NHL – Non-Hodgkinov limfom

OS – eng. overall survival, sveukupno preživljenje

OV – očekivana vrijednost uzorka pri ispitivanju sinergije dvaju lijekova

PBS – eng. phosphate buffered saline – puferirana otopina fosfatnih soli

PCR – eng. polymerase chain reaction – lančana reakcija polimeraze

PI – eng. propidium iodide – propidij-jod

Rb1 – retinoblastom 1 gen

rcf – eng. relative centrifugal force – relativna centrifugalna sila

RNK – ribonukleinska kiselina

RRR – eng. relative risk ratio – omjer relativnog rizika

SAHA – suberoilanolid hidroksamična kiselina, vorinostat

SAM – S-adenozil metionin

SCID – eng. severe combined immunodeficiency – teška kombinirana imunodeficijencija

SIRT – sirtuin, III. razred histonskih deacetilaza

TRAIL – eng – tumour necrosis factor apoptosis inducing ligand – induktor apoptoze vezan za čimbenik tumorske nekroze

TSA – trihostatin A

1. UVOD

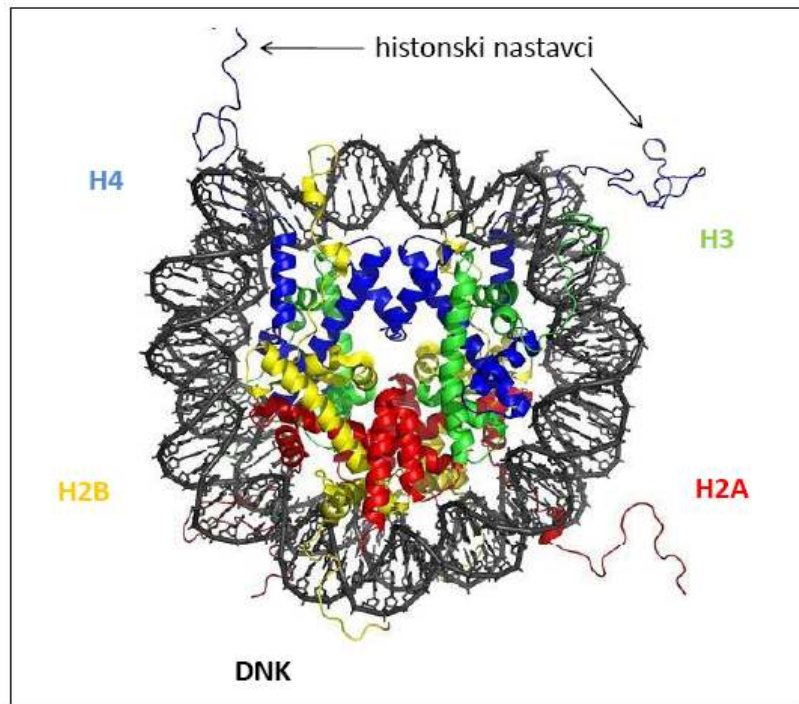
1.1. Biološka osnova epigenetskog pristupa u potencijalnom liječenju difuznog B-velikostaničnog limfoma

1.1.1. Acetilacija i deacetilacija histona

Prilikom grafičkog prikazivanja DNK molekule u literaturi se koriste pojednostavljeni prikazi koji nam pomažu u lakšem razumijevanju građe i uloge DNK. Jedan od takovih je pravocrtni, gdje je DNK molekula prikazana kao linearan lanac sastavljen od 4 različite nukleotidne baze. U stvarnosti je DNK složena molekula vezana za brojne bjelančevine u trodimenzionalnu strukturu koju nazivamo kromatin. Glavne strukturalne bjelančevine oko kojih je u svakoj eukariotskoj stanici omotano otprilike 2m DNK jesu histoni. Histoni su bjelančevine male molekularne mase koje sadrže relativno veliku količinu pozitivno nabijenih aminokiselinskih ostataka, ponajprije lizina i arginina. Ukupno postoji 5 tipova histona: H1, H2A, H2B, H3 i H4, a histonski oktamer (po par od njih četiri - H2A, H2B, H3 i H4) s pripadajućom DNK duljine ~150 bp tvore osnovni dio kromatina – nukleosom (Slika 1). Histon H1 vezan za ~200 bp DNK služi kao poveziivač dvaju nukleosoma tvoreći drugi pojednostavljeni prikaz DNK poznat pod imenom “perle na koncu”. Ovaj prikaz ne uključuje brojne druge bjelačevine odgovorne za konačno zavijanje osnovnog vlakna DNK s histonima u tzv. DNK superzavojnici¹.

Trodimenzionalnost DNK molekule uvjetuje činjenicu da enzimatske modifikacije histona i ostalih bjelančevina oko kojih je DNK omotana mogu promijeniti strukturu kromatina i time bitno utjecati na ekspresiju gena. Histonske bjelačevine su naime podložne brojnim posttranslacijskim enzimatskim reakcijama koje uključuju acetilaciju (lizinski aminokiselinski ostatak), metilaciju (lizin, arginin i glutamin), fosforilaciju (histidin, serin i treonin), sumoilaciju (glutamin), ubikvitinaciju (glutamin) i ADP ribozilaciju (glutamin)². Sve od navedenih posttranslacijskih

modifikacija mogu imati utjecaj na ekspresiju gena modificirajući trodimenzionalnu strukturu kromatina, a najistraživanija i vjerovatno najvažnija od svih je acetilacija histona.



Slika 1. Trodimenzionalni prikaz nukleosoma: Oko oktamera histonskih bjelančevina (po par H2A, H2B, H3 i H4) omotano je ~150 bp DNK, tvoreći osnovnu jedinicu kromatina – nukleosom. Iz nukleosoma se projiciraju histonski nastavci s lizinskim aminokiselinskim ostacima podložnima posttranslacijskim enzimatskim promjenama.

Acetilacija histona se zbiva na histonskim nastavcima bogatim lizinskim aminokiselinskim ostacima (Slika 1) i regulirana je dvama skupinama enzima: histonskim acetiltransferazama (HAT od eng: histone acetyltransferase), koje dodaju acetilne grupe i histonskim deacetilazama (HDAC od eng: histone deacetylase) koje te iste acetilne grupe skidaju s histonskih nastavaka³. Pozitivno nabijeni lizinski aminokiselinski ostatci bez acetilnih grupa snažno vežu negativno nabijenu DNK kondenzirajući kromatin i čineći ga “zatvorenim” za transkripcijske čimbenike. Po dodavanju acetilnih grupa neutralizira se histonski pozitivni naboj

što u konačnici odmiče histone od DNK, čineći kromatin "otvorenim" za početak transkripcije. Važnost procesâ acetilacije i deacetilacije je dokazana u brojnim modelima tumorski preobraženih stanica gdje se modifikacijom acetilacije histona i posljedičnom promjenom genske ekspresije utječe na bitne stanične procese uključujući i sâmo preživljenje stanice. Smatra se da je u zloćudno preobraženim stanicama poremećena ravnoteža između acetilacije i deacetilacije histona (Slika 2) što dovodi do smanjene acetilacije histonskih nastavaka u odnosu na normalne stanice, zatvaranja kromatina i potencijalnog smanjenja sinteze bjelančevina s tumor supresorskim učinkom⁴.

HAT i HDAC enzimi se mogu podijeliti prema svojoj rasprostranjenosti po tkivima i specifičnosti za proteinski supstrat u ljudskom organizmu. Tri obitelji histonskih acetiltransferaza su navedene u Tablici 1.

Obitelj histonskih acetiltransferaza (HAT)		
GNAT:	MYST:	p300:
1. Gcn5	1. Tip60	1. CBP
2. p/CAF	2. MOF	2. p300
	3. Sas3	3. Rtt109
	4. MOZ	

Tablica 1. Podjela histonskih acetiltransferaza po obiteljima.

Do danas je u ljudskim stanicama otkriveno 18 različitih HDAC enzima, koji su podijeljeni u 4 razreda prema homologiji s HDAC enzimima kvasaca, organizmima u kojima su po prvi puta otkriveni. Enzimi iz I. (HDAC 1, -2, -3 i -8, molekularna masa 42-55 kDa), II. (HDAC 4, -5, -6, -7, -9, -10, Mr 120-130 kDa) i IV. razreda (HDAC 11, svrstan u poseban razred zbog posjedovanja katalitičkih mjesta karakterističnih i za I. i za II. razred, Mr 39 kDa) zahtijevaju atom cinka za svoju aktivnost (Tablica 2). Za razliku od ova tri razreda, sedam enzima iz III. razreda, nazvani sirtuini (SIRT 1-7) zahtijevaju NAD⁺ (nikotinamid adenin dinukleotid) za svoju aktivnost. Razlike

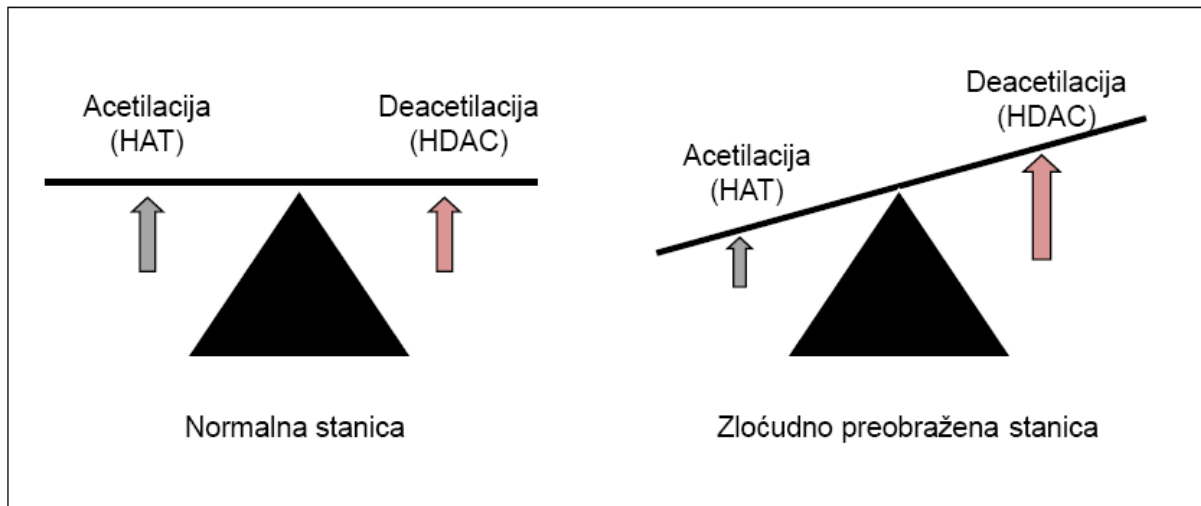
među razredima su bitne s farmakološkog stajališta otvarajući put sintetiziranju razredno specifičnih molekula za njihovu inhibiciju.

enzim	razred	lokalizacija	Mr
HDAC 1	I	prisutan u jezgri, rasprostranjen u svim tkivima	55.9 kDa
HDAC 2	I	u kompleksu s HDAC 1 rasprostranjen u svim tkivima	60 kDa
HDAC 3	I	prisutan u jezgri, rasprostranjen u svim tkivima	49.7 kDa
HDAC 4	II	prisutan u jezgri i citoplazmi	140 kDa
HDAC 5	II	sposoban prelaziti iz jezgre u citoplazmu	51 kDa
HDAC 6	II	sposoban prelaziti iz jezgre u citoplazmu	159 kDa
HDAC 7	II	izrazito visoka koncentracija u CD4+CD8+ timocitima, sposoban prelaziti iz jezgre u citoplazmu	65 kDa
HDAC 8	I	prisutan u jezgri, rasprostranjen u svim tkivima	46.4 kDa
HDAC 9	II	sposoban prelaziti iz jezgre u citoplazmu	160 kDa
HDAC 10	II	sposoban prelaziti iz jezgre u citoplazmu	71.4 kDa
HDAC 11	IV	u katalitičkom mjestu enzima sadrži aminokiselinske ostatke specifične za I. i II. HDAC razred	39 kDa

Tablica 2. Podjela histonskih deacetilaza prema razredima s karakteristikama pojedinog enzima.

Zbog navedene bitne uloge u regulaciji stanične transkripcije procesi deacetilacije i acetilacije histona u normalnoj stanici čine osnovu epigenetske kontrole transkripcije tzv.

“epigenetski kod” (Slika 2), gdje pojam epigenetski označuje zbir mitotski ili/i mejotski naslijednih promjena u funkciji genâ koje se ne mogu objasniti promjenom u slijedu baza DNK, dakle bez mutacija, delecija ili amplifikacija.

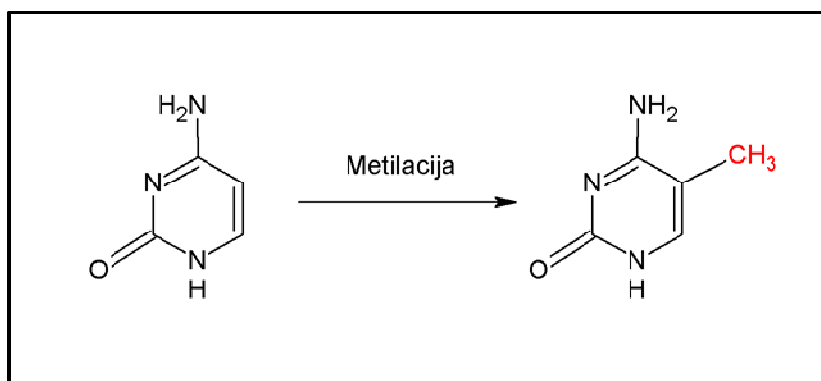


Slika 2. Kontrola nad tzv. “epigenetskim kodom” – acetilacija i deacetilacija, procesi vođeni dvama grupama enzima: histonskim acetiltransferazama (HAT) i histonskim deacetilazama (HDAC), u normalnoj stanici su u ravnoteži što drži transkripciju pod kontrolom. U zloćudno preobraženoj stanici prevladava proces deacetilacije dovodeći do kondenzacije i zatvaranja kromatina transkripcijskim čimbenicima što u konačnici snižava količinu bjelančevina proizvoda tumor supresor gena.

1.1.2. Metilacija DNK

Osim deacetilacije, drugi najistraživaniji epigenetski proces u zloćudnoj preobrazbi stanice je metilacija DNK. Metilacija DNK se zbiva dodatkom metilne skupine s univerzalnog staničnog metil donora S-adenozil metionina (SAM) 5' atomu ugljika u prstenu citozinske nukleotidne baze koji rezultira nastankom 5-metilcitozina⁵ (Slika 3). Citozinska baza u slijedu

DNK može biti metilirana samo ako je slijedi gvanin tvoreći CG dimer baza, nazvan CpG dinukleotidom, gdje p označava fosfodietersku vezu među dvjema bazama⁵. Metilne skupine vezane za citozin se projiciraju u glavni žlijeb DNK i sprječavaju vezivanje inicijacijskih čimbenika transkripcije učinkovito je pritom blokirajući (Slika 4). U ljudskim somatskim stanicama, 5-metilcitozin predstavlja otprilike 1% DNK baza, zahvaćajući 70-80% svih CpG dinukleotida u genomu⁶.



Slika 3. DNK metilacija – proces metilacije se zbiva na mjestu 5' atoma ugljika u molekuli citozina tvoreći 5-metilcitozin.

Iako se CpG dinukleotidi (metilirani i nemetilirani) mogu naći u relativno niskoj frekvenciji posvuda u ljudskom genomu, frekvencija im značajno raste u kratkim odsječcima DNK nazvanima po gustoći CpG dinukleotida tzv. CpG otocima. CpG otoci se mogu definirati kao odsječci DNK dulji od 0.5 kb, gdje suma gvanina i citozina iznosi više od 55% ukupnog broja baza, a omjer opaženog citozina u navedenom odsječku DNK vezanog fosfodieterskom vezom za gvanin u odnosu na prosječnu gustoću navedenog dimera u čitavom genomu iznosi >0.65 ⁷. Zanimljivo obilježje CpG otoka u kralješnjaka jest da se tipično mogu naći u područjima 5' kraja ljudskih gena, odnosno u područjima genskih promotora i ovisno o stanju metiliranosti imaju važnu ulogu kao regulatori genske transkripcije. Otprilike 60% ljudskih gena ima u području svojih genskih promotora CpG otoke i za razliku od većine CpG dinukleotida drugdje u genomu, CpG dinukleotidi u području CpG otoka većinom nisu metilirani u normalnim ljudskim stanicama⁸.

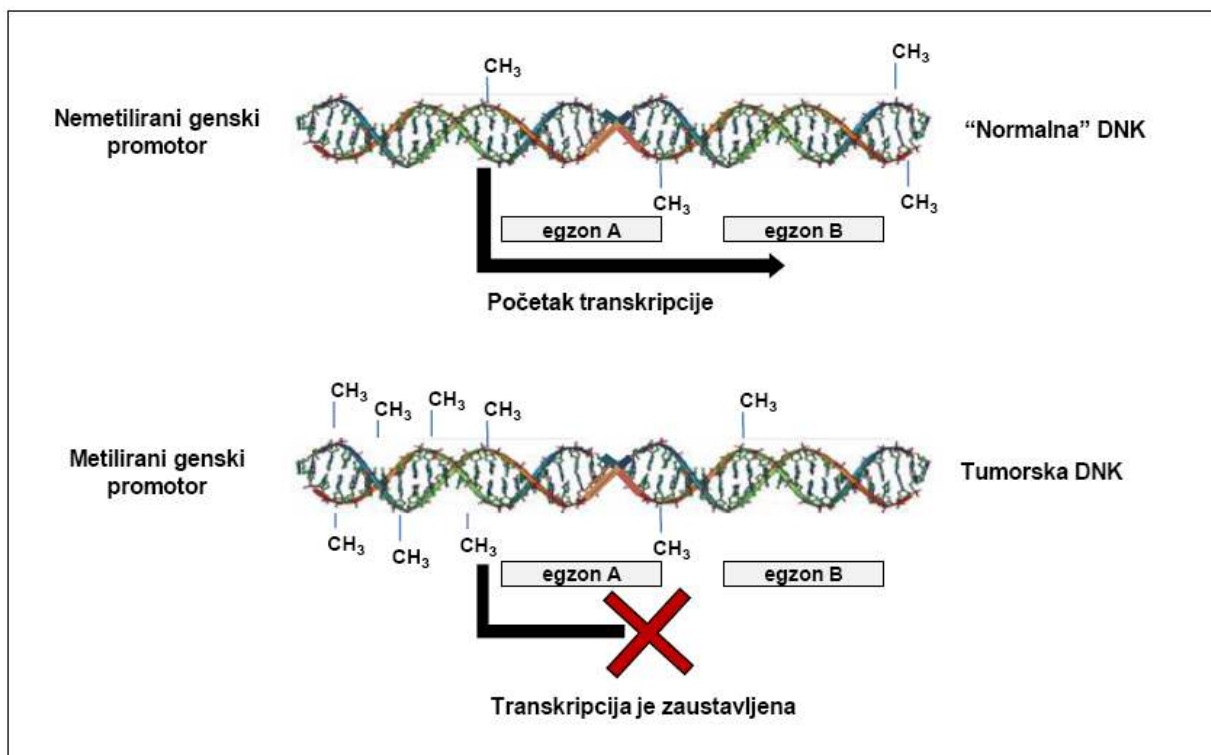
Sama DNK metilacija na CpG otocima je normalan “fiziološki” proces kojim se održava transkripcijsko zatišje u neekspimiranim ili nekodirajućim područjima genoma. Metilacijom se, naime, polučuje važno utišavanje gena prilikom razvoja tkiva i organa, inaktivacije jednog X kromosoma u žena⁹, genomskog upisa (imprinting) te inhibicije ekspresije intragenomskih parazitskih elementata poput *alu* (*P. vivax*) ili *line* (retrovirus) sekvenci¹⁰.

Opaženo je da je ukupna količina CpG dimera u malignim stanicama metilirana u manjem postotku nego u normalnim stanicama. Neoplastične stanice su globalno dakle hipometilirane, uz jednu bitnu iznimku, a to su CpG otoci koji su u malignim stanicama hipermetilirani u odnosu na normalne. Već je navedeno da je jedan od mehanizama kojim metilacija polučuje inhibiciju transkripcije izravan i mehanički gdje se metilna skupina projicira u glavni žlijeb DNK i blokira vezivanje inicijacijskih čimbenika koji imaju afinitet za CpG bogata područja DNK. Drugi mehanizam kojim se blokira inicijacija transkripcije je sposobnost metiliranih CpG otoka u privlačenju bjelančevina odgovornih za inhibiciju transkripcije. Do danas je otkriveno njih 5: MBD1, MBD2, MBD3, MeCP2 i Kaiso^{5,11,12}.

Za sam proces metilacije citozina je odgovorna obitelj enzima zvana DNK metiltransferaze (DNMT), koja se u sisavaca sastoji od 3 enzima. DNMT1 je enzim odgovoran za održavanje metilacijskog statusa oba lanca DNK nakon replikacije stanica tj. za hemimetilaciju DNK, a DNMT3a i DNMT3b su enzimi odgovorni za *de novo* metilaciju u području dotad nemetilirane DNK¹³.

Danas se smatra da su epigenetske promjene (uključujući deacetilaciju histona i metilaciju DNK) odgovorne za nastanak i razvoj malignih promjena barem u jednakoj mjeri kao i mutacije¹⁴. Klasična Knudsonova hipoteza kaže da je za tumorigenezu potreban gubitak oba alela određenog gena sa svojstvom tumor supresora¹⁵. Za utišavanje oba alela potencijalnog tumor supresor gena može biti odgovorna bilo koja kombinacija genetske i epigenetske promjene¹⁶, pri čemu epigenetske promjene gena mogu biti odgovorne za gubitak drugog alela umjesto genetskih. Hipermetilacija promotora gena kao epigenetski mehanizam utišavanja tumor supresora (Slika 4) dokazana je u brojnim solidnim (BRCA1 u karcinomu dojke, RB1 u retinoblastomu) i hematološkim novotvorinama (p15^{INK4A} u akutnoj mijeloičnoj leukemiji i mijelodisplastičkom sindromu te p16^{INK4A} u limfomu)⁸, a poznati su i primjeri gena odgovornih za popravak DNK utišanih metilacijom njihovih genskih promotora u kolorektalnom karcinomu (MutL homolog 1 - MLH1)¹⁷ i u limfomu (O-6-metilgvanin-DNK-metiltransferaza - MGMT)¹⁸.

Metilacija također može potencirati učinak egzogenih karcinogena, kao u primjeru benzo(a)piren diola iz dima cigareta koji se učestalije vezuje za gvanin u sklopu metiliranog CpG dimera nego za ostale gvaninske baze, što olakšava mutaciju gvanina u timin¹⁹. Metilna skupina također mijenja valnu duljinu apsorpcije ultraljubičaste svjetlosti za citozinsku bazu, što olakšava stvaranje pirimidinskih dimera (CC-TT) u DNK stanica epidermisa i vodi povećanoj incidenciji mutacija tumor supresor gena TP53²⁰.



Slika 4. Utjecaj metilacije genskog promotora na inicijaciju transkripcije. Na mjestu nemetiliranog genskog promotora omogućena je transkripcija RNK. Metilacijom CpG otoka u području genskog promotora metilne skupine se projiciraju u glavni žlijeb DNK čime se inhibira vezivanje transkripcijskih čimbenika te je transkripcija DNK zaustavljena.

1.1.3. Poveznica između acetilacije histona i metilacije DNK

Ranije je navedena grupa bjelančevina s funkcijom represora transkripcije i afinitetom za hipermetilirane CpG otoke (MBD1, MBD2, MBD3, MeCP2 i Kaiso). Dokazano je da ove bjelančevine kada su vezane za DNK tvore komplekse s drugim bjelančevinama, između ostalog histonskim deacetilazama²¹. Histonske deacetilaze u ovom kompleksu lokalizirano deacetiliraju lizinske ostatke na histonima i još više zatvaraju kromatin transkripcijskim faktorima i histonskim acetiltransferazama modificirajući ravnotežu kromatina posredovanu ovim dvama grupama enzima¹⁶. Histoni su osim acetilaciji i deacetilaciji podložni i metilaciji posredovanoj brojnim metiltransferazama²², a ovisno o aminokiselinskom ostatku koji biva metiliran kromatin postaje transkripcijski aktivan ili inaktivan. Trimetilacija lizinskih aminokiselinskih ostataka na poziciji 9, 27 i 39 N kraja histona H3 i lizina na poziciji 20 na histonu H4 dovodi do inhibicije transkripcije. Trimetilacija lizina na poziciji 4 i 79 histona H3 s druge strane dovodi do otvaranja kromatina i inicijacije transkripcije²³.

Bitno u svemu dosad navedenome o ulozi epigenetskih promjena DNK u nastanku malignih stanica jest da su one, za razliku od genetskih promjena (mutacije, delecije, amplifikacije, translokacije), potencijalno reverzibilne te da bi reaktivacija epigenetski utišanog tumor supresor gena dovela do terminalne diferencijacije zloćudne stanice.

1.2. Difuzni B-velikostanični limfom i epigenetske promjene

Difuzni B-velikostanični limfom (DLBCL od eng. diffuse large B-cell lymphoma) predstavlja ukupno 30-40% svih limfoma i danas u svijetu predstavlja najčešćiji oblik limfoidne neoplazme²⁴. Naziv difuzni dolazi od načina na koji maligne stanice u sklopu ove bolesti rastu i zamjenjuju normalnu arhitekturu limfnog čvora ili ektranodalnog tkiva. Otprilike 40% svih DLBCL nastaje u ektranodalnom tkivu, najčešće u probavnom traktu, koži, kostima, štitnoj žlijezdi, medijastinumu ili testisima²⁵.

Terapija DLBCL danas podrazumijeva imunokemoterapiju. Standardni kemoterapijski protokol CHOP (ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin i prednizon) upotpunjen dodatkom monoklalnog IgG1 protutijela usmjerenog protiv CD20 molekule na površini stanice (rituksimab) osigurava izlječenje u oko 55-60% bolesnika, dok ostali redovito progrediraju²⁶.

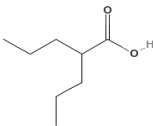
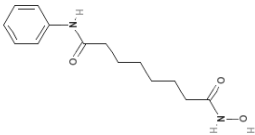
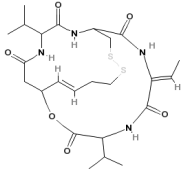
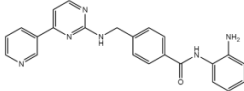
Ovi podaci predstavljaju velike poteškoće u kliničkom pristupu bolesnicima s naoko jednakom dijagnozom, ali vrlo različitim kliničkim ishodom. Objašnjenje se može naći u činjenici da je DLBCL zapravo heterogena skupina bolesti. Alizadeh i sur. su analizom genske ekspresije malignih stanica u bolesnika s DLBCL dokazali postojanje barem dva posebna entiteta, koje su prema porijeklu stanica nazvali DLBCL porijekla germinalnog centra (GCB od eng. germinal center B-cell like) i DLBCL porijekla aktiviranih B-stanica (ABC od eng. activated B-cell like). Analizirajući ukupno preživljenje dokazali su da bolesnici s difuznim B-velikostaničnim limfomom porijekla germinalnog centra imaju značajno bolje ukupno preživljenje od bolesnika s limfomom porijekla aktiviranih B-stanica²⁷. Postavlja se pitanje optimalne terapije u grupi bolesnika u kojoj se standardnom imunokemoterapijom ne uspije polučiti izlječenje, gdje većinu predstavljaju oni s limfomom porijekla aktiviranih B-limfocita²⁸. Veliki su napori u pronalasku novog oblika terapije (novi lijekovi, nove kombinacije postojećih lijekova) koji bi djelovao i u ovih bolesnika i cilj ovoga rada je doprinijeti ukupnome znanju o novim terapijskim opcijama, prvenstveno epigenetski usmjerenim u bolesnika s difuznim B-velikostaničnim limfomom.

Epigenetske promjene u DLBCL i ostalim neoplazmama su danas u žarištu znanstvenog istraživanja s obzirom na otkrića kojim je nedvojbeno dokazana uloga epigenetskih procesa u nastanku neoplazmi i podatke da se lijekovima koji djeluju na epigenetske ciljeve može polučiti terminalna diferencijacija malignih stanica. Hipermetilacija genskih promotora u DLBCL, uključujući gene odgovorne za kontrolu staničnog ciklusa, angiogeneze i apoptoze, dokazana je u brojnim *in vitro* i *in vivo*²⁹ istraživanjima, a spoznaje o učinkovitosti epigenetski usmjerene

terapije iz prvih kliničkih istraživanja lijekova s inhibitornim djelovanjem na HDAC enzime uključuju i bolesnike s DLBCL³⁰.

1.3. Epigenetski orijentirana terapija

1.3.1. Inhibitori histonske deacetilaze (HDACi)

kemijska skupina	predstavnik skupine	kemijska struktura	ostali predstavnici
alifatske kiseline	valproična kiselina		butirična kiselina
hidroksamati	vorinostat (suberoilanolid hidroksamična kiselina, SAHA)		panobinostat (LBH589), belinostat
ciklički peptidi	romidepsin (depsipeptid)		trapoksini, diheteropeptin
benzamidi	MGCD0103		MS-275

Tablica 3. Najpoznatiji predstavnici kemijskih grupa inhibitorâ histonske deacetilaze.

Popis lijekova s HDACi (od eng. histone deacetylase inhibitor – inhibitor histonske deacetilaze) djelovanjem je sve veći i do danas je poznato preko 20 molekula s HDACi djelovanjem, a koje su prema kemijskoj strukturi podijeljene u 4 grupe. Njihovi najpoznatiji predstavnici su navedeni u Tablici 3. Inhibicija aktivnosti histonske deacetilaze je kao mehanizam sposoban za indukciju terminalne diferencijacije malignih stanica otkriven još u 70im godinama prošlog stoljeća kada su Riggs i sur. otkrili da butirična kiselina ima sposobnost inhibicije sinteze DNK i stanične proliferacije u eritroleukemijskim staničnim linijama³¹. Prva klinička ispitivanja s HDACi u bolesnika s novotvorinama su provedena s kemijskim molekulama koje imaju slabo HDACi djelovanje kao što su valproat ili butirat³². Kasnije su sintetizirani potentniji HDACi iz skupine hidroksamata kao što su trihostatin A (TSA) i suberoilanična kiselina (SAHA, vorinostat)³³.

Kristalografskom analizom interakcije TSA i HDAC enzima je razjašnjen mehanizam inhibitornog učinka hidroksamata na HDAC enzime, pri čemu se TSA vezuje za atom cinka u aktivnom središtu enzima³⁴. U prvom kliničkom ispitivanju u različitim hematološkim i solidnim novotvorinama vorinostat je pokazao obećavajuću aktivnost u bolesnika s T-staničnim kožnim i Hodgkinovim limfomom³⁵. Uslijedila su daljnja ispitivanja od strane Duvic i sur. i Olsen i sur. koja su dovela do odobrenja za korištenje vorinostata u liječenju T-staničnih kožnih limfoma od strane američke agencije za hranu i lijekove (FDA)^{36,37}. HDACi koji su uz vorinostat najviše napredovali u kliničkim ispitivanjima u liječenju ove bolesti su panobinostat (LBH589) i belinostat iz grupe hidroksamata, romidepsin (depsipeptid) iz grupe cikličkih peptida te MS-275 i MGCD0103 iz benzamidne skupine, a romidepsin se u studenom 2009. pridružio vorinostatu odobrenjem FDA za liječenje T-staničnih kožnih limfoma.

Mehanizam djelovanja HDACi je mnogostruk i uključuje promjenu u genskoj ekspresiji³⁸, zastoj malignih stanica u G₁ (pri nižoj dozi HDACi) i G₂/M (pri višoj dozi HDACi) fazi staničnog ciklusa³⁹, aktivaciju unutrašnjeg⁴⁰ i vanjskog puta⁴¹ aktivacije kaspaznog sustava te povišenjem razine slobodnih kisikovih radikala u stanici⁴². Važan je i mehanizam djelovanja putem ne-histonskih bjelančevina poput učinka na α -tubulin, Hsp90 i Bcl-6. U određenim malignim bolestima je dokazana prekomjerna ekspresija HDAC6, enzima koji veže α -tubulin i time povećava motilitet malignih stanica što u konačnici olakšava metastaziranje⁴³. HDACi inhibicijom HDAC6 dovode do snižavanja razine α -tubulina u stanici. Hsp90 (eng. heat shock protein 90, stresna bjelančevina 90) je jedna od tzv. bjelančevina pratilica za brojne čimbenike koji omogućavaju preživljenje i rast maligne stanice kao što su: C-Raf, Bcr-Abl, Flt3 i Akt. HDACi snižavanjem razine Hsp90 dovode do olakšane poliubikvitinacije navedenih čimbenika

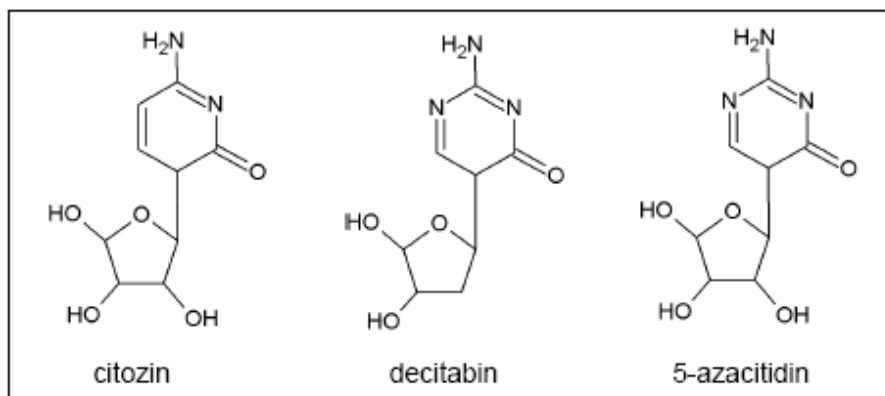
rasta i njihovu razgradnju proteosomalnim putem⁴⁴. U velikom broju limfoma, pogotovo u GCB podskupini DLBCL, bjelančevina Bcl-6 je konstitutivno izražena i služi kao transkripcijski represor gena bitnih u aktivaciji limfocita, njihovoj diobi i apoptozi, prvenstveno p53. Acetilacijom i inaktivacijom Bcl-6 postiže se reaktivacija navedenih utišanih gena s posljedičnom inicijacijom apoptoze⁴⁵.

1.3.2. Hipometilirajuće tvari

Lijekovi s hipometilirajućim djelovanjem poput 5-azacitidina i 5-aza-2'-deoksicitidina (decitabin) su prvi put otkriveni prije više od 40 godina. Oba lijeka su analozi citozina i razvijeni su kao alternativa u kemoterapijskom liječenju tumora rezistentnih na citozin arabinozid⁴⁶. Njihova epigenetska funkcija u obliku hipometilacije genoma sa sposobnošću indukcije diferencijacije i apoptoze u malignim stanicama je otkrivena puno kasnije⁴⁷. Spoznaje o promijenjenoj razini globalne (genom) i lokalizirane (genski promotor) razine metilacije u tumorskim stanicama su otvorile vrata kliničkim ispitivanjima u solidnim tumorima. Rezultati ovih studija su pokazali donekle razočaravajuće rezultate⁴⁸. Opažena je doduše povećana incidencija remisija u bolesnika s akutnom mijeloičnom leukemijom (AML)⁴⁹, a uslijedila su i klinička ispitivanja u bolesnika s mijelodisplastičnim sindromom (MDS) u kojima je pokazana statistički značajna razlika u poboljšanju kvalitete života i incidenciji kliničkog odgovora u grupi bolesnika liječenih hipometilirajućim lijekovima⁵⁰, što je u konačnici dovelo do odobrenja 5-azacitidina i decitabina u liječenju MDS-a od strane američke agencije za hranu i lijekove⁵¹.

5-azacitidin i decitabin se razlikuju od citozina i deoksicitozina po dušikovom atomu umjesto ugljikovog na mjestu 5 u pirimidinskom prstenu (Slika 5). Decitabin se u organizmu ugrađuje u DNK te kovalentno veže DNK metiltransferaze (DNMT) što dovodi do inhibicije njihove aktivnosti tijekom slijedećih replikacija DNK. 5-azacitidin se prvenstveno inkorporira u RNK, dovodeći do inhibicije sinteze RNK i citotoksičnog efekta. Manjim dijelom se ugrađuje u DNK s jednakim učinkom na DNMT kao i decitabin. Svakom daljnom replikacijom DNK, s

obzirom da je funkcija DNMT blokirana, novosintetizirani lanac DNK je hipometiliran u odnosu na lanac koji je poslužio kao njegov kalup¹⁶.



Slika 5. Kemijska struktura molekula citozina, 5-aza-2'-deoksicitidina (decitabin) i 5-azacitidina.

S obzirom na relativno lošu učinkovitost hipometilirajućih tvari u monoterapiji malignih bolesti, s iznimkom u primjeru MDS-a, čini se da bi optimalni način iskorištenja ovih lijekova u terapijske svrhe bio putem njihove kombinacije s drugim kemoterapeuticima, a postizanjem sinergističkog učinka bi se u potpunosti optimizirao njihov terapijski potencijal. S obzirom na činjenicu da bjelančevine s funkcijom represora transkripcije i afinitetom za hipermetilirane CpG otoke (MBD1, MBD2, MBD3, MeCP2 i Kaiso) na sebe vezuju i HDAC enzime, jedna od hipotetskih kombinacija u liječenju malignih bolesti bi bila kombinacija hipometilirajućih lijekova s HDACi. Praktična potvrda djelotvornosti ove kombinacije došla je iz kliničkih istraživanja u kojima su ovi lijekovi korišteni u liječenju bolesnika s refraktornom ili relapsirajućom AML i MDS, a koja su pokazala obećavajuće rezultate u produljenju sveukupnog preživljenja (OS, eng. overall survival)^{52,53}. Kako je ranije navedeno da je limfom (uključujući i DLBCL) jedna od malignih bolesti u kojoj epigenetske promjene imaju bitnu ulogu, kombinacija ove dvije grupe lijekova (HDACi i hipometilirajuće tvari) predstavlja potencijalno efikasan način terapije, pogotovo u oblicima bolesti rezistentnim na standardnu imunokemoterapiju ili u slučaju relapsa bolesti.

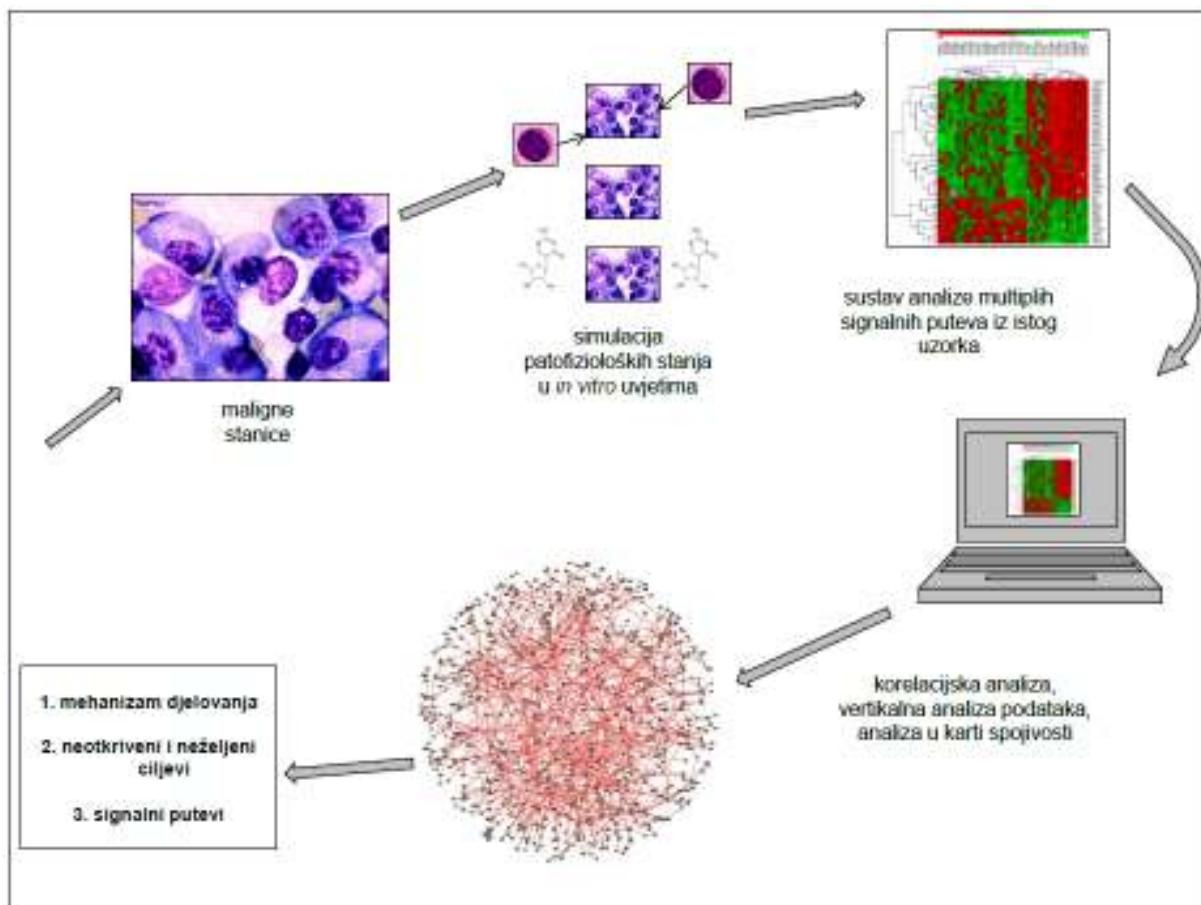
1.4. Pristup farmakologije i biologije sustava u istraživanju novih lijekova

Ranije opisan relativno visok postotak relapsa u bolesnika s DLBCL liječenih standardnom imunokemoterapijom nalaže potragu za novim lijekovima ili novim kombinacijama postojećih lijekova u liječenju ove bolesti. Jedan od pristupa istraživanju novih lijekova, predloženih u zadnje vrijeme, s praktičnim potencijalom razvoja u sklopu DLBCL je i pristup tzv. farmakologije i biologije sustava⁵⁴. Pristup biologije sustava može se okarakterizirati povratkom na biološki, a ne biokemijski usmjereno otkrivanje lijekova, odnosno istraživanje učinka potencijalnog lijeka na razini stanice i međustaničnog odnosa, a ne na razini jedne molekule. Naime, modeli ljudskih stanica se *in vitro* mogu dizajnirati tako da imitiraju mnoge aspekte jedne ili više bolesti s brojnim biokemijskim sustavima koji su međusobno u interakciji te s brojnim potencijalnim ciljevima. Isto tako, modifikacijama metoda za analizu samih pokusa mogu se dobiti odgovori na višestruka pitanja interakcije kombinacije lijekova, potencijalnih nuspojava i novih neotkrivenih ciljeva (Slika 6).

Odličan primjer biologije sustava u dizajniranju pokusa bi bilo istraživanje uloge T-limfocita u brojnim različitim upalno posredovanim odgovorima potenciranim drukčijim citokinskim milieuima. Mijenjanje citokinskog okružja u kojem stanice rastu imitira normalne i patološke odgovore u organizmu te bi uz sustav otkrivanja brojnih puteva odgovora komprimiranih u komjutorski izraženom programu doveo do cijelog niza podataka u upalnim odgovorima u autoimunim bolestima, transplantaciji, alergijskim i kardiovaskularnim bolestima. Primjer takovog istraživanja biologije sustava opisali su Kunken et al.⁵⁵ gdje se potencijalni lijek testira na širokom spektru patoloških stanja još na razini pretkliničkih istraživanja.

Farmakologija sustava se nadovezuje na ovaj *in vitro* princip upozoravajući na činjenicu da svaku dokazanu aktivnost na razini stanice treba dokazati i na razini organizma. Princip biologije sustava u modificiranju načina analize podataka dobivenim određenim pokusima omogućio bi puno šire spoznaje o potencijalnim novim ciljevima lijeka, nuspojavama i lijekovima koji bi u kombinaciji s istraživanim lijekom polučili najbolji učinak.

Analiza genske ekspresije ili metilacije genoma predstavljaju primijenjene modele farmakologije/biologije sustava^{56,57}. Obje metode koriste tehnologiju sustavnog otkrivanja promjena na razini čitavog genoma otkrivajući promjene u širokom spektru signalnih puteva i transkripcije gena, imitirajući stanje kakvo bi se moglo očekivati u organizmu. Potencijalna molekula s antineoplastičnim učinkom uzrokovala bi apoptozu malignih stanica uz inhibiciju sinteze molekula koje malignoj stanici omogućuju rezistenciju na konvencionalnu terapiju, sposobnost invazije okolnog tkiva i metastaziranje.



Slika 6. Model biologije sustava. Simulacijom različitih patofizioloških utjecaja na maligne stanice u *in vitro* uvjetima uz mogućnost analize multiplih signalnih puteva (na razini RNK ili proteina) iz tako tretiranih stanica dobivaju se vjerodostojne informacije o potencijalnom djelovanju budućeg lijeka *in vivo*. Korelacijskom analizom u karti spojitosti mogu se dobiti odgovori na pitanja o mehanizmu djelovanja novog lijeka i njegovim potencijalnim nespecifičnim i neželjenim ciljevima.

Profiliranje genske ekspresije s analizom promjena u razini transkripcije svih gena u kombinaciji s analizom metilacije genoma se može iskoristiti pri kreiranju kombinacije lijekova s kojima bi se mogao polučiti sinergistički učinak. Ovakav pristup omogućio bi kreiranje kliničkih pokusa s novim kombinacijama lijekova čiji je mehanizam djelovanja različit od standardne terapije. Ovako dizajnirana klinička istraživanja u potpunosti bi mogla zamijeniti dosadašnju praksu dodavanja jednog novog lijeka dobro poznatoj standardnoj kemoterapijskoj kombinaciji s nadom u ukupan bolji učinak.

2. CILJ DISERTACIJE

Cilj ovoga rada je iznalaženje novih kombinacija molekula s djelovanjem na epigenetskoj razini koje bi nakon analize u čitavom modelu farmakologije/biologije sustava mogle biti učinkovite u liječenju ponajprije rezistentnog i relapsirajućeg difuznog B-velikostaničnog limfoma. Analiza određenog modela principom farmakologije/biologije sustava je opsežno istraživanje koje u ovom slučaju predstavlja suradnju brojnih laboratorija u ustanovi u kojoj ja radim (Herbert Irving Comprehensive Cancer centar u sklopu Sveučilišta Columbia u New Yorku, SAD). Dio ovog istraživanja kojim sam se ja bavio predstavlja iznalaženje novih kombinacija epigenetski usmjerenih molekula s antineoplastičnim učinkom (inhibitori histonske deacetilaze – panobinostat, belinostat, vorinostat, depsipeptid i hipometilirajuće tvari – decitabin, 5-azacitidin) u *in vivo* i *in vitro* modelima difuznog B-velikostaničnog limfoma. Najučinkovitije opcije bi nakon analize u čitavom modelu farmakologije/biologije sustava predstavljale potencijanu opciju u liječenju ponajprije rezistentnog i relapsirajućeg limfoma i podlogu eventualnom kliničkom istraživanju u bolesnika s difuznim B-velikostaničnim limfomom.

3. HIPOTEZE

1. Kombinacijom inhibitora deacetilaze histona i hipometilirajućih agensa postiže se sinergistički antineoplastički učinak u *in vitro* i *in vivo* limfomskim modelima.
2. Sinergistički učinak inhibitora histonske deacetilaze i hipometilirajućeg agensa je u izravnoj ovisnosti o vremenskom trajanju izloženosti stanica lijekovima i njihovoj dozi.
3. Kombinacija inhibitora histonske deacetilaze i hipometilirajućih tvari u limfomskim stanicama dovodi do specifičnog odgovora u metiliranosti genskih promotora što rezultira promjenom ekspresije gena kojima navedeni promotor pripada. Ovaj slijed molekularno bioloških događaja nije prisutan u uzorcima tretiranim inhibitorom histonske deacetilaze ili hipometilirajućom tvari samostalno.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Stanične linije

Koristio sam slijedeće stanične linije: OCI(Ontario Cancer Institute)-Ly1 je stanična linija difuznog velikostaničnog B limfoma porijekla germinativnog centra s BCL6 mutacijom; OCI-Ly10 je stanična linija difuznog velikostaničnog B-limfoma porijekla aktiviranih B-stanica s dokazanom mutacijom BLIMP1, regulatora normalne aktivnosti tumorskog supresora TP53; Ly7 i Su-DHL6 su stanične linije difuznog velikostaničnog B limfoma porijekla germinativnog centra bez dokazanih BCL6 ili BLIMP1 mutacija ili translokacija; Riva i HBL-1 su stanične linije difuznog velikostaničnog B-limfoma porijekla aktiviranih B stanica bez dokazanih mutacija ili translokacija BCL6 i BLIMP1; Sve stanične linije su uzgajane u inkubatoru na 37° C u vlažnoj atmosferi s 5% CO₂. Ly1, ly7, ly10, Riva i HBL-1 su uzgajane u IMDM mediju (IMDM – Isocove's modified Dulbecco's medium, proizvođač: Gibco, Invitrogen, Carlsbad, SAD) koji sadrži 4 mM L-glutamina, 4500 mg/L glukoze, 1500 mg/L natrij bikarbonata i 10% fetalnog bovinog seruma (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, SAD). Su-DHL6 stanična linija je uzgajana u RPMI-1640 mediju (Roswell Park Memorial Institute, proizvođač: ATCC, Manassas, SAD) s 1 mM natrij piruvata, 2 mM L-glutamina, 4500 mg/L glukoze, 10 mM HEPES-a, 1500 mg/L natrij bikarbonata i 10% fetalnog bovinog seruma. Svježi medij je u staničnu kulturu dodavan svakih 2-3 dana kako bi stanična koncentracija bila 0.5–1.0 x10⁶/mL.

4.2. Istraživani lijekovi i molekule

U istraživanju sam koristio slijedeće molekule: LBH589 (panobinostat - Novartis, East Hanover, SAD), Mr 439.5; SAHA (suberoilanolid hidoksamična kiselina, vorinostat - Merck Rahway, SAD), Mr 264.32; Scriptaid (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), Mr 326.35; MS-275 (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), Mr 376.41; romidepsin (depsipeptid – Gloucester

Pharmaceuticals, Cambridge, SAD), Mr 540.7; PXD 101 (belinostat - Curagen, Branford, SAD), Mr 318.349; decitabin (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), Mr 228.21; 5-azacitidin (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), Mr 244.2.

4.3. Citotoksični testovi

Za sve *in vitro* testove, prebrojane stanice su bile resuspendirane tako da im gustoća bude 3×10^5 stanica/mL na pločicama s 48 jažica (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, SAD). Istraživani lijekovi i molekule su iz krutog stanja bili otopljeni u dimetil-sulfoksidu (DMSO - Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), a različite konačne koncentracije su bile pripremljene u mediju u kojem se inkubiraju same stanice tako da koncentracija DMSO ne prelazi 0.5%. Nakon inkubacije od 24, 48 i 72 sata vijabilnost stanica je određena na ViCell XR analizatoru stanične vijabilnosti (Beckman Coulter, Fullerton, SAD). Pri korištenju fluorescencije za analizu vijabilnosti, 100 μ L uzorka iz svake jažice je bilo prenešeno u pločicu s 96 jažica i tamnim dnom u koje je onda dodano 10 μ L resazurina (R&D systems, Minneapolis, SAD), redoks-osjetljive boje koja nakon redukcije u resorufin (reakcija se zbiva zasad nepoznatim mehanizmom nakon što resazurin biva dodat vijabilnim stanicama) mijenja svoje plavičasto, nefluoresceirajuće stanje u ružičasto, visoko fluoresceirajuće. Nakon inkubacije od 4 sata fluorescencija je bila zabilježena Synergy HT Multi-Detection Microplate čitačem (Biotek Instruments Inc., Winooski, SAD). Kada sam koristio luminescenciju 100 μ L uzorka iz svake jažice je bilo prenešeno u pločicu s 96 jažica i tamnim dnom u koje je onda dodano 100 μ L cell-titer Glo reagensa (Promega, Madison, SAD), pločica je stavljena na orbitalni mješač kroz dvije minute kako bi došlo do lize stanica. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi od 10 minuta Synergy HT Multi-detection Microplate čitač je luminometrijski odredio količinu ATP u svakoj jažici gdje je količina ATP-a odnosno luminiscentnog signala bila izravno proporcionalna postotku vijabilnih stanica. Svaki eksperiment je bio učinjen najmanje u triplicatu za svaku koncentraciju lijeka ili molekule i bio je ponovljen najmanje dvaput. Čitačem zabilježena numerička vrijednost za svaku tretiranu grupu je normalizirana dijeljenjem s numeričkom vrijednošću odgovarajuće kontrolne skupine kako bi se izbjegle razlike dobivene rastom stanica u kontrolnoj skupini kao funkcije vremena.

4.4. Analiza apoptoze putem protočne citometrije

Sve stanične linije koje sam koristio za istraživanje na protočnom citometru su bile inkubirane s istraživanim lijekovima ili molekulama u količini od 5×10^5 stanica/mL u vremenskom rasponu od 24, 48 i 72 sata. Za detekciju apoptoze koristio sam Yo-Pro-1 i propidij-jod (PI) (Vybrant apoptosis assay kit #4, Invitrogen, Carlsbad, SAD). Nakon inkubacije s različitim koncentracijama istraživanih lijekova ili molekula stanice su od lijekova i medija za rast bile isprane hladnim PBS-om (eng. phosphate buffered saline – puferirana otopina fosfatnih soli), centrifugirane relativnom centrifugalnom silom (eng. rcf – relative centrifugal force) od 274 g kroz 8 minuta i resuspendirane u 500 μ L PBS-a. U svaki mililitar stanične suspenzije je bio dodat 1 μ L Yo-Pro-1 boje i 1 μ L PI-a. Podaci odnosno događaji su prikupljeni na FACSCalibur protočnom citometru (BD Biosciences, San Jose, SAD) u uobičajenim FL1 i FL3 kanalima, a analiza dobivenih podataka je izvršena uz pomoć FlowJo programa (Tree Star, Ashland, SAD). Svaki eksperiment je bio ponovljen najmanje dvaput.

4.5. Analiza staničnog ciklusa

Tretirani stanični uzorci u ukupnoj količini od 1 mL sa staničnom koncentracijom od 5×10^5 /mL bili su centrifugirani silom od 274 g kroz 8 minuta, a istaloženi sloj stanica resuspendiran u 1-2 mL hladnog PBS-a. Nakon ponovljenog centrifugiranja istom silom i resuspendiranja u 0.3 mL hladnog PBS-a uslijedila je fiksacija sporim dodavanjem 0.7 mL hladnog 70%-tnog etanola pri istovremenom kovitlanju na vorteks aparatu (Fisher Scientific, Pittsburg, SAD). Inkubacija na ledu je trajala 1 sat te su uzorci ponovno centrifugirani, a istaloženi sloj stanica resuspendiran u 250 μ L PBS-a koji je sadržavao 5 μ L RNaze A (Invitrogen, Carlsbad, SAD) u koncentraciji od 10 mg/mL. Nakon inkubacije na 37° C tijekom 1 sata staničnoj otopini je bilo dodato 10 μ L propidij-joda koncentracije 10 mg/mL. Podaci odnosno događaji su prikupljeni na FACSCalibur protočnom citometru (BD Biosciences, San Jose, SAD) u FL2-A kanalu, a analiza dobivenih podataka je izvršena uz pomoć FlowJo programa (Tree Star, Ashland, SAD). Svaki eksperiment je bio ponovljen najmanje dvaput.

4.6. Aktivacija kaspaznog sustava

Za aktivaciju kaspaznog sustava i detekciju apoptoze koristio sam citometrijsko dokazivanje aktivnosti efektorske kaspaze 3. Nakon inkubacije 1×10^6 stanica/mL s istraživanim lijekom, 300 μ L uzorka je prenijeto u Eppendorf epruvete i pomiješano s FITC-DEVD-FMK (BioVision Research Products, Mountain View, SAD), tvari koja ireverzibilno veže aktiviranu kaspazu 3 svojom DEVD aminokiselinskom sekvencom (Asp-Val-Glu-Asp), a obilježena je fluorescein izotiocijanatom (FITC). FITC je fluoresceirajuća boja s ekscitacijskom valnom duljinom od 495 nm, a emisijskom od 521 nm. U pozitivni kontrolni uzorak je uz istaživani lijek dodat inhibitor aktivacije kaspaznog sustava Z-VAD-FMK (BioVision Research Products, Mountain View, SAD). Nakon inkubacije od jednog sata na 37° C u inkubatoru s 5% CO_2 uzorci su centrifugirani silom od 800 g kroz 5 minuta i resuspendirani u 500 μ L pufera za pranje (BioVision Research Products, Mountain View, SAD). Nakon ponovljenog centrifugiranja i resuspenzije stanica u 300 μ L pufera za pranje kvantifikacija apsolutnog broja događaja odnosno apoptotičkih stanica u kojima je došlo do apoptoze posredovane aktivacijom kaspaznog sustava je učinjena na FACSCalibur protočnom citometru (BD Biosciences, San Jose, SAD) u FL1 kanalu. Analiza dobivenih podataka je izvršena uz pomoć FlowJo programa (Tree Star, Ashland, SAD).

4.7. Izolacija bjelančevina za Western blotting

Inkubirane stanice u ukupnoj količini od 10^7 su nakon dvostrukog ispiranja u PBS-u skupljene u 50-100 μ L RIPA lizirajućeg pufera (ovisno o količini peleta) koji sadrži 1M NaCl-a, 10% [oktilfenoksi]polietoksietanola (Igepal – USB, Cleveland, SAD), 5% natrij-deoksikolata (DOC - Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), 20% natrij-dodecilsulfata (SDS-Fisher Scientific, Pittsburg, SAD), 1M Tris-HCl, smjesu inhibitora proteaza (Invitrogen, Carlsbad, SAD) i destiliranu vodu. Nakon inkubacije na ledu od 30 minuta i centrifugiranja silom od 16 100 g kroz 20 minuta koncentracija bjelančevina u staničnim lizatima je određena analizom po Bradfordu – ukupnoj količini od 5 μ L staničnog lizata je bilo dodato 800 μ L destilirane vode i 200 μ L reagensa za spektrofotometriju bjelančevina (BIORAD, Hercules, SAD), a nakon inkubacije na

sobnoj temperaturi od 15 minuta, koncentracija bjelančevina u tretiranim uzorcima je uz kontrolnu koncentracijsku krivulju načinjenu pomoću goveđeg serumskog albumina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) određena spektrofotometrom (Unico, Dayton, NJ) po jednadžbi $C = [(M \times \text{Abs}) + I]$, gdje je C koncentracija mjerenih bjelančevina, M nagib krivulje, Abs vrijednost absorpcije (595 nM), a I sjecište izmjerenih vrijednosti na krivulji. Nakon određivanja koncentracije bjelančevine su pohranjene na temperaturi od -80°C do Western blottinga.

4.8. Western blotting

Bjelančevine su bile otopljene na 4°C, nakon čega se ukupna količina od 15-25 µg bjelančevina razrijedila u ukupnom volumenu od 50 µL koji sadrži još i 12.5 µL pufera za punjenje jažica na gelu i RIPA pufera. Pufer za punjenje se sastojao od 0.25 M Tris HCl, 8% natrij-dodecilsulfata, 30% glicerola i bromofenol plavila (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD). Ovako pripremljeni proteinski uzorci s posebnim uzorkom koji sadrži proteinsku ljestvicu kao marker su bili denaturirani na 100°C kroz 10 minuta i preneseni u jažice na gradijentnim 4-20%-tnim SDS-PAGE (poliakrilamid) gelovima za elektroforezu (Bio-Rad, Hercules, SAD). Elektroforeza se izvršila u puferu koji sadrži Tris glicin s 0.5% SDS-a (Fisher Scientific, Pittsburg, SAD) na 100 V kroz 1-2 sata. S gela su bjelančevine prenešene na nitrocelulozne membrane (Bio-Rad, Hercules, SAD) u Tris glicin puferu na 90 V kroz 1.5 sat. Kvaliteta prenesenih bjelančevina je prekontrolirana pomoću natrijeve soli diazo boje (Ponceau – Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD). Nakon ispiranja, membrane su bile blokirane u PBS-u s 0.05% polioksietilen 20-sorbitan monolaurata (Tween 20 – Fisher Scientific, Pittsburg, SAD) i 5% obranog mlijeka (Bio-Rad, Hercules, SAD) i nakon toga ostavljene preko noći na 4°C u reakciji s primarnim protutijelima na istraživane bjelančevine. Detekcija je izvršena sekundarnim protutijelima obilježenima peroksidazom hrena s kojima su membrane bile inkubirane kroz 1 sat na sobnoj temperaturi. Nakon reakcije s kemiluminiscentnim reagensom (SuperSignal Pico – Pierce, Rockford, SAD) kroz 5 minuta roentgenografski filmovi (BioMaxt Light Film – Kodak, Rochester, SAD) su bili izloženi membranama.

4.9. Imunofluorescencija

Tretirane stanice su pomoću citospina (Thermo Scientific, Pittsburg, SAD) bile prenešene na predmetna stakalca silom od 24 g kroz 5 minuta, nakon čega je uslijedila fiksacija 10%-tnim formalinom (Fisher Scientific, Pittsburg, SAD) kroz 20 minuta. Nakon pranja u PBS-u stanice su dodatno fiksirane u 100%-tnom metanolu na 4°C kroz 20 minuta. Inkubacija s primarnim protutijelom je uslijedila nakon blokiranja 10% mlijekom u vlažnoj komori preko noći na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije sa sekundarnim protutijelom obilježenim flourokromnom bojom kroz jedan sat na stakalca je bio dodat nuklearni marker 4',6-diamidino-2-fenilindol (Invitrogen, Carlsbad, SAD). Analiza je bila učinjena pomoću Axiovert 200M imunofluorescentnog mikroskopa (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Njemačka), a fotografije prikupljene putem Volocity programa (Improvision, Waltham, SAD).

4.10. Životinjski modeli

Koristio sam SCID (severe combined immunodeficiency) beige miševe stare 5-7 tjedana (Taconic Laboratories, Germantown, SAD). Životinje su bile smještene u prostoru odvojenom barijerom, strogo namijenjenom za tu svrhu u Herbert Irving Comprehensive Cancer centru pod izravnim nadzorom IUCAC-a (Institutional Animal Care and Use Committee) Sveučilišta Columbia u kavezima od po maksimalno 6 odraslih životinja po kavezu. Prostor gdje su kavezi biti smješteni nalazio se u sobama s kompjutorski kontroliranim temperaturom i vlagom uz 12-satne cikluse svjetlo-mrak, a miševi su imali hranu dostupnu *ad libitum*. Svi eksperimenti su bili provedeni uz poštivanje etičkih načela i zakonskih obveza koje vrijede u SAD-u po donošenju zakona o zaštiti životinja i principa rukovanja s laboratorijskim životinjama, a uz dozvolu Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Kod korištenja modela ksenotransplantata svakom mišu je subkutano na bok bilo injicirano 1×10^7 stanica. Kada su tumori dosegli volumen od 50 mm^3 , miševi su bili odvojeni u skupine od po 8 prema lijeku i koncentraciji koju su dobivali. Svi podaci su bili izraženi kao prosječni volumen tumora po grupi kao funkcija vremena. Volumen tumora bio je procijenjen mjereći dvije najveće međusobno okomite dimenzije (l = dužina, w = širina) pomoću standardnog kalipera i izračunat prema formuli $V = 4/3 \pi r^3$, gdje je $r = (l+w)/4$. Procjena gubitka težine miševa i veličine tumora vršena

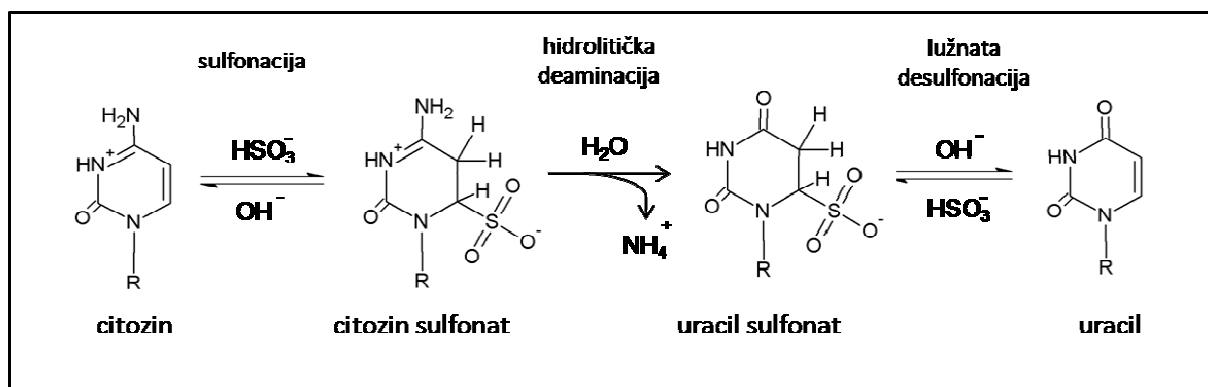
je svaki treći dan tijekom trajanja eksperimenta. Životinje su žrtvovane kada bi volumen tumora dosegao 2 cm³ ili nakon gubitka 10% tjelesne težine, ovisno o tome što je nastupilo prvo. Kontrolna skupina je bila tretirana samo fiziološkom otopinom s 10%-tnim dimetilsulfoksidom. Eksperiment je bio ponovljen kako bi se dokazala reproducibilnost. Doze lijekova: a) LBH589 15mg/kg, 5 uzastopnih dana u ciklusu od 28 dana; b) decitabin 1.5mg/kg, 2 (pon i pet) ili 3 dana (pon, sri i pet) u ciklusu od 28 dana. Nuspojave: opažen je gubitak na težini, a pri višim koncentracijama decitabina opažen je letalitet u 3 životinje. Eutanazija životinja je bila izvršena u za tu svrhu određenoj prostoriji pomoću CO₂.

4.11. Izolacija DNK

Tretirane stanice su od lijekova bile isprane PBS-om te pohranjene na temperaturi od -80°C do trenutka izolacije DNK, kad su otopljene te je u njih dodat pufer za ekstrakciju. Pufer za ekstrakciju je sadržavao 4 mg proteinaze K te natrij etilendiamin tetraoctenu kiselinu (SEDTA – 5M NaCl, 0.5M etilendiamin tetraoctene kiseline - EDTA i destilirana voda). U ukupno 14 mL otopine sa staničnim lizatom je dodato 0.75 mL 20%-tnog SDS-a, nakon čega je uslijedila inkubacija na 37°C uz konstantno kovitlanje preko noći. Slijedeći dan se u otopinu dodalo 15 mL TE (Tris + EDTA) zasićenog fenola (Invitrogen, Carlsbad, SAD) s pH vrijednosti od 7.5 do 8.0, te su uzorci stavljeni na orbitalni mješač kroz 1 sat na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja silom od 800 g kroz 5 minuta polaganom aspiracijom prikupljen je gornji vodeni sloj otopine u koju je potom dodato 7.5 mL TE zasićenog fenola i 7.5 mL izoamilalkohola (Invitrogen, Carlsbad, SAD). Uslijedilo je ponovno centrifugiranje silom od 800 g kroz 5 minuta na sobnoj temperaturi, odvajanje gornjeg vodenog sloja aspiracijom i dodavanje 20 µL RNaze I (Invitrogen, Carlsbad, SAD) u koncentraciji od 500 µg/mL. Digestija RNK je provedena na 37°C kroz 30 minuta na orbitalnom mješaču. Ponovljen je korak s dodavanjem 15 mL TE zasićenog fenola i odvajanjem vodene faze aspiracijom u koju je potom dodano 30 mL hladnog 100%-tnog etanola uz polaganom kovitlanje. Precipitirana DNK je isprana jednom u 70%-tnom i potom opet u 100%-tnom etanolu. Nakon sušenja na sobnoj temperaturi DNK je bila otopljena u odgovarajućem volumenu TE rotacijom preko noći na 4°C. Koncentracija DNK je određena spektrofotometrijski, a kvaliteta i eventualna kontaminacija s RNK elektroforezom na agaroznom gelu uz bojanje etidij-bromidom.

4.12. Analiza metilacije genoma

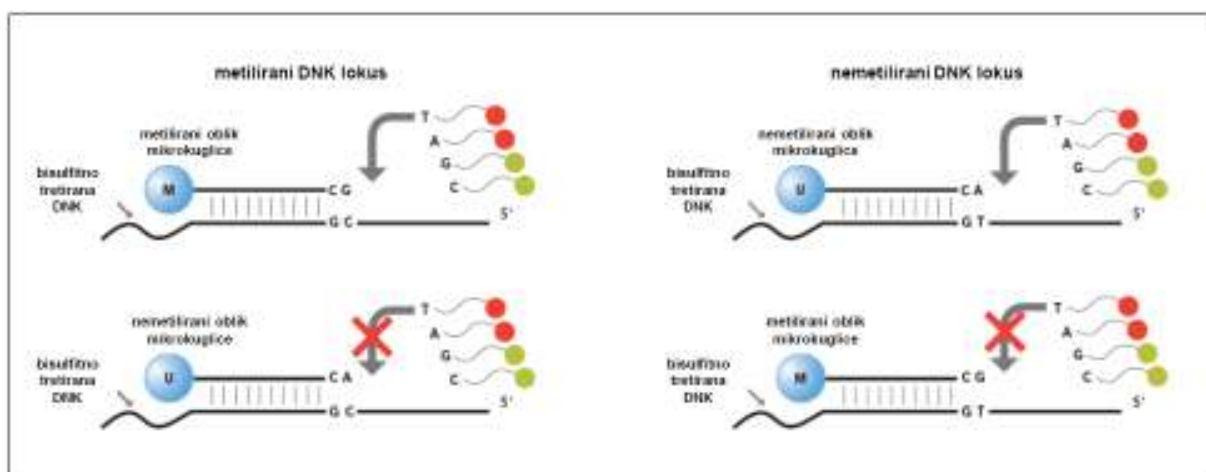
Za analizu metilacije čitavog genoma koristio sam Illumina platformu u obliku Illumina Humanmethylation27 mikropostroja (Illumina, San Diego, SAD). Ranije opisanim postupkom izolacije DNK dobivena je pročišćena DNK iz tretiranih uzoraka. Prije analize metilacije genoma proveo sam tristupanjsku reakciju bisulfitne konverzije DNK pomoću seta za bisulfitnu konverziju (Zymo Research, Orange, SAD) kako je prikazano na Slici 7. Ovom metodom se osigurava razlikovanje metiliranog od nemetiliranog citozina. Metilirani citozin, naime, ne podliježe reakciji bisulfitne konverzije, za razliku od nemetiliranog koji slijedom tri kemijske reakcije prelazi u uracil.



Slika 7. Bisulfitna konverzija DNK. Ovom metodom se kroz tri stupnja (sulfonacija, hidrolitička deaminacija, lužnata desulfonacija) nemetilirani citozin prevodi u uracil, dok citozin s metilnom skupinom ostaje nepromijenjen.

Nakon procesa bisulfitne konverzije, DNK sam umnožio metodom amplifikacije čitavog genoma. Amplificirana DNK je bila razložena na fragmente, pročišćena precipitiranjem etanolom i višestrukim ispiranjem. Pročišćena DNK je potom prenešena na mikropostroj s mogućnošću analize metiliranosti 27 578 različitih dinukleotida u sklopu genskih promotora ukupno 14 495 gena. Mikropostroj sadrži dva oblika izolacijskih mikrokuglica – jedan za metilirani, a drugi za nemetilirani oblik istraživanog CpG nukleotida, na koji su vezani 50 baza dugački oligomeri na koje se u postupku hibridizacije vezuju DNK fragmenti iz uzoraka koji se žele analizirati. U slučaju metiliranog DNK lokusa bisulfitno tretirana DNK zadržava citozin i prijanja samo za

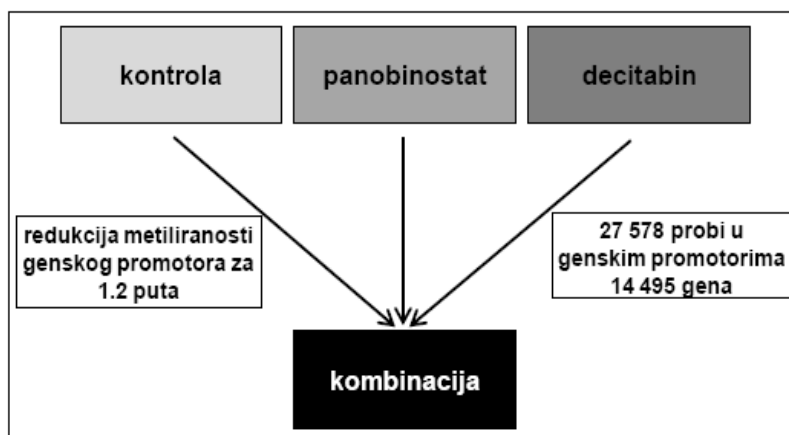
metilirani oblik mikrokuglice, dok nemetilirani DNK lokus prijanja samo za nemetilirani oblik mikrokuglice. Nakon hibridizacije uslijedio je proces jednobaznog produljenja (Slika 8), u kojem se na samo za DNK uzorka potpuno vezani oligomer nadovezuje jedna dideoksinukleotidna baza obilježena biotinom ili 2,4-dinitrofenolom. S obzirom da se radi o dideoksinukleotidu, daljnja ekstenzija DNK je zaustavljena. Uslijedila je inkubacija s cijaninom (Cy3 i Cy5 boje) obilježenim primarnim protutijelima te inkubacija sa sekundarnim protutijelima. Odnos metiliranosti i nemetiliranosti istraživanog lokusa je određen mjerenjem ukupne fluorescence metiliranog nasuprot nemetiliranog oblika mikrokuglica za pojedini lokus i izračunat putem BeadStudio programa.



Slika 8. Proces jednobaznog produljenja oligomera za analizu statusa metilacije pojedinog lokusa. Bisulfitno tretirana DNK s metiliranim lokusom je hibridizirana za oligomer dug 50 baza vezan za metilirani oblik mikrokuglice. Nemetilirani DNK lokus je hibridiziran za nemetilirani oblik mikrokuglice. Biotinom ili 2,4-dinitrofenolom obilježena dideoksinukleotidna baza se vezuje samo za oligomer koji je u potpunosti vezan za DNK uzorka.

Analiza metilacije je učinjena na DNK izoliranoj fenol-izoamilalkohol metodom u tri limfomske linije u dva vremenska perioda u kojima je u pokusima analize vijabilnosti stanica i indukcije apoptoze dokazana sinergija u djelovanju dvaju lijekova (24 i 48h; panobinostat 2.5 nM za Ly1 i Ly10, 7.5 nM za Su-DHL6; decitabin 2.5 μ M za Ly1 i Ly10, 7.5 μ M za Su-DHL6) uz pomoć dChip kompjutorskog programa. Kriteriji za odabir gena sa značajnom hipometilacijom u području svog genskog promotora su bili slijedeći: (Slika 9): i) dokazano postojanje CpG otoka, a ne samo CpG dinukleotida u području genskog promotora i ii) redukcija signala metiliranosti

genskog promotora za 1.2 puta⁵⁸ u uzorku tretiranom kombinacijom panobinostata i decitabina u odnosu na ostala 3 uzorka (kontrola, panobinostat samostalno, decitabin samostalno) u sve tri u ovom eksperimentu ispitivane limfomske linije (Ly1, Ly10, Su-DHL6).



Slika 9. Grafički prikaz analize metiliranosti genoma kompjutorskim programom D-Chip. Kriterij za odabir značajno hipometiliranih gena u uzorku tretiranom kombinacijom panobinostata i decitabina je redukcija metiliranosti genskog promotora za 1.2 put u odnosu na ostala tri uzorka. Ovako postavljena analiza je učinjena na tri limfomske linije (Ly1, Ly10 i Su-DHL6).

4.13. Izolacija RNK

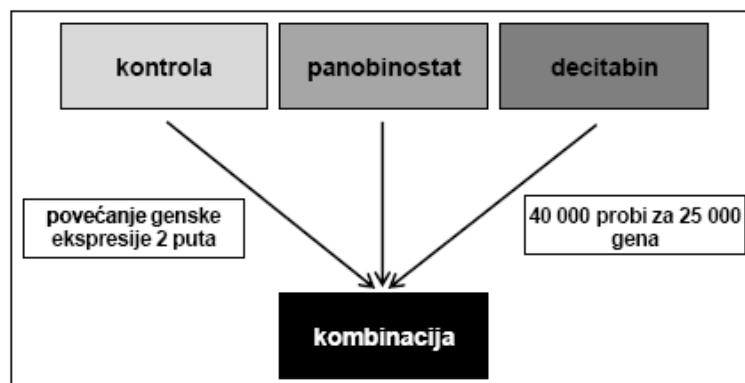
Za izolaciju RNK iz tretiranih staničnih uzoraka koristio sam TRIzol reagens (otopina fenola i gvanidin-izotiocijanata, Invitrogen, Carlsbad, SAD). Svakom tretiranom uzorku dodao sam 1 mL TRIzol reagensa, nakon čega sam uzorke do trenutka izolacije RNK pohranio na -80°C. Pri izolaciji, uzorku s TRIzol reagensom sam dodao 200 µL kloroforma (Fisher Scientific, Pittsburg, SAD), uslijedilo je centrifugiranje silom od 15 700 g kroz 15 minuta na temperaturi od 4°C. Aspiracijom sam odstranio gornju prozirnu fazu, koja sadrži RNK u koju sam potom dodao 500 µL 2-propanola (Fisher Scientific, Pittsburg, SAD), a sam uzorak ostavio na ledu kroz 10 minuta uz povremeno kovitlanje. Centrifugiranjem silom od 15 700 g kroz 10 minuta na 4°C RNK je istaložena na dnu epruvete u obliku vidljivog peleta. Ispiranje sam postigao 75%-tnim

etanolom, a uslijedilo je kovitlanje, ponovno centrifugiranje navedenom silom kroz 5 minuta i sušenje na sobnoj temperaturi. Osušeni uzorci su resuspendirani u odgovarajućem volumenu DEPC (dietilpirokarbonat) tretirane vode (Ambion, Austin, SAD). Koncentracija i kvaliteta RNK je određena spektrofotometrijski (mjeranjem odnosa apsorpcijskih vrijednosti na dvije valne duljine – 260 i 280 nm s optimalnom vrijednosti navedenog omjera 1.8-2.0) i elektroforezom na agaroznom gelu uz bojanje etidij-bromidom.

4.14. Profiliranje genske ekspresije

Nakon izoliranja, RNK uzoraka je bila pohranjena na temperaturi od -80°C. Na dan ispitivanja genske ekspresije uzorci su otopljeni na 4°C, nakon čega je uslijedila fragmentacija i sinteza komplementarne DNK (cDNK) uz amplifikaciju lančanom reakcijom polimeraze (PCR – eng. polymerase chain reaction). Umnožena cDNK je prenešena na HumanHT-12 v3 Expression mikropostroje (Illumina, San Diego, SAD) koji sadrže 48 000 probi za 25 000 gena i mogu analizirati 12 različitih uzoraka. Daljnja reakcija je jednaka analizi metilacije genoma – jednobazno produljenje oligomera vezanog za mikrokuglicu. Baza koja je poslužila za jednobazno produljenje oligomera je bila obilježena biotinom ili 2,4-dinitrofenolom. Uslijedila je inkubacija s cijaninom (Cy3 i Cy5 boje) obilježenim primarnim protutijelima te inkubacija sa sekundarnim protutijelima, a potom analiza ekspresije svake od 48 000 probi mjeranjem signala pojedine mikrokuglice. Analiza promjene genske ekspresije je učinjena na RNK izoliranoj TRIzol reagensom u tri limfomske linije u dva vremenska perioda u kojima je u pokusima analize vijabilnosti stanica i indukcije apoptoze dokazana sinergija (24 i 48h za Ly1, Ly10 i Su-DHL6; panobinostat 2.5 nM za Ly1 i Ly10, 7.5 nM za Su-DHL6; decitabin 2.5 µM za Ly1 i Ly10, 7.5 µM za Su-DHL6).

U računalnom programu dCip, korištenom za analizu dobivenih podataka, kriterij za odabir gena s povećanom razinom mRNK u uzorku tretiranom kombinacijom panobinostata i decitabina je dvostruko povećanje razine mRNK u odnosu na ostala tri uzorka (kontrola, panobinostat samostalno, decitabin samostalno) kako je grafički prikazano na Slici 10.



Slika 10. Grafički prikaz analize promjene genske ekspresije čitavog genoma kompjutorskim programom dChip. Kriterij za odabir značajno povećane ekspresije gena u uzorku tretiranom kombinacijom panobinostata i decitabina je povećanje signala za 2 puta u odnosu na ostala tri uzorka. Ovako postavljena analiza je učinjena na tri limfomske linije (Ly1, Ly10 i Su-DHL6).

4.15. Statistička analiza

Tijekom istraživanja učinjeni su testovi permutacije kako bi se utvrdila superiornost određene grupe uzoraka prema ostalima i kontroli⁵⁹. Pri izračunavanju statističke značajnosti u *in vivo* pokusima korišten je Wilcoxon test. Za izračunavanje površine pod krivuljom (AUC – eng. area under the curve) korišten je globalni test uz trapezoidalno pravilo. Statistička značajnost izračunata objema navedenim metodama je bila izračunata za aktualni i za relativni volumen mjerenog tumora, gdje je relativni volumen jednak aktualnom tumorskom volumenu podijeljenom s vrijednošću volumena na dan početka terapije. Za analizu IC50 (koncentracija pri kojoj se u tretiranoj skupini dobije 50 %-tna vrijednost kontrole) lijekova u različitim staničnim linijama koristio sam Calcsyn software (Biosoft, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo)⁶⁰. Kao dokaz sinergističkog djelovanja istraživanih lijekova i molekula koristio sam metodu omjera relativnog rizika (RRR – eng. relative risk ratio). RRR se bazira na izračunavanju omjera očekivane i aktualne vrijednosti. Na primjeru izračunavanja sinergizma u djelovanju dvaju antitumorskih lijekova, rezultat njihovog udruženog djelovanja je smrt maligne stanice odnosno smanjenje postotka vijabilnih stanica u tretiranom uzorku u odnosu na kontrolu. Očekivana vrijednost (OV) njihovog udruženog djelovanja može se izračunati po formuli $OV = N_A \times N_B / 100$,

gdje je N_A broj odnosno postotak vijabilnih stanica u uzorku tretiranom lijekom A, a N_B broj odnosno postotak vijabilnih stanica u uzorku tretiranom lijekom B. Vrijednost samog omjera relativnog rizika se dobije prema formuli $RRR = AV/OV$, gdje je AV aktualna vrijednost odnosno postotak vijabilnih stanica dobiven u samom eksperimentu. Vrijednost manja od 1 će se smatrati dokazom sinergizma. Vrijednosti $RRR = 1$ označuju aditivan učinak dvaju lijekova, a > 1 antagonizam.

4.16. Humani materijal

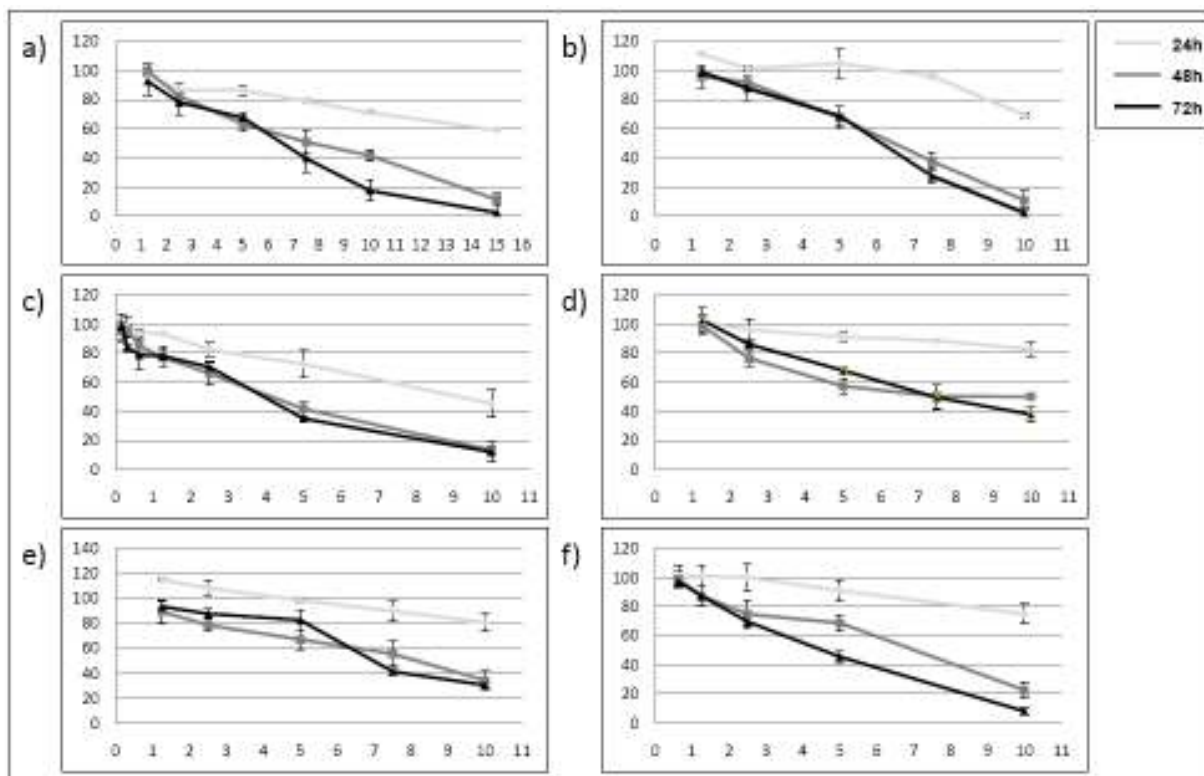
Svi bolesnici su bili upoznati s prirodom istraživanja i svi bolesnici koji su sudjelovali u istraživanju su potpisali informirani pristanak u skladu s postupnikom Columbia-Presbyterian Medicinskog centra. Prilikom biopsije limfnog čvora bolesnika radi patohistološke dijagnoze, iz dijela uzorka su izolirane limfomske stanice Ficoll postupkom koje su onda činile primarnu staničnu liniju koja je tretirana istraživanim molekulama kako bi se potvrdio sinergistički učinak istraživanih lijekova opažen u trajnim staničnim linijama. Sama primarna stanična linija je do pokusa pohranjena na -80°C u telećem fetalnom serumu (FCS – eng. fetal calf serum) s 10% DMSO. B stanice iz uzoraka su na dan pokusa bile izolirane koristeći negativnu selekciju i magnetsko stanično odabiranje (B cell isolation kit II, MACS, Bergisch Gladbach, Njemačka). Uzorak je naime nakon otapljanja i centrifugacije silom od 300 g kroz 10 minuta bio resuspendiran u puferu s biotinom obilježenim protutijelima usmjerenim protiv slijedećih antigena stanične diferencijacije (CD2, CD14, CD16, CD36, CD43 i CD235a). Nakon inkubacije na ledu kroz 10 minuta otopini su dodate protutijelima usmjerenim protiv biotina obilježene izolacijske mikrokuglice, a postupkom magnetske separacije na 4°C dobio se izolirani pelet B stanica, koji se potom resuspendirao u standardnom mediju za staničnu kulturu (RPMI) te je uslijedio pokus za analizu citotoksičnosti ranije opisan za primarne stanične linije.

5. REZULTATI

5.1. Inhibitori histonske deacetilaze i hipometilirajuće tvari u kombinaciji polučuju sinergistički učinak u zaustavljanju rasta i indukciji apoptoze stanica difuznog B-velikostaničnog limfoma u *in vitro* uvjetima

5.1.1. Određivanje vrijednosti polovice maksimalne inhibitorne koncentracije (IC50) u staničnim linijama DLBCL

Polovica maksimalne inhibitorne koncentracije (IC50) je brojčana vrijednost učinkovitosti neke tvari u inhibiranju biološkog ili biokemijskog svojstva. Kod tvari, potencijalnih budućih lijekova u liječenju malignih bolesti, čiji se učinak ispituje u *in vitro* uvjetima, IC50 vrijednost nam govori koliko je određene tvari potrebno za 50%-tno inhibiranje rasta malignih stanica u odnosu na netretiranu kontrolu. Klasično brojanje ukupnog broja stanica i broja mrtvih stanica metodom tripan plavila može odrediti vrijednost IC50, ali je zbog dugotrajnosti postupka ograničeno na mali broj uzoraka. Za analizu mnogostrukih uzoraka, povećanje objektivnosti pokusa i skraćenje vremena analize koriste se čitači fluorescencije i luminescencije. Oni pretvaraju svjetlosni signal stvoren prisutstvom vijabilnih stanica u brojčanu vrijednost, te u primjeru fluorescencije mjere fluorescentni signal resofurina. Resofurin nastaje redukcijom resazurina, redoks-osjetljive boje. Ova reakcija se zbiva zasad nepoznatim mehanizmom samo u vijabilnim stanicama, pri čemu resazurin mijenja svoje plavičasto, nefluoresceirajuće stanje u ružičasto, visoko fluoresceirajuće. Pri korištenju luminescencije izom stanica se omogućava oslobađanje ATP. ATP se u kemijskoj reakciji s luciferazom i kisikom prevodi u AMP uz oslobađanje svjetlosnog signala, koji je proporcionalan postotku vijabilnih stanica u uzorku. Redukcija signala u obje metode je rezultat inhibicije rasta i diobe te smrti malignih stanica. Na Slici 11 je prikazan reprezentativan pokus određivanja koncentracijske krivulje i IC50 panobinostata u limfomskim



Slika 11. Koncentracijske krivulje panobinostata (LBH589) pri određivanju vrijednosti polovice maksimalne inhibitorne koncentracije (IC₅₀) u staničnim linijama DLBCL u tri inkubacijska vremena (24, 48 i 72h): a) Ly1; b) Ly7; c) Ly10; d) HBL-1; e) RIVA; f) Su-DHL6. Na apscisi je prikazana koncentracija panobinostata u nanomolima (nM), a na ordinati prosječna količina luminiscentno izmjerenog ATP-a izražena kao postotak vrijednosti netretirane kontrole uz standardnu devijaciju.

stanicama nakon inkubacije u tri različita vremenska perioda (24, 48 i 72h), izračunate pomoću Calcsyn programa.

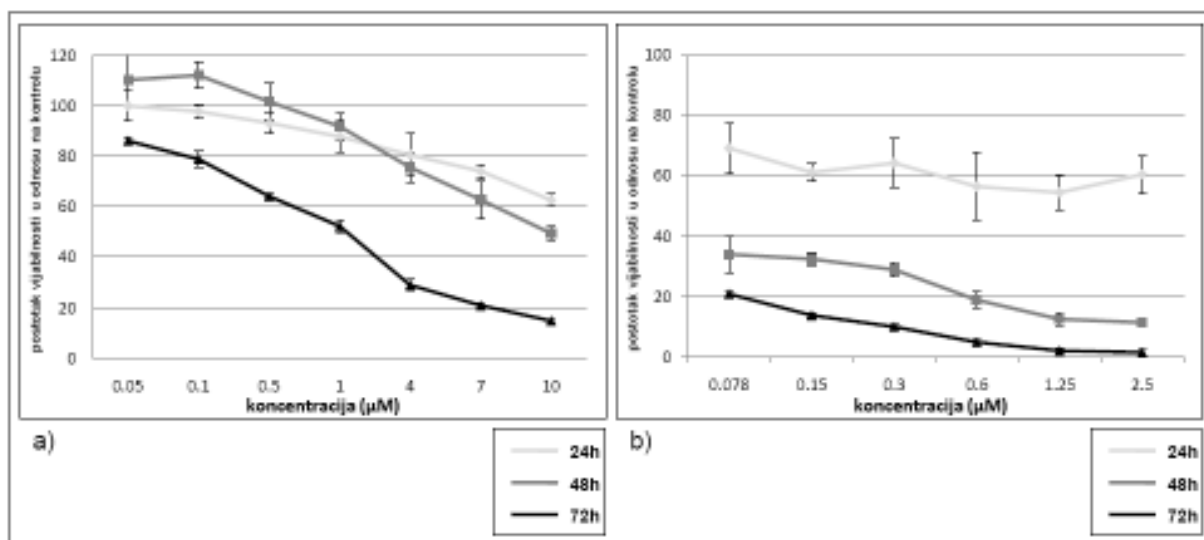
Pri korištenju Calcsyn programa za izračunavanje vrijednosti IC₅₀ koriste se jednadžbe odnosa doze i učinka koje je prvi opisao Chou^{61,62} analizirajući stotine modela enzimatskih reakcija. Jednadžba $f_a/f_u = (D/D_m)^m$ korelira odnos doze i učinka, pri čemu je D doza (koncentracija) lijeka (ispitivane molekule), D_m doza s medijanom učinka, određena sjecištem s apscisom na krivulji učinka i doze, f_a dio materije u pokusu na koji navedena doza lijeka ima učinka, f_u dio materije u pokusu na koji navedena doza lijeka nema učinka, a m eksponent koji označava sigmoidnost odnosno oblik krivulje doze i učinka određen nagibom dijagrama s

lijek	t(h)	Ly 1	Ly 7	Su-DHL6	Ly 10	RIVA	HBL-1
Panobinostat(nM)	24	15.8	17.7	>20	5.1	>20	>20
	48	7.0	5.0	6.3	3.8	7.4	8.6
	72	6.4	4.9	3.5	3.6	7.4	9.1
Vorinostat(nM)	24	2731.1	2084.9	2817.4	1250	4406.5	1591.9
	48	1151	1300.1	1274.2	687.3	1280.8	967.4
	72	1258	1388.5	1076.4	648.4	1173.3	1009.1
Depsipeptid(nM)	24	6.1	4.7	4.8	5.7	7.3	2.5
	48	3.0	2.4	2.0	2.6	3.6	2.0
	72	2.1	2.3	2.0	1.0	1.5	2.0
Belinostat(nM)	24	565.2	486.5	1010.8	248.2	729.9	680.2
	48	248.9	158.4	150.7	87.6	262.2	125.2
	72	117.5	149.1	83.9	63.0	185.8	218.9
Decitabin(μM)	24	12.3	10.7	>20	>20	>20	>20
	48	10.1	0.025	>20	0.06	>20	>20
	72	1.8	0.018	1.6	0.03	>20	>20
5-azacitidin(μM)	24	>20	10.1	>20	12.2	>20	>20
	48	>20	2.0	>20	11.8	>20	14.8
	72	>20	2.0	14.3	9.6	>20	14.5

Tablica 4. Vrijednosti polovice maksimalne inhibitorne koncentracije (IC₅₀) dobivene Calcusyn softwareom iz podataka određenih mjerenjem luminiscencije u limfomskim uzorcima tretiranim lijekovima korištenim u istraživanju (HDACi: panobinostat, vorinostat, depsipeptid, belinostat; hipometilirajuće tvari: decitabin, 5-azacitidin) u tri inkubacijska vremena (t) za šest staničnih linija DLBCL.

medijanom učinka. Dijagram s medijanom učinka prikazuje odnos vrijednosti log(D) na apscisi i $\log(f_a/f_u)$ na ordinati prema jednačbi: $\log(f_a/f_u) = m \log(D) - m \log(D_m)$. D_m vrijednost se na ovom

dijagramu odredi kao vrijednost sjecišta s apscisom i predstavlja vrijednost IC₅₀ na logaritamskom dijagramu učinka i doze između netretirane (IC₀) i pozitivne kontrole (IC₁₀₀). Tablica 4 prikazuje vrijednosti IC₅₀ za lijekove ispitivane u sklopu ove disertacije: panobinostat (LBH589), vorinostat (SAHA), depsipeptid, belinostat, decitabin i 5-azacitidin. HDACi su puno potentniji u inhibiciji rasta malignih stanica od hipometilirajućih tvari, što je vidljivo i u samoj činjenici da su vrijednosti IC₅₀ za HDACi u nanomolima za razliku od hipometilirajućih tvari gdje su IC₅₀ izražene u mikromolima. Najpotentniji od 4 ispitivana HDACi je bio depsipeptid, a slijede LBH589, belinostat i SAHA.



Slika 12. Vremenski ovisan inhibični učinak djelovanja decitabina na limfomske stanice: a) Ly10; b) Ly7. Decitabin ima inhibični učinak na rast malignih stanica koji je u izravnoj ovisnosti o broju diobi stanica odnosno o duljini staničnog ciklusa, sukladno mehanizmu njegovog djelovanja. Prikazane su prosječne vrijednosti uz standardne devijacije.

Kod hipometilirajućih tvari opažene su stanične linije rezistentne na visoke koncentracije (20 μM) decitabina (RIVA, HBL-1) i 5-azacitidina (Ly1, RIVA), te činjenica da je decitabin općenito bio učinkovitiji od 5-azacitidina u inhibiciji rasta ostalih limfomskih linija. Razlike među staničnim linijama rezistentnim na pojedinu hipometilirajuću tvar (5-azacitidin ili decitabin) su moguće posljedica razlike u njihovom djelovanju (decitabin se ugrađuje u DNK, za razliku od 5-azacitidina koji se većinom ugrađuje u RNK). I kod HDACi i hipometilirajućih tvari je opažena

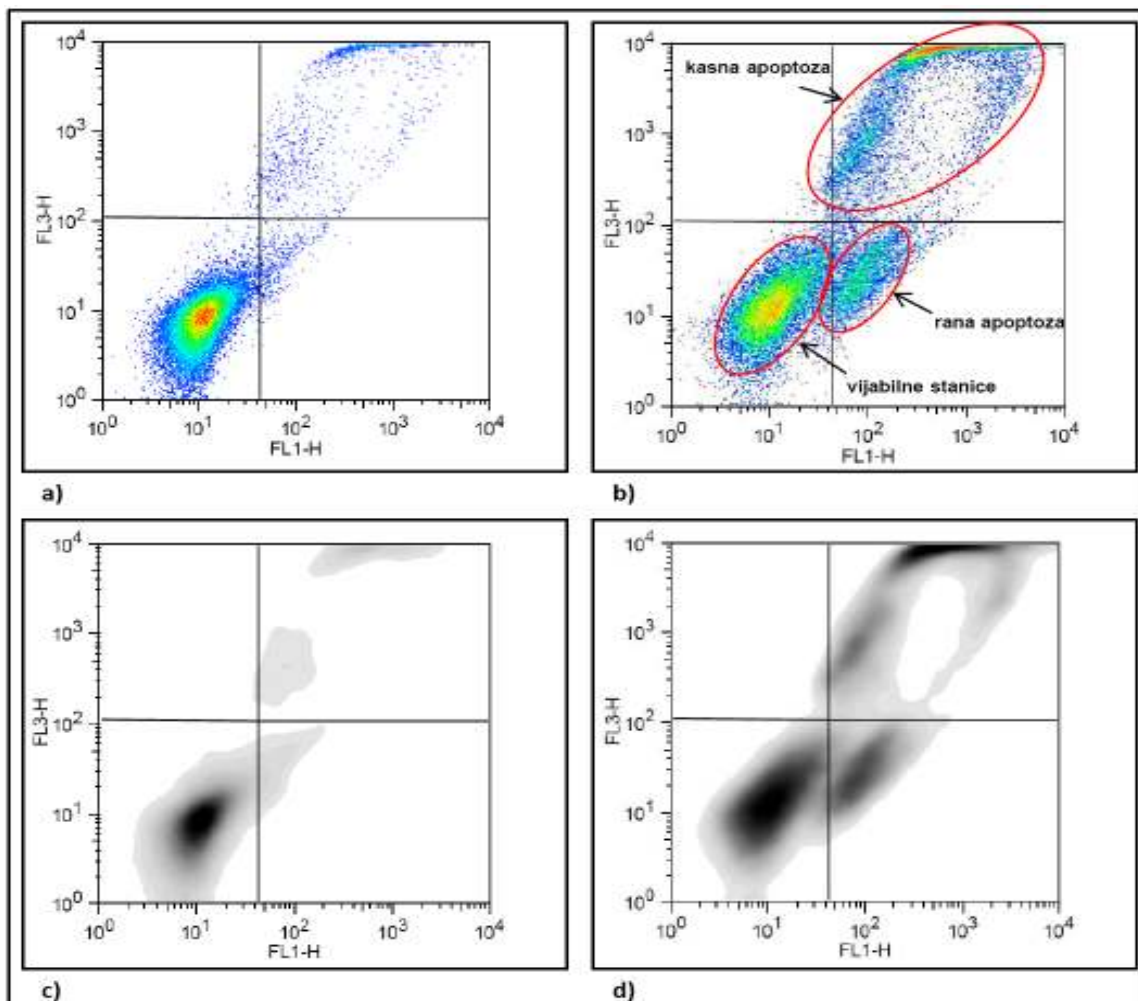
vremenska ovisnost u djelovanju lijeka, jače izražena kod hipometilirajućih tvari (Slika 12), sukladno s mehanizmom njihovog djelovanja pri čemu se decitabin kod diobe stanice ugrađuje u novosintetizirani lanac DNK, vežući na sebe DNK metiltransferaze i ireverzibilno blokirajući njihovu aktivnost. Pri svakoj slijedećoj diobi stanice, novosintetizirani komplementarni DNK lanac je hipometiliran u odnosu na svoj kalup što znači da je ovaj proces izravno ovisan o broju diobi malignih stanica odnosno o duljini staničnog ciklusa.

5.1.2. Analiza apoptoze inducirane HDACi i hipometilirajućim tvarima metodom protočne citometrije u staničnim linijama difuznog B-velikostaničnog limfoma

Pri korištenju fluorescencije ili luminiscencije za određivanje vrijednosti IC50, dobivene brojčane vrijednosti zbir su dvaju učinaka lijeka: inhibicije rasta i apoptotičkog učinka. Protočna citometrija nam pomaže pri diskriminaciji ova dva konačna učinka lijeka na maligne stanice, jer se njome može izravno mjeriti broj apoptotičnih stanica.

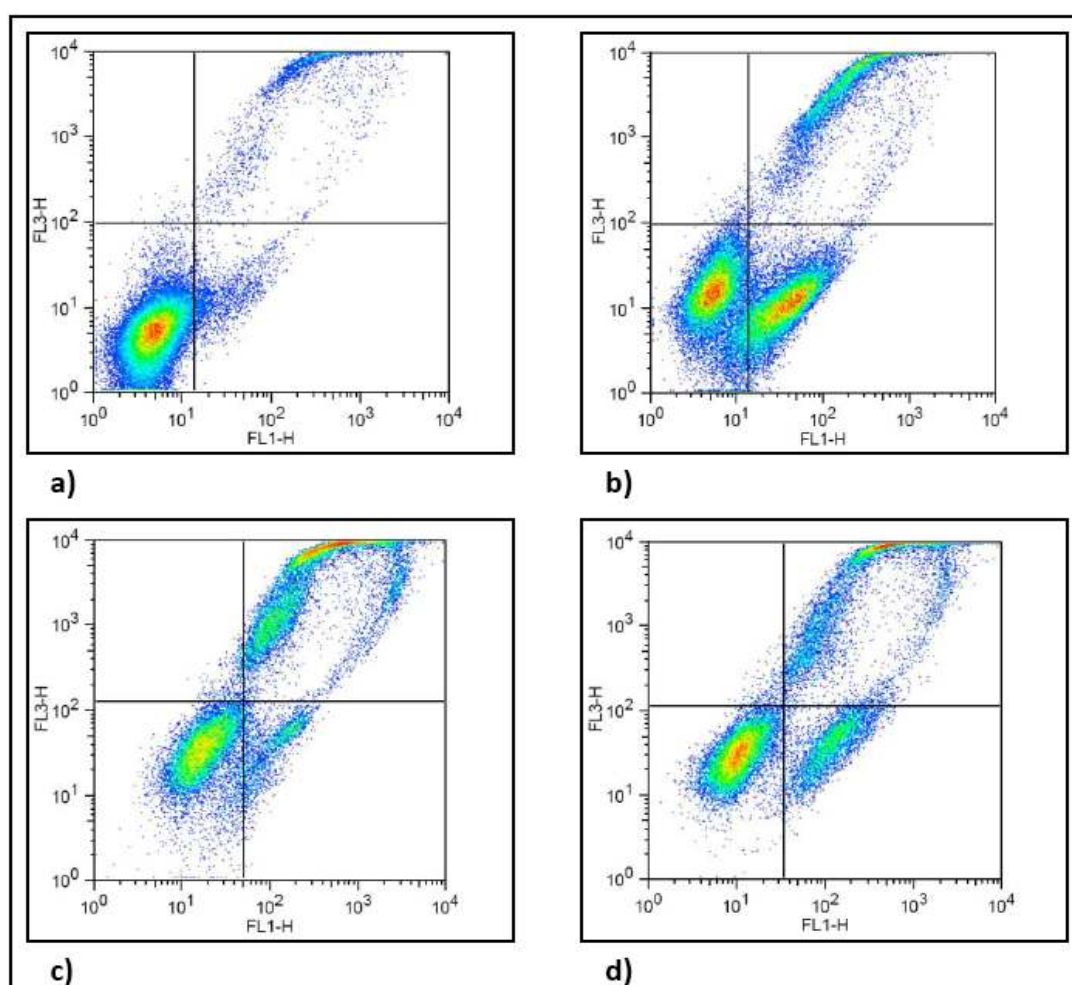
Apoptotički učinak pojedinog lijeka može se odrediti citometrijskom metodom analizirajući promjene u veličini i vakuoliziranosti stanica tretiranim tim istim lijekom. Za precizniji i raniji dokaz apoptoze koriste se nuklearne boje sa sposobnošću vezivanja za DNK apoptotične stanice. Na Slici 13 je prikazan učinak decitabina (10 μ M) na limfomske stanice (Ly1 stanična linija) nakon 72h inkubacije. Boje korištene za dokaz ranog i kasnog stadija apoptoze jesu Yo-Pro-1 i PI. Obje boje imaju sposobnost vezivanja za staničnu nuklearnu tvar, ali ne prolaze kroz intaktnu membranu. Yo-Pro-1 je zelena fluoresceirajuća boja koja može proći kroz membranu i vezati se za DNK stanica u ranom stadiju apoptoze, a na grafičkom prikazu rezultata citometrijske analize se nalazi na apscisi. PI je crvena fluoresceirajuća boja koja može proći samo kroz membranu stanica u kasnom stadiju apoptoze te je prikazana na ordinati.

Na Slici 13 a) i c) vidljivi su signali netretirane kontrole u dva citometrijska prikaza: pseuodobojom (a) i dijagramom zbijenosti (c). U standardnim FL1 i FL3 kanalima vidljiva je homogena populacija stanica u donjem lijevom kvadrantu citometrijskog prikaza koja je Yo-Pro-1 i PI negativna. Na Slici 13 b) i d) prikazana je decitabinom tretirana stanična populacija.



Slika 13. Analiza apoptotičkog učinka decitabina u limfomskim stanicama (Ly1 stanična kultura) u FL1 (Yo-Pro-1) i FL3 (PI) kanalima: a) netretirana kontrola u citometrijskom prikazu pseudobojom; c) netretirana kontrola u citometrijskom prikazu dijagramom zbijenosti; b) stanice inkubirane s 10 μ M decitabina kroz 72h u citometrijskom prikazu pseudobojom; d) stanice inkubirane s 10 μ M decitabina kroz 72h u citometrijskom prikazu dijagramom zbijenosti. U netretiranoj kontroli vidljiva je homogena populacija stanica u donjem lijevom kvadrantu, dok se u tretiranim stanicama mogu razlikovati tri populacije: 1) Yo-Pro-1 negativna, PI negativna vijabilna populacija; 2) Yo-Pro-1 pozitivna, PI negativna populacija stanica u ranoj apoptozi; 3) Yo-Pro-1 pozitivna, PI pozitivna populacija stanica u kasnoj apoptozi.

Nasuprot homogenoj populaciji kontrole, ovdje možemo opaziti tri različite stanične populacije. Apsorpcija Yo-Pro-1 je kako je navedeno rani događaj u procesu apoptoze, stanice pozitivne za ovu boju pomiču se udesno na FL-1 kanalu i na Slici 13 b) su označene kao rana apoptoza. Apsorpcija PI je kasni događaj u apoptozi i stanice pozitivne na PI se pomiču prema gore u FL-3 kanalu te su na Slici 13 b) označene kao kasna apoptoza (ova populacija stanica je ujedno i Yo-Pro-1 pozitivna). Analiza apoptoze je učinjena na 50 000 protočnim citometrom zabilježenih događaja odnosno stanica.



Slika 14. HDACi uzrokuju apoptozu u limfomskim stanicama (Ly1 stanična linija) nakon inkubacije od 24h (citometrijski prikaz pseudobojom u standardnim FL1 i FL3 kanalima): a) netretirana kontrola; b) LBH589 u koncentraciji od 10nM; c) belinostat u koncentraciji od 500nM; d) vorinostat u koncentraciji od 2.5 μ M.

Svi inhibitori histonske deacetilaze korišteni u istraživanju sposobni su inducirati apoptozu u limfomskim stanicama. Na Slici 14 prikazan je njihov apoptotički učinak na Ly1 staničnu liniju. Apoptozu u roku od 24 sata su inducirali panobinostat (Slika 14 b), belinostat (Slika 14 c) i vorinostat (Slika 14 d). Ovaj učinak je opažen ranije nego u stanicama tretiranim hipometilirajućim agensima.

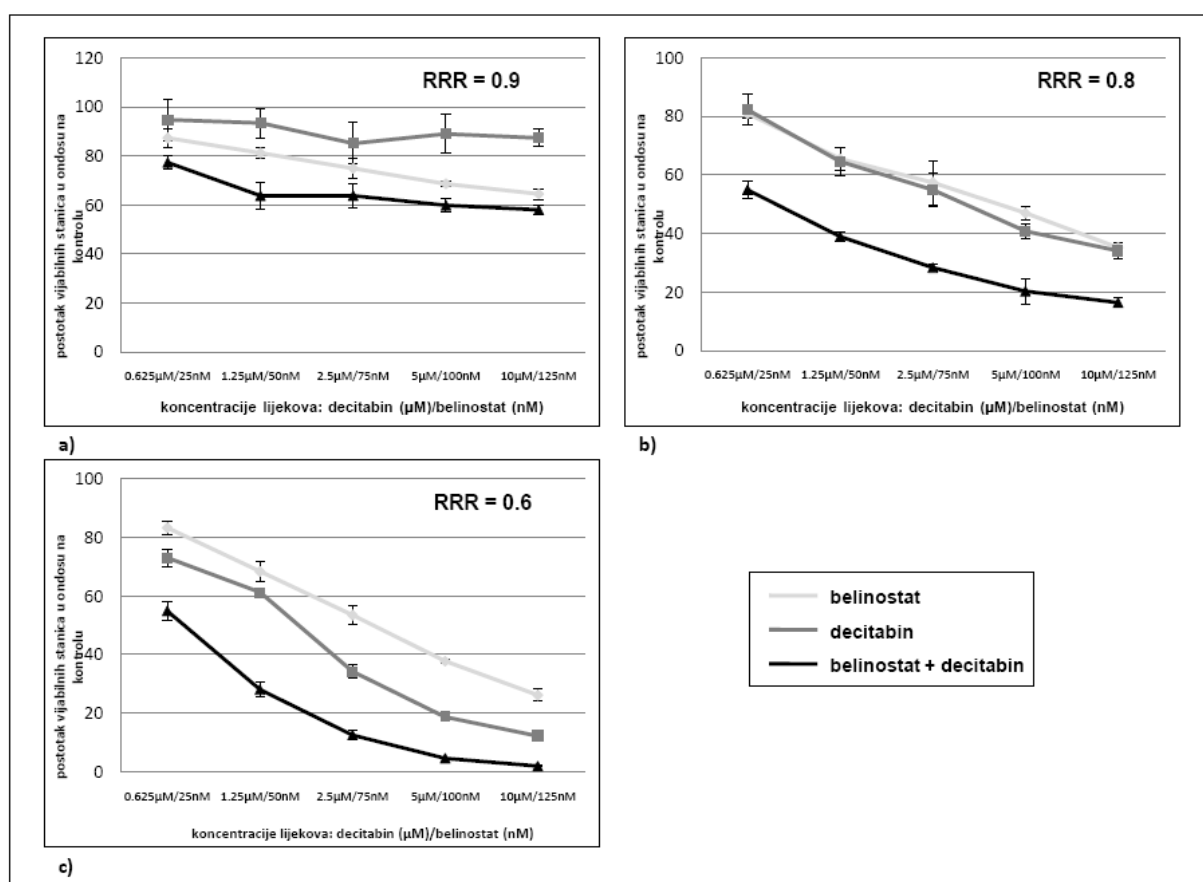
5.1.3. Određivanje sinergističkog učinka kombinacije inhibitora histonske deacetilaze i decitabina u *in vitro* uvjetima

Slika 15 grafički prikazuje model za određivanje sinergističkog učinka dvaju lijekova u *in vitro* uvjetima korišten u ovoj disertaciji. Ly10 stanična linija je tretirana različitim koncentracijama belinostata i decitabina. Koncentracije korištene u eksperimentu su odabrane nasumice kao vrijednosti na koncentracijskoj krivulji oba lijeka lijevo i desno od njihove vrijednosti IC₅₀, a vijabilnost je određena mjerenjem luminiscencije. Stanice su lijekovima tretirane kroz 72 sata, a vijabilnost je određivana u tri vremenska perioda: 24, 48 i 72h.

Sinergizam dvaju lijekova je određen računanjem omjera relativnog rizika (RRR – eng. relative risk ratio), a objašnjen je na slijedećem primjeru (Slika 15b): koncentracija decitabina od 0.625 μ M samostalno nakon 48h inkubacije polučuje citotoksični učinak u 17.8 % stanica, dakle 82.2 % stanica je vijabilno. Pri koncentraciji belinostata od 25 nM vijabilno je 80.9% stanica. Metoda RRR za određivanje sinergije koristi izračunavanje očekivane vrijednosti (OV) učinka dvaju lijekova u kombinaciji prema jednadžbi $OV = N_A \times N_B / 100$ gdje je pri korištenju vijabilnosti stanica kao mjerenog parametra N_A postotak vijabilnih stanica u uzorku tretiranom lijekom A, a N_B postotak vijabilnih stanica u uzorku tretiranom lijekom B.

Na primjeru navedenih koncentracija decitabina i belinostata $OV = 82.2 \times 80.9 / 100$ što iznosi 66.5 %. Jednadžba za RRR glasi: $RRR = AV / OV$, gdje je AV aktualna vrijednost. U gore navedenom eksperimentu u uzorcima s kombinacijom 0.625 μ M decitabina i 25 nM belinostata vijabilno je bilo prosječno 54.9% pa je prema tome $RRR = 54.9 / 66.5$ što iznosi 0.8. Nakon 72 h inkubacije s 1.25 μ M decitabina (Slika 15c) vijabilno je bilo 61.1 % stanica, s 50 nM belinostata

68.2 %. OV njihovog zajedničkog učinka bila bi dakle 41.7 %. Kako je AV iznosila samo 28% RRR vrijednost zajedničkog učinka belinostata i decitabina je bila 0.6. Obje vrijednosti označuju sinergizam u djelovanju navedenih lijekova.



Slika 15. Određivanje sinergizma belinostata i decitabina izračunavanjem omjera relativnog rizika (RRR). Ly10 stanična linija je tretirana različitim koncentracijama navedenih lijekova samostalno i u kombinaciji, te je stanična vijabilnost analizirana mjerenjem luminiscencije u tri vremenska perioda: a) 24h; b) 48h; c) 72h. Prikazane su koncentracijske krivulje lijekova samostalno i u kombinaciji kao prosjek postotka vijabilnosti uzoraka normaliziran prema netretiranoj kontroli uz standardnu devijaciju. Na apscisi su označene koncentracije decitabina u mikromolima i belinostata u nanomolima. U gornjem desnom kvadrantu svakog grafičkog prikaza se nalazi izračunata vrijednost RRR.

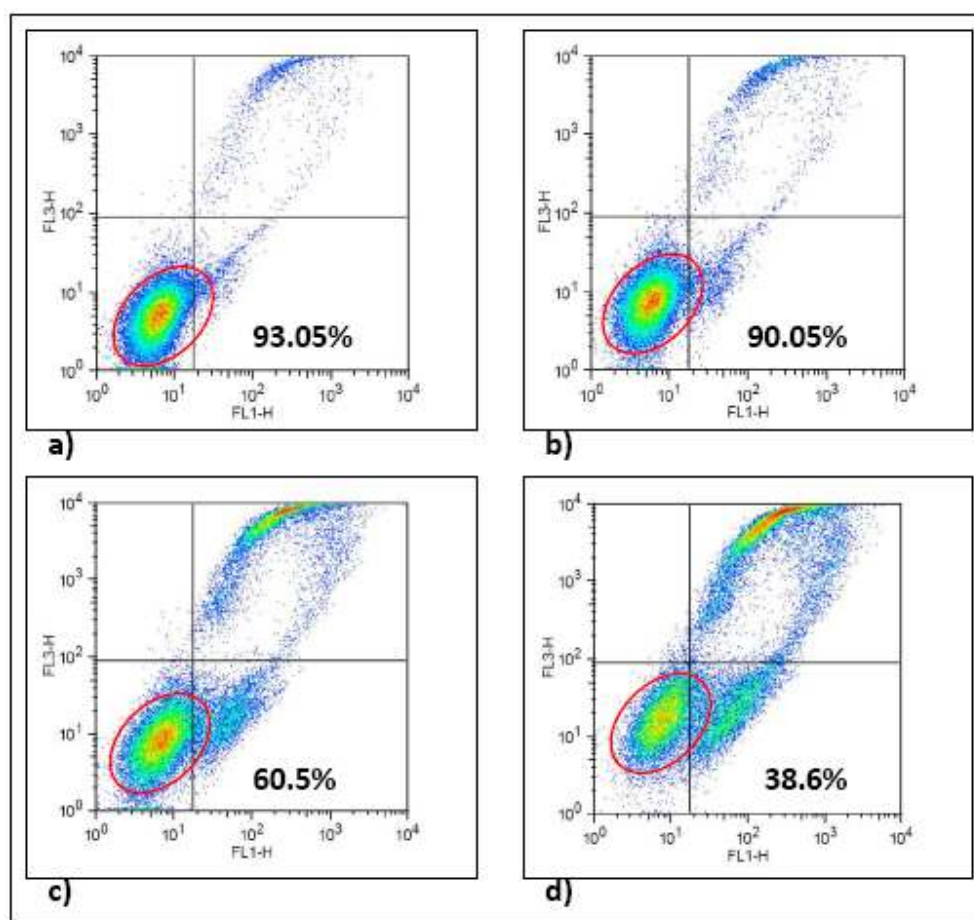
	RRR vrijednosti					
HDACi	stanična linija					
	Ly1	Ly7	Ly10	Su-DHL6	RIVA	HBL-1
panobinostat	0.6	0.01	0.8	0.7	0.9	0.9
belinostat	0.4	0.5	0.6	0.8	0.9	0.9
depsipeptid	0.5	0.02	0.5	0.7	1.0	0.9
vorinostat	0.6	0.2	0.9	1.0	0.9	0.9

Tablica 5. RRR vrijednosti izračunate mjerenjem citotoksičnog učinka kombinacije decitabina s HDACi. Prikazane vrijednosti označuju najnižu dobivenu vrijednost u jednom od tri vremenska perioda inkubacije (24, 48 ili 72h) kada je luminiscentno analizirana vijabilnost. Vrijednosti RRR <1 označuju sinergizam.

Istom metodologijom izračunate su vrijednosti RRR za svih 6 limfomskih staničnih linija te sva 4 inhibitora histonske deacetilaze u kombinaciji s decitabinom u tri vremenska perioda. Za svaki od HDACi učinjen je isti pokus gdje je ispitivan učinak lijeka samostalno i u kombinaciji s decitabinom u koncentracijama s obje strane IC₅₀ pojedinog lijeka na njegovoj koncentracijskoj krivulji. Učinak na vijabilnost stanica je analiziran u tri vremenska perioda: 24, 48 i 72h, te je za svaku koncentraciju u datom vremenskom trenutku izračunat RRR. Rezultati su prikazani u Tablici 5. U sklopu ovog istraživanja analiziran je i sinergistički učinak decitabina s još 2 inhibitora histonske acetilaze (MS-275 i Scriptaid) u Ly1 i Ly10 staničnim linijama također u tri vremenska perioda (24, 48 i 72h). Zabilježene vrijednosti RRR i za ova dva inhibitora histonske deacetilaze su bile niže od 1.

Analiza sinergističkog učinka HDACi i decitabina učinjena je i računanjem vrijednosti RRR za apoptotički učinak koji ova kombinacija polučuje u limfomskim stanicama. Postotak apoptotičkih stanica je izmjeren protočnom citometrijom pomoću PI i YO-Pro-1 nuklearnih boja. Na Slici 16 je prikazan reprezentativan pokus analize apoptotičkog učinka decitabina i panobinostata nakon 48h inkubacije u Ly1 staničnoj liniji. Pri koncentraciji panobinostata od 5 nM samostalno apoptoza se zbiva u 9.95% stanica, a pri 5 μ M decitabina samostalno u 39.5% stanica. Zajednički učinak navedenih koncentracija lijekova polučuje apoptozu u 61.4% stanica.

OV u uzorku tretiranom kombinacijom lijekova bi prema gore navedenoj jednadžbi iznosila 54.48%. Kako je AV iznosila 38.6%, vrijednost RRR za kombinaciju ovih koncentracija iznosi 0.7. U slučaju normalizacije prema kontroli, vijabilnost stanica u uzorku tretiranom panobinostatom iznosi 96.7%, a u uzorku s decitabinom 65%. OV bi prema tome bila 62.85%. Budući AV normalizirana prema kontroli iznosi 41.48%, RRR iznosi 0.6.



Slika 16. Apoptotički učinak panobinostata i decitabina nakon 48h inkubacije u Ly1 staničnoj liniji analiziran protočnom citometrijom u prikazu pseudobojom (PI i Yo-Pro-1 nuklearne boje): a) netretirana kontrola; b) u uzorku inkubiranom s panobinostatom u koncentraciji od 5 nM apoptotično je 9.95%; c) u uzorku inkubiranom s decitabinom u koncentraciji od 5 μ M apoptotično je 39.5% stanica; d) u uzorku inkubiranom s kombinacijom ovih koncentracija apoptotično je 61.4% limfomskih stanica. Vrijednost RRR nakon normalizacije prema netretiranoj kontroli iznosi 0.6.

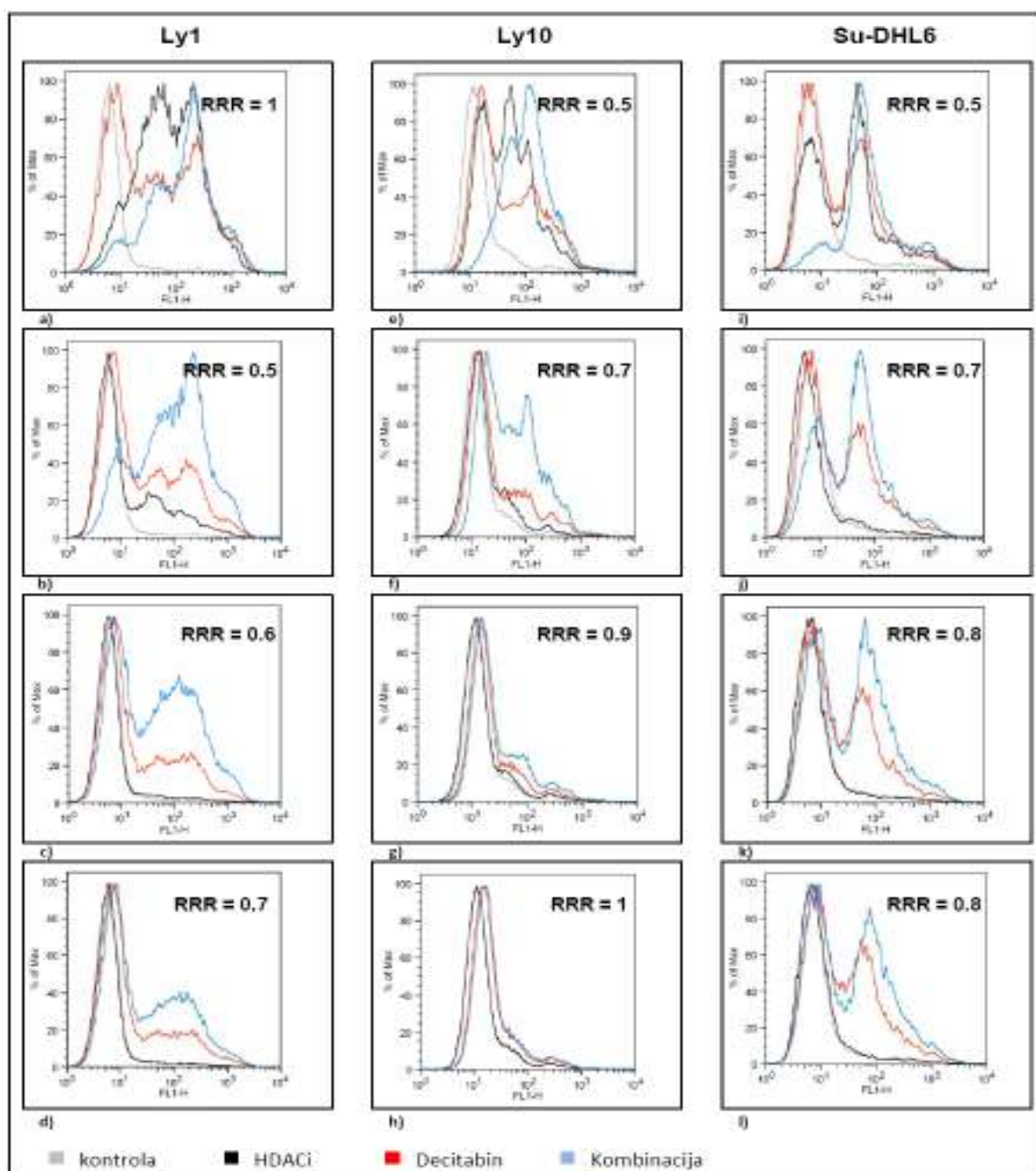
Dobivene vrijednosti RRR izračunate analizom apoptotičkog učinka panobinostata, ostalih HDACi i decitabina mjerenog protočnom citometrijom u Ly1 i ostalim limfomskim staničnim linijama zbirno su prikazane na Tablici 6.

Ovime je dokazan sinergistički učinak inhibitora histonske deacetilaze i decitabina i u inhibiciji rasta i diobe limfomskih stanica i u indukciji apoptoze.

	Vrijednosti RRR					
HDACi	stanična linija					
	Ly1	Ly7	Ly10	Su-DHL6	RIVA	HBL-1
panobinostat	0.3	0.1	0.4	0.4	0.8	1.0
belinostat	0.2	0.4	0.8	0.7	0.9	1.0
romidepsin	0.4	0.1	0.1	0.4	0.9	1.0
vorinostat	0.4	0.2	0.2	0.5	0.9	1.0

Tablica 6. RRR vrijednosti izračunate mjerenjem apoptotičkog učinka kombinacije decitabina s HDACi. Prikazane vrijednosti označuju najnižu dobivenu vrijednost u jednom od tri vremenska perioda inkubacije (24, 48 ili 72h) kada je protočnom citometrijom analizirana indikcija apoptoze. Vrijednosti RRR <1 označuju sinergizam.

RRR izračunat vrijednostima dobivenim analizom apoptoze metodom protočne citometrije se kao i u luminometrijskom pristupu bazira na analiziranju više koncentracija lijekova duž koncentracijske krivulje svakog pojedinog lijeka s obje strane IC50 vrijednosti. Histogramski prikaz apoptotičkog učinka lijekova samostalno i u kombinaciji u više koncentracija duž koncentracijskih krivulja lijekova predstavljen je na Slici 17. Ovim prikazom na apscisi je prikazan signal stanica u FL1 kanalu, a na ordinati postotak stanica. Pomicanje stanica udesno na apscisi označuje apoptozu. Na Slici 17 a-d) prikazan je učinak panobinostata i decitabina u Ly1 liniji nakon 48 sati inkubacije, na Slici 17 e-h) učinak panobinostata i decitabina u Ly10 liniji nakon 48h, a na Slici 17 i-l) učinak vorinostata i decitabina u Su-DHL6 liniji nakon 72h.

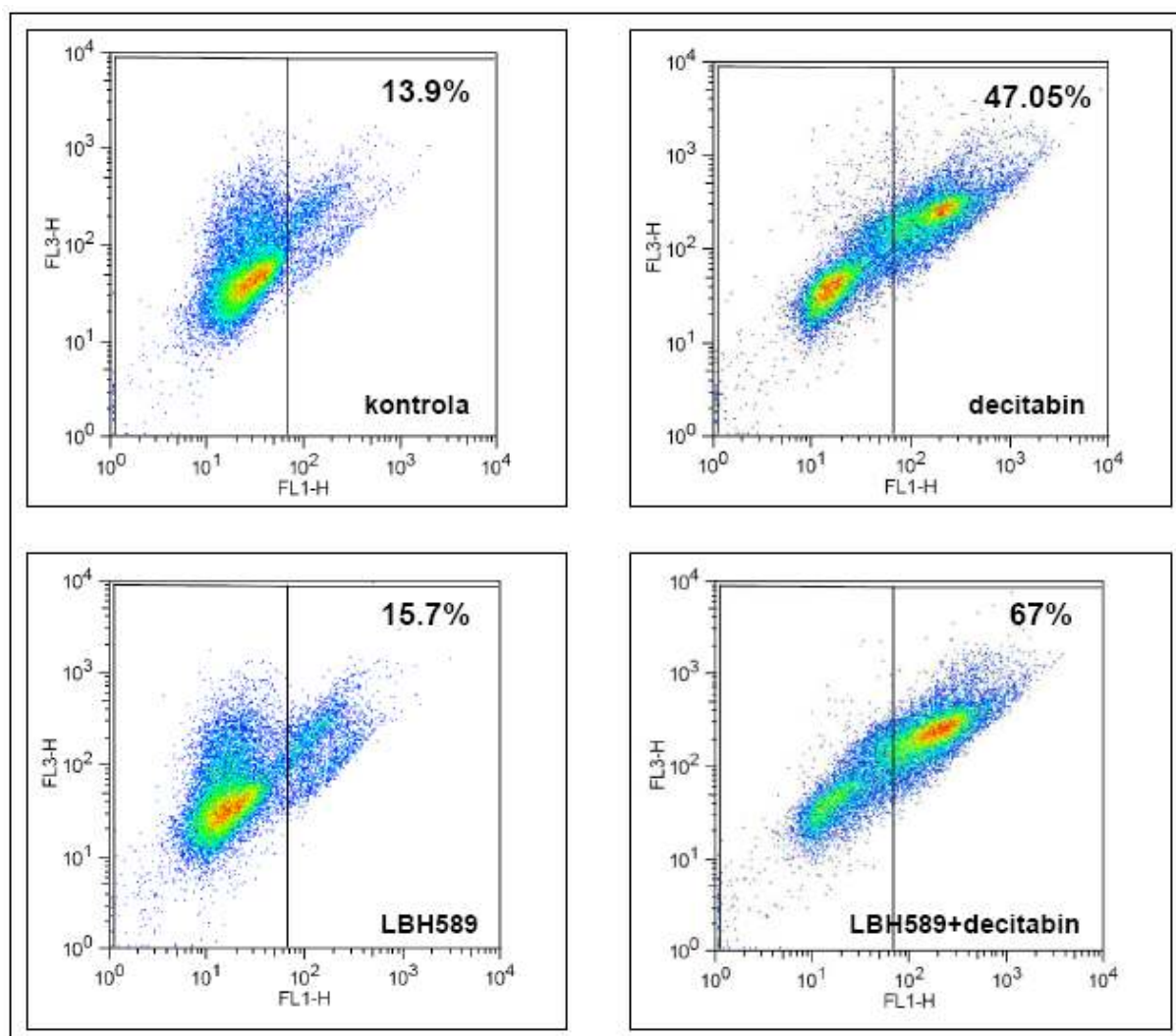


Slika 17. Histogramski prikaz apoptotičkog učinka decitabina i HDACi (samostalno i u kombinaciji) na limfomske stanice: a-d) zajedničkim učinkom panobinostat i decitabin nakon 48h induciraju apoptozu u Ly1 liniji u većem omjeru od pojedinog lijeka samostalno. Koncentracije se kreću od viših (a) prema nižima (d); e-f) kombinacija panobinostatata i decitabina u Ly10 liniji (48h); i-l) kombinacija vorinostatata i decitabina u Su-DHL6 liniji (72h). Korištene su slijedeće koncentracije: Ly1 – panobinostat: 20, 10, 5, 2.5 nM, decitabin: 20, 10, 5, 2.5 μ M; u Ly10 – panobinostat: 4, 2.5, 1.25, 0.625 nM, decitabin: 5, 2.5, 1.25, 0.625 μ M; Su-DHL6 – vorinostat: 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 μ M, decitabin: 10, 7.5, 5, 2.5 μ M.

U sve tri linije je sivom bojom označen je signal stanica netretirane kontrole, crnom signal stanica tretiranih inhibitorom histonske deacetilaze (panobinostat u Ly1 i Ly10, vorinostat u Su-DHL6), crvenom signal stanica tretiranih decitabinom, a plavom signal stanica tretiranih kombinacijom lijekova. Koncentracije lijekova u svakoj staničnoj liniji se kreću od najviših prikazanih u Slici 17 a), e) i i), prema najnižima na Slici 17 d), h) i l). Na primjeru Ly10 stanične linije sinergistički učinak lijekova u kombinaciji je izražen pri višim koncentracijama lijekova (4 nM panobinostata i 5 μ M decitabina – Slika 17 e), a opada proporcionalno s koncentracijom lijekova (0.625 nM panobinostata i 0.625 μ M decitabina – Slika 17 h).

5.1.4. Aktivacija kaspaznog sustava u limfomskim stanicama

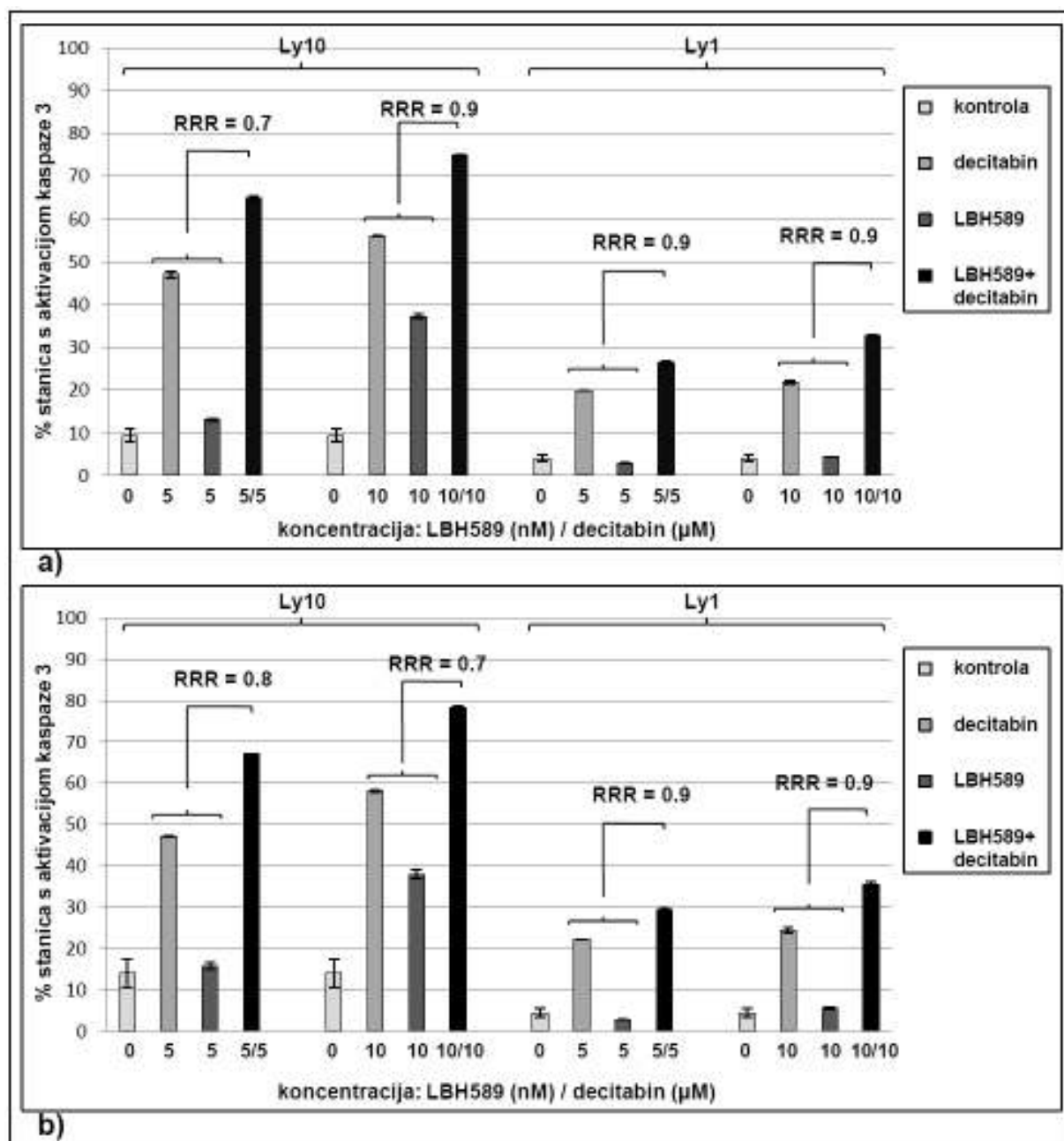
Kaspazni sustav je obitelj bjelančevina s funkcijom cisteinskih proteaza. Nakon pozitivnog signala za aktivaciju inicijalne kaspaze bivaju skraćene za inaktivacijsku aminokiselinsku sekvencu. Ovaj proces aktivira njihovu proteaznu aktivnost dovodeći do kaskade proteaznog skraćivanja i aktivacije ostalih kaspaza koja u konačnici rezultira programiranom smrću stanice. Sama inicijacija procesa aktivacije kaspaza obuhvaća jedan od dva puta aktivacije: unutarnji (mitohondrijski) ili vanjski put aktivacije kaspaza. U unutarnjem putu, promjene u transmembranskom mitohondrijskom potencijalu dovode do oslobađanja proapoptogenih mitohondrijskih bjelančevina poput citokroma C i aktivacije kaspaze 9⁶³. U vanjskom putu aktivacije kaspaza, ključnu ulogu ima TRAIL (eng. – tumour necrosis factor related apoptosis inducing ligand), vezujući se za jedan od tzv. receptora smrti na površini stanice i pokrećući slijed događaja koji rezultira aktivacijom kaspaze 8⁶⁴. Oba puta aktivacije kaspaza se spajaju u tzv. efektorskoj kaspazi 3, nakon čega signal biva prenesen u jezgru gdje se pokreće smrt stanice⁶⁵.



Slika 18. Analiza aktivacije kaspaznog sustava (efektorska kaspaza 3) u limfocitima (Ly10 linija) posredovana panobinostatom (LBH589) i decitabinom u citometrijskom prikazu pseudobojom u standardnim FL1 i FL3 kanalima. U ovom pokusu korištene su koncentracije panobinostata od 5 nM i decitabina od 5 μ M, a aktivacija kaspaze 3 je analizirana protočnom citometrijom nakon 72h inkubacije s lijekovima. Najveći postotak aktivirane kaspaze 3 prisutan je u uzorku tretiranom kombinacijom inhibitora histonske deacetilaze i decitabina (67%), za razliku od uzorka tretiranog decitabinom samostalno (47.05%) ili panobinostatom samostalno (15.7%).

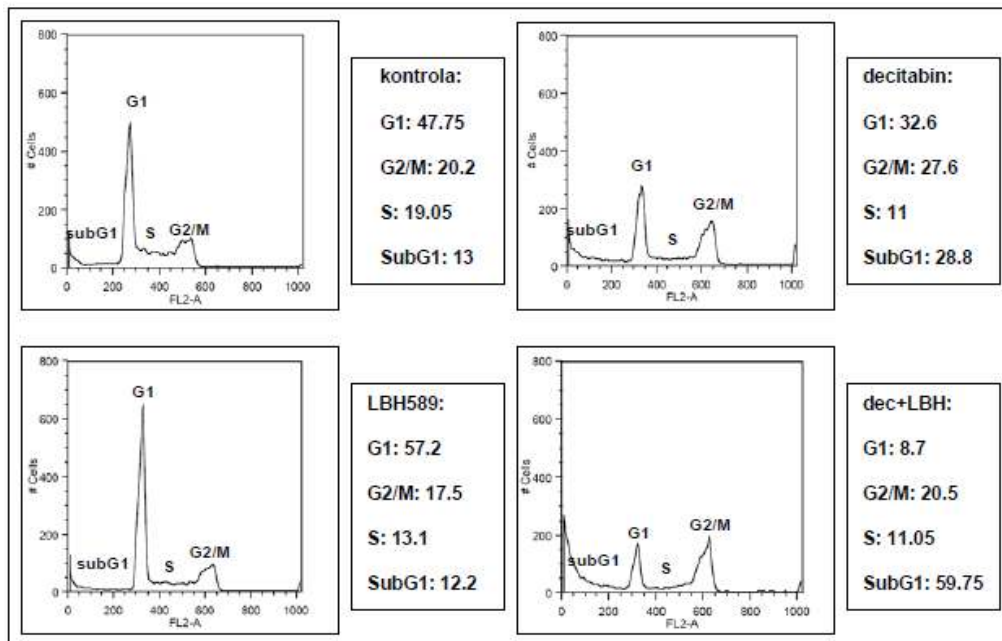
Na Slici 18 prikazana je aktivacija kaspaze 3 u limfomskim stanicama (Ly10 stanična linija) tretiranim panobinostatom (LBH589) i decitabinom samostalno ili u kombinaciji. Stanice u kojima je došlo do programirane smrti stanice posredovane aktivacijom kaspaze 3 se u citometrijskom prikazu pseudobojom pomiču udesno u FL1 kanalu. Ovo pomicanje udesno je posredovano ireverzibilnim vezivanjem FITC-DEVD-FMK za aktiviranu kaspazu 3. FITC-DEVD-FMK se za kaspazu 3 veže posredstvom DEVD aminokiselinske sekvence (Asp-Val-Glu-Asp), a signal stanica se u FL1 kanalu pomiče zbog apsorpcije FITC zelene fluorescentne boje vezane za DEVD-FMK. U uzorcima tretiranim decitabinom samostalno i u kombinaciji s panobinostatom jasno su vidljive dvije populacije stanica – jedna na aktiviranu kaspazu 3 negativna i druga, na aktiviranu kaspazu 3 pozitivna populacija. Populacija s aktiviranom kaspazom 3 u uzorku tretiranom kombinacijom lijekova (67%) je značajno veća u odnosu na istu populaciju u uzorku tretiranom decitabinom samostalno (47.05%), $p < 0.05$.

Slika 19 prikazuje brojčane vrijednosti koje predstavljaju prosječni postotak stanica s aktiviranom kaspazom 3 u različito tretiranim uzorcima uspoređene međusobno. Izračunati RRR je u oba vremenska perioda (48 i 72h) i u obje limfomske linije (Ly10 i Ly1) iznosio manje od 1, što dokazuje sinergizam u djelovanju HDACi i decitabina i u procesu aktivacije kaspaznog sustava.



Slika 19. Grafički prikaz aktivacije kaspaze 3 u limfomskim stanicama posredovane panobinostatom (LBH589) i decitabinom: a) nakon 48h inkubacije u obje limfomske linije vidljiva je aktivacija kaspaze 3 u uzorku s decitabinom samostalno i u kombinaciji s panobinostatom. Vrijednosti RRR su manje od 0.1 za obje koncentracije lijekova; b) 72h. Prikazane su prosječne vrijednosti postotka stanica s aktiviranom kaspazom 3 uz standardnu devijaciju.

5.1.5. Analiza staničnog ciklusa



Slika 20. Analiza staničnog ciklusa limfomskih stanica (Ly1) nakon inkubacije s panobinostatom i decitabinom. Panobinostat nakon inkubacije od 16h uzrokuje povećanje frakcije stanica u G1 fazi staničnog ciklusa. Decitabin samostalno i u kombinaciji s panobinostatom uzrokuje značajno smanjenje postotka stanica u G1 fazi povećanje postotka stanica u G2/M fazi (decitabin samostalno) i subG1 fazi (značajnije u uzorku tretiranom kombinacijom nego u uzorku tretiranom decitabinom samostalno). Prikazan je reprezentativan pokus, a korištene su slijedeće koncentracije: panobinostat 5 nM, decitabin 5 μ M.

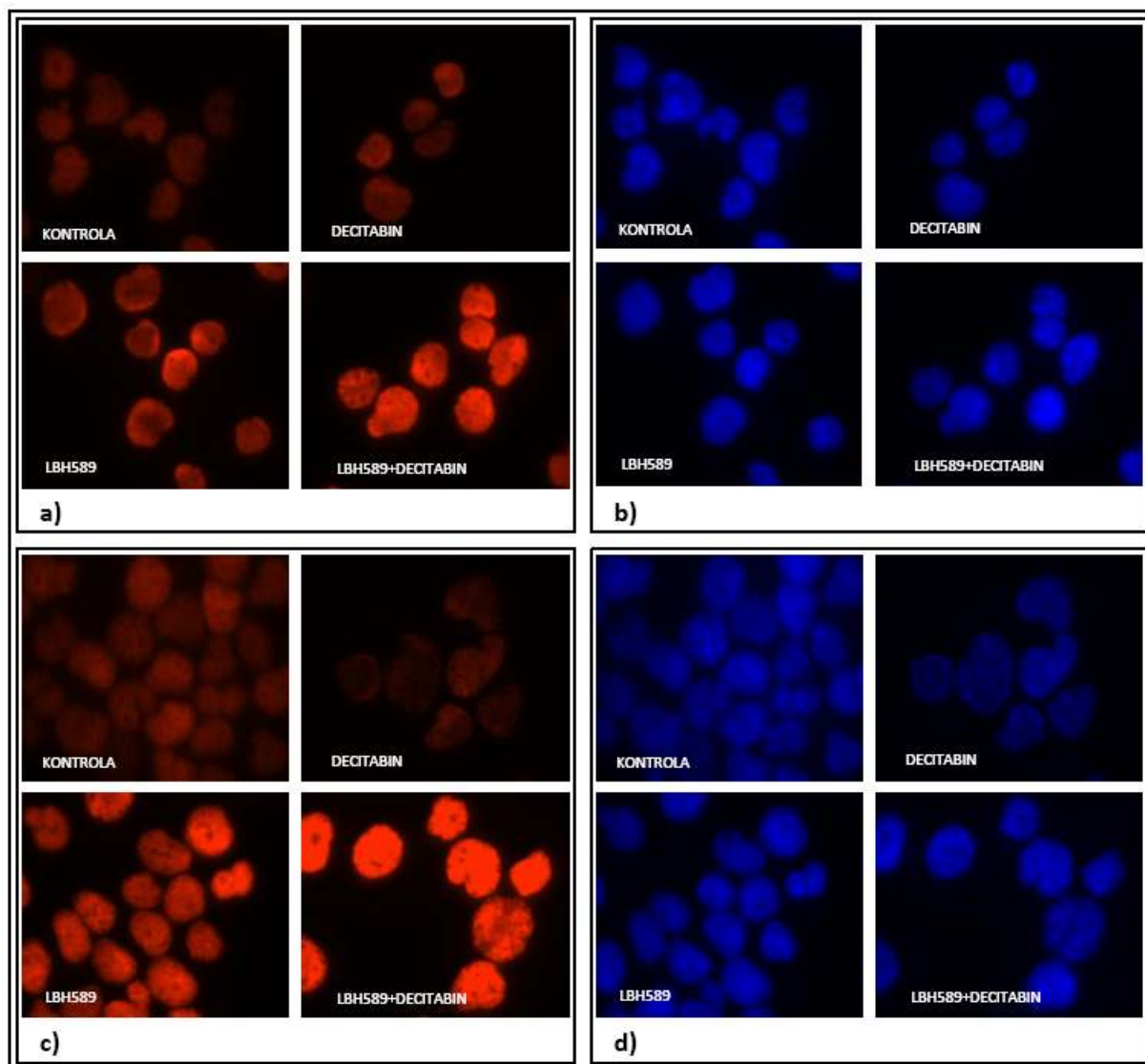
Stanični ciklus je slijed događaja u stanici koji kulminiraju diobom. Sastoji se od slijedećih faza: G1, G0, S, G2 i M. G1 faza je obilježena pojačanom biosintetskom aktivnošću sa sintezom brojnih enzima koji će stanici biti potrebni tijekom DNK replikacije kasnije u tijeku ciklusa. Stanice koje se ne repliciraju poput neurona su u G0 fazi staničnog ciklusa (fazi mirovanja), obilježenom izostankom pojačane biosintetske aktivnosti. S faza je obilježena

početkom sinteze DNK, a završava trenutkom kada svaka stanica sadrži udvostručenu količinu DNK s dvostrukim brojem kromosoma. G2 slijedi nakon S faze i traje do trenutka kada stanica uđe u mitozu. Tijekom G2 faze ponovno se javlja pojačana sinteza bjelančevina, većinom mikrotubula. M faza odnosno mitozu je obilježena podjelom jezgre i citoplazme⁶⁶. Smatra se da disregulacija staničnog ciklusa može dovesti do nastanka tumora kada je djelovanje molekula koje kontroliraju progresiju iz faze u fazu promijenjeno ili smanjeno. Jedna od bitnih karakteristika antineoplastičnih lijekova jest da uzrokuju zastoj malignih stanica u pojedinoj od faza staničnog ciklusa i tako predstavljaju farmakološku alternativu normalnoj regulaciji staničnog ciklusa poremećenoj u malignim stanicama.

U našem pokusu, stanice su s lijekovima od interesa (panobinostat u koncentraciji od 5 nM i decitabin u koncentraciji od 5 μ M) inkubirane kroz 16 sati, te je stanični ciklus određen citometrijskom analizom koristeći staničnu apsorpciju propidij joda. Kao što je vidljivo na Slici 20 panobinostat i decitabin imaju različit učinak na stanični ciklus. Panobinostat dovodi do zastoja limfomskih stanica u G1 fazi staničnog ciklusa, dok decitabin uzrokuje apsolutan i relativan zastoj u G2 fazi staničnog ciklusa. Apsolutan zastoj označuje povećanje ukupnog broja stanica u G2 fazi staničnog ciklusa u odnosu na netretiranu kontrolu, dok relativan označuje veliki postotak stanica u tzv sub-G1 fazi koja označuje mrtve i apoptotične stanice lijevo od G1 vrhunca u FL2A kanalu. Sličan učinak može se opaziti i u uzorku tretiranom kombinacijom decitabina i panobinostata uz značajno povećanje broja stanica u sub-G1 fazi.

5.1.6. Učinak kombinacije panobinostata i decitabina na acetilaciju histona

Dokaz acetilacije histona Western blottingom je standard kojim se mjeri aktivnost svakog inhibitora histonske deacetilaze i koji je potreban da bi nove molekule dobile sam naziv inhibitora histonske deacetilaze^{67,68}. Svi od inhibitora histonske deacetilaze korištenih u ovom istraživanju su sposobni izazvati pojačanu acetilaciju histona u odnosu na netretiranu kontrolu. U ovom istraživanju htio sam istražiti koji je učinak kombinacije HDACi i decitabina na acetilaciju histona u malignim limfomskim stanicama.

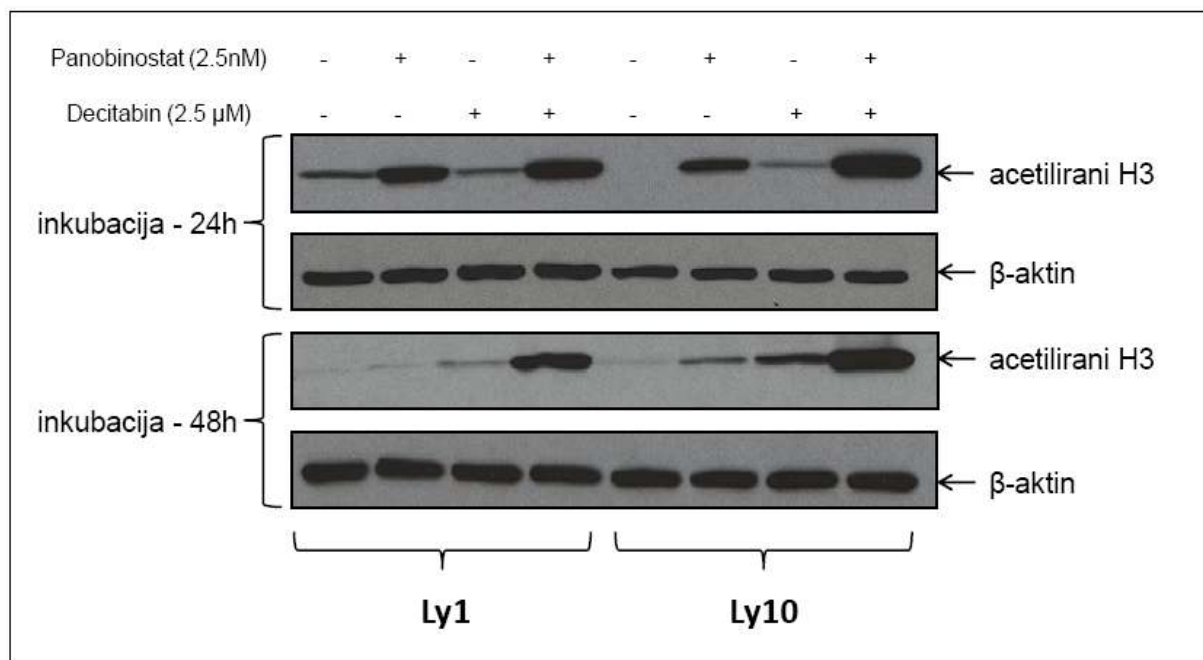


Slika 21. Imunofluorescentnim mikroskopom dokazana pojačana acetilacija histona H3 u limfomskim stanicama tretiranim kombinacijom panobinostata (2.5 nM) i decitabina (2.5 μ M) u odnosu na lijekove pojedinačno: a) jednaka vremenska ekspozicija različito tretiranih stanica Ly1 stanične linije prikazuje pojačanu acetilaciju H3 u uzorku tretiranom kombinacijom panobinostata i decitabina nakon 24h u istim stanicama; b) Stanice Ly1 linije obilježene nuklearnim markerom 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI) otkrivaju lokalizaciju jezgre; c) jednaka vremenska ekspozicija različito tretiranih stanica Ly10 stanične linije prikazuje pojačanu acetilaciju H3 u uzorku tretiranom kombinacijom panobinostata i decitabina nakon 48h; d) Stanice Ly10 linije obilježene nuklearnim markerom DAPI otkrivaju lokalizaciju jezgre.

Na slici 21 prikazana je analiza učinka panobinostata i decitabina samostalno i u kombinaciji na acetilaciju histona imunofluorescentnim mikroskopom. Limfomske stanice (Ly1 i Ly10 stanične linije) tretirane su navedenim lijekovima samostalno i u kombinaciji kroz 2 vremenska perioda (24 i 48 sati). Nakon inkubacije, stanice su inkubirane s primarnim protutijelom usmjerenim protiv acetiliranog histona H3 (sintetiziranog imunizacijom kunića na ljudske histone H3 acetilirane na lizinskom aminokiselinskom ostatku 9) i sekundarnim, cijaninom obilježenim protutijelom usmjerenim na bjelančevine kunića. Analiza učinjena imunofluorescentnim mikroskopom je pokazala da laserska ekspozicija protutijelima obilježenih stanica u jednakom vremenskom intervalu otkriva intenzivniji signal acetiliranih histonskih bjelančevina H3 u uzorku tretiranom kombinacijom HDACi i decitabina od bilo kojeg drugog uzorka (panobinostat samostalno, decitabin samostalno, netretirana kontrola). Slika 21 a) prikazuje acetilaciju histona H3 u Ly1 limfomskoj liniji u četiri skupine uzoraka, a Slika 21 b) signal nuklearnog markera 4',6-diamidino-2-fenilindola (DAPI) koji služi kao pozitivna kontrola za lokalizaciju jezgre. Pojačana acetilacija histona dokazana je i u Ly10 staničnoj liniji (Slika 21 c) uz DAPI kao pozitivnu kontrolu (Slika 21 d).

Ovaj učinak je potvrđen i Western blottingom kao standardom, gdje su bjelančevine iz četiri različito tretirana uzorka limfomskih stanica (Ly1 i Ly10) nakon elektroforeze na gradijentnom (4-20%) SDS-PAGE gelu i prijenosa na nitrocelulozne membrane inkubirane s primarnim protutijelom usmjerenim na acetilirani H3, sintetiziranim u kuniću. Inkubacija s peroksidazom hrena obilježenim sekundarnim protutijelom usmjerenim protiv bjelančevina kunića te ekspozicija roentgenogramskih filmova membranama kvantitativno potvrđuje pojačani učinak kombinacije panobinostata i decitabina na acetilaciju histona u odnosu na lijekove pojedinačno (Slika 22), kvalitativno dokazan u pokusu s analizom acetilacije histona H3 imunofluorescentnim mikroskopom. Zanimljiv je i učinak decitabina samostalno koji, posebno nakon duže ekspozicije tretiranih stanica, uzrokuje pojačanu acetilaciju histona (Slika 22).

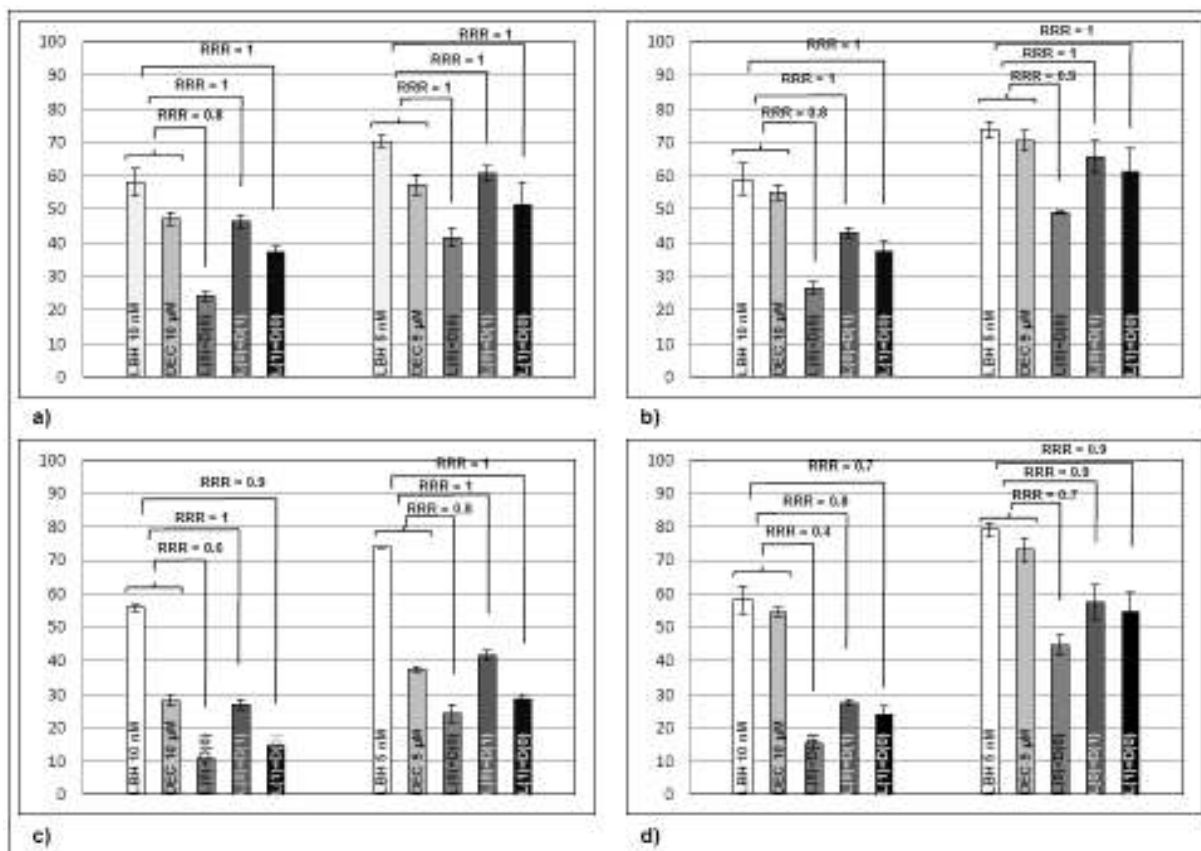
U oba pokusa (imunofluorescencija i Western) su korištene slijedeće koncentracije lijekova: panobinostat 2.5 nM i decitabin 2.5 μ M.



Slika 22. Western blot analiza acetilacije histona H3 u limfomskim stanicama tretiranim panobinostatom i decitabinom samostalno ili u kombinaciji. Uz jednaku količinu bjelancevina u svakom uzorku (potvrđenom određivanjem količine β -aktina) vidljiva je pojačana acetilacija H3 u uzorku tretiranom kombinacijom u dva vremenska intervala inkubacije (24 i 48h).

5.1.7. Utjecaj redoslijeda primjene panobinostata i decitabina na vijabilnost stanica

Redoslijed i raspored primjene lijekova u polikemoterapijskim protokolima mogu imati značajan utjecaj na djelotvornost terapije, te sam simulacijom uvjeta *in vivo* pokušao ustanoviti ima li raspored primjene HDACi i decitabina, gdje se jedan lijek primjeni ranije od drugog u vremenski značajnom razdoblju (24h), utjecaj na dokazan synergizam inhibitora histonske deacetilaze i decitabina.



Slika 23. Utjecaj redoslijeda primjene panobinostata (LBH589) i decitabina na vijabilnost limfomskih stanica: a) Ly1 stanična linija nakon 48h; b) Ly10 nakon 48h; c) Ly1 nakon 72h; d) Ly10 nakon 72h. LBH – panobinostat, DEC – decitabin, L(0)+D(0) – panobinostat i decitabin dodati u istom trenutku na početku pokusa (0h), L(0)+D(1) – panobinostat je dodati u uzorak na početku pokusa (0h), a decitabin 24h kasnije, L(1)+D(0) – decitabin je dodati u uzorak na početku pokusa, a panobinostat 24h kasnije. Na ordinati je prikazan postotak vijabilnih stanica određen mjerenjem luminiscencije nakon normalizacije prema netretiranoj kontroli. Vrijednosti označuju prosjek uz standardnu devijaciju.

Na Slici 23 su prikazane prosječne vrijednosti vijabilnosti stanica određene mjerenjem luminiscencije u dva vremenska perioda inkubacije – 48 (a i b) i 72h (c i d) za dvije limfomske stanične linije (Ly1 – (a) i (c) i Ly10 – (b) i (d)) te dvije koncentracije panobinostata (10 nM i 5 nM) i decitabina (10 nM i 5 μM). Uz prosjeke vrijednosti vijabilnosti normaliziranih prema kontroli za lijekove pojedinačno i za njihovu kombinaciju, kada se dva lijeka daju istovremeno, vijabilnost je određena i u uzorku u kojem je inkubacija jednim lijekom za 24h prešla dodatku drugog lijeka. Grafičke oznake L(0)+D(1) tako označuju da je inkubacija limfomskih stanica s LBH589

započela na početku eksperimenta (0h), a decitabin je u uzorak dodat nakon 24h. L(1)+D(0) označuje da je u uzorak prvi dodat decitabin, a 24h nakon njega LBH589. Kako je vidljivo iz prikazanih rezultata, niti jedna od navedenih kombinacija redoslijeda dodavanja lijekova s razmakom od 24h u limfomski uzorak nije bila statistički značajnija u smanjenju vijabilnosti stanica od kombinacije kada su oba lijeka dodata u uzorak u istom trenutku.

5.1.8. Kombinacija panobinostata i decitabina u primarnim DLBCL uzorcima

Učinak dokazan u trajnim limfomskim linijama istražen je i u primarnim uzorcima difuznog B-velikostaničnog limfoma. Maligne B-stanice izolirane su Ficoll postupkom i negativnom selekcijom s magnetskim staničnim odabiranjem. U postupku negativne selekcije magnetskim mikrokuglicama s protutijelima usmjerenim protiv CD2, CD14, CD16, CD36, CD43 i CD235a molekula B-stanice su odvojene od T-stanica, NK stanica, makrofaga, neutrofila, monocita, trombocita i eritrocita. Ovako izolirani B-limfociti služe kao primarna linija gdje je postupak ispitivanja potencijalne sinergije HDACi i decitabina jednak onome u trajnim limfomskim linijama. Tablica 7 prikazuje vrijednosti RRR u djelovanju panobinostata i decitabina u indukciji apoptoze u primarnim staničnim linijama analizom putem protočne citometrije.

t (h)	vrijednosti RRR		
	bolesnik 1	bolesnik 2	bolesnik 3
24	0.8	0.8	0.8
48	0.8	0.8	0.8

Tablica 7. Učinak kombinacije panobinostata (LBH589) i decitabina na primarne DLBCL uzorke. B-stanice iz primarnih DLBCL uzoraka izolirane Ficoll postupkom i negativnom selekcijom su tretirane panobinostatom (5nM) i decitabinom (5μM) kroz 24 i 48h, nakon čega je apoptotički učinak lijekova samostalno i u kombinaciji analiziran protočnom citometrijom.

5.2. Kombinacija panobinostata i decitabina u *in vivo* pokusu s ljudskim limfomskim ksenograftom u SCID beige miševima

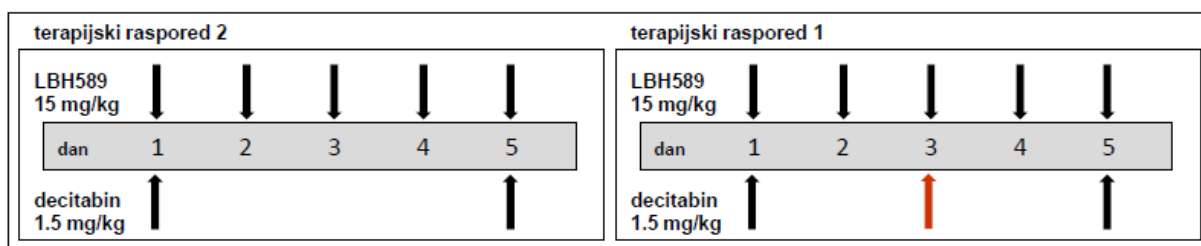
Kombinacijski učinak panobinostata i decitabina istražen je i u *in vivo* pokusu. Koristio sam miševe s teškom kombiniranom imunodeficijencijom (SCID beige vrsta) na čiji je bok injicirano ukupno 10^7 stanica Ly1 limfomske linije.

skupina životinja	terapija
kontrola	fiziološka otopina s 10% DMSO
decitabin samostalno	1.5 mg/kg na dane 1, 3 i 5 u 5 %-tnoj glukozi
panobinostat samostalno	15 mg/kg na dane 1-5 u fiziološkoj otopini s 10% DMSO
kombinacija - terapijski raspored 1	decitabin 1.5 mg/kg na dane 1, 3 i 5 + panobinostat 15 mg/kg na dane 1-5
kombinacija - terapijski raspored 2	decitabin 1.5 mg/kg na dane 1 i 5 + panobinostat 15 mg/kg na dane 1-5

Tablica 8. Skupine SCID beige miševa podijeljene prema obliku terapije koji su primile. Svaka skupina se sastoji od 8 životinja.

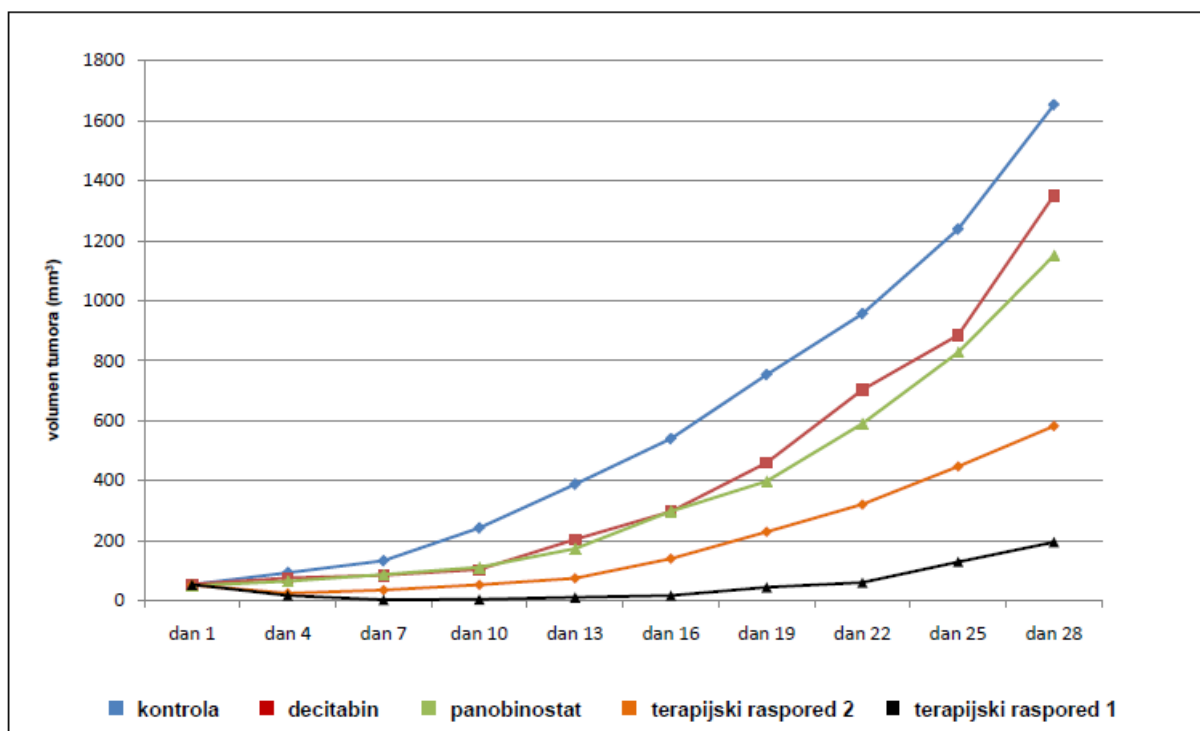
Kako u literaturi ne postoje podaci o optimalnoj dozi navedenih lijekova za ovu vrstu laboratorijskih životinja, prvo je trebalo ispitati maksimalnu tolerabilnu dozu (MTD) panobinostata i decitabina. Prema rasporedu i dozi primijenjenima u drugim vrstama^{69,70} prvi korak u našem pokusu je bio odrediti MTD lijekova. Doze panobinostata od 40 mg/kg 5 dana u tjednu (dan 1.-5.) i decitabina 2.5 mg/kg tri dana u tjednu (dan 1., 3. i 5.), dostupne u literaturi, su bile pretoksične za SCID beige miševe, uzrokovale su gubitak na tjelesnoj težini veći od 20% i smrt životinja. Doze lijekova samostalno određene kao prihvatljive s obzirom na opazivu

toksičnost u životinja (gubitak na tjelesnoj težini, mijelosupresiju) u našem pokusu su: panobinostat 15 mg/kg na dane 1-5 i decitabin 1.5 mg/kg na dane 1, 3 i 5. Inicijalno se pokus sastojao od 4 grupe životinja, ali je zbog pojačane toksičnosti lijekova u kombinaciji uključena još jedna grupa gdje je ukupna doza decitabina smanjena (dnevna doza od 1.5 mg/kg primjenjena je samo na dane 1 i 5). Tako je ukupno postojalo 5 grupa životinja (Tablica 8), a kombinacija lijekova je primjenjena u 2 terapijska rasporeda kako je prikazano na Slici 24.



Slika 24. Dva terapijska rasporeda primjene kombinacije decitabina i panobinostata u pokusu s ljudskim limfomskim ksenograftom u SCID beige miševima: Pri terapijskom rasporedu 1, miševima je intraperitonealno ukupno dato 4.5 mg/kg decitabina u tri jednake doze na dane 1, 3 i 5. Terapijski raspored 2 se sastoji od ukupno 3 mg/kg decitabina raspodijeljenog u dvije jednake doze na dane 1 i 5. Ukupna doza panobinostata (75 mg/kg) podijeljena u pet jednakih dnevni doza se nije mijenjala među terapijskim rasporedima.

Nakon injiciranja 10^7 Ly1 stanica na bok miša i nakon što su volumeni tumora na boku svake životinje dosegli veličinu od 50 mm^3 (izračunati prema formuli $V = 4/3 \pi r^3$), skupine miševa su podijeljene u zasebne kaveze prema obliku terapije koji će primati. Volumen i tjelesna težina svake životinje su mjereni svaki treći dan nakon početka terapije te je rast volumenâ tumorâ do 28 dana prikazan kao prosjek svake grupe na Slici 25. U Tablici 9 zbirno je prikazano stanje po grupama životinja na dan 28. od početka terapije s obzirom na gubitak na tjelesnoj težini, smrtni ishod zbog toksičnosti terapije ili rasta volumena (eutanizirane životinje) i kompletnu remisiju.



Slika 25. Rast ljudskih limfomskih ksenograftâ u SCID beige miševima. Ukupno je bilo pet grupa životinja: a) kontrola koja je primala vektor s 10% DMSO svih 5 dana kad je primjenjivana terapija; b) grupa koja je primala decitabin u dozi od 1.5 mg/kg na dane 1, 3 i 5; c) grupa koja je primala panobinostat u dozi od 15 mg/kg na dane 1-5; d) terapijski raspored 1; e) terapijski raspored 2. Svaki treći dan tijekom trajanja pokusa mjereno je volumena tumora i težina životinja. Grafički su prikazane prosječne vrijednosti volumena tumora za svaku grupu do dana 28 od početka terapije.

U kontrolnoj skupini vidi se progresivan rast tumora do dana 28. od početka terapije kada su tri životinje žrtvovane zbog volumena tumora (volumen tumora > 2000 mm³).

Decitabin samostalno je uzrokovao gubitak na tjelesnoj težini veći od 10% u 3/8 životinja, a na 28. dan od početka terapije jedan je miš eutaniziran zbog veličine tumora.

U grupi tretiranoj panobinostatom samostalno u jedne životinje je zabilježen značajan gubitak tjelesne težine i sve su životinje bile žive na dan 28. od početka terapije.

U grupi na terapijskom rasporedu 1 došlo je do gubitka na tjelesnoj težini većeg od 10% kod 5 miševa. U istoj su skupini tri životinje umrle zbog toksičnosti terapije (dva miša na dan 10.

i jedan na dan 13. od početka terapije). Istodobno, jedina grupa miševa u kojoj je opažena potpuna regresija tumora je bila grupa s ovim terapijskim rasporedom, gdje je ukupno 5/8 životinja postiglo kompletnu remisiju (dva miša na dan 4, tri miša na dan 7), uključujući dvije koje su umrle od toksičnosti terapije kasnije u tijeku pokusa.

Kako je već navedeno, zbog ovog pojačanog toksičnog profila kombinacije panobinostata i decitabina u *in vivo* pokus je uključena i grupa koja je primila kombinaciju lijekova po terapijskom rasporedu 2. U ovoj grupi nije bilo značajnijeg gubitka na tjelesnoj težini i svi su miševi bili živi na dan 28. od početka terapije.

	gubitak na težini > 10%	smrt - toksičnost terapije	smrt – volumen tumora	kompletna remisija
kontrola	0/8	0/8	3/8	0/8
panobinostat	1/8	0/8	0/8	0/8
decitabin	3/8	0/8	1/8	0/8
terapijski raspored 1	5/8	3/8	0/8	5/8
terapijski raspored 2	1/8	0/8	0/8	0/8

Tablica 9. Stanje u *in vivo* pokusu s ljudskim limfomskim ksenograftima u SCID beige miševima tretiranim panobinostatom i decitabinom nakon 28 dana od početka terapije s obzirom na gubitak na tjelesnoj težini, smrtni ishod zbog toksičnosti terapije ili rasta volumena (eutanizirane životinje) i kompletnu remisiju.

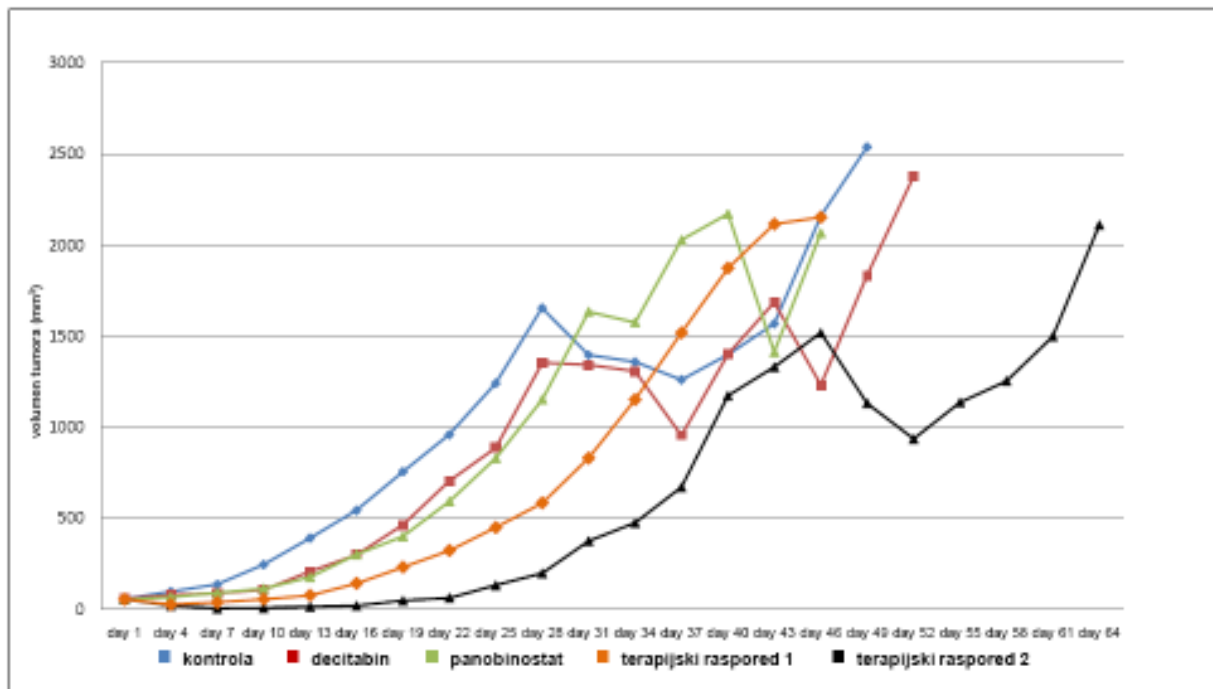
U Tablici 10 zbirno su prikazane vrijednosti statističke značajnosti izračunate Wicoxonovim testom za sve grupe životinja. U gornjem desnom trokutu tablice označenom svijetlo sivom bojom prikazane su p vrijednosti među grupama za prosječni aktualni volumen tumorâ, a u donjem lijevom trokutu označenom tamno sivom bojom p vrijednosti među grupama

za prosječni relativni volumen tumorâ (dobiven dijeljenjem aktualnog volumena s volumenom tumora na dan početka terapije).

	kontrola	lbh589	decitabin	terapijski raspored 2	terapijski raspored 1
kontrola	N.P.	0.1606	0.1049	0.0047	0.0004
lbh589	0.2787	N.P.	0.7210	0.0148	0.0004
decitabin	0.0282	1.0000	N.P.	0.0207	0.0004
terapijski raspored 2	0.0002	0.0105	0.0004	N.P.	0.0004
terapijski raspored 1	0.0004	0.0004	0.0004	0.0007	N.P.

Tablica 10. p vrijednosti za prosjek volumenâ tumorâ meûu grupama različito tretiranih životinja za aktualni (označene svijetlo sivom bojom) i relativne volumene (tamno siva boja).

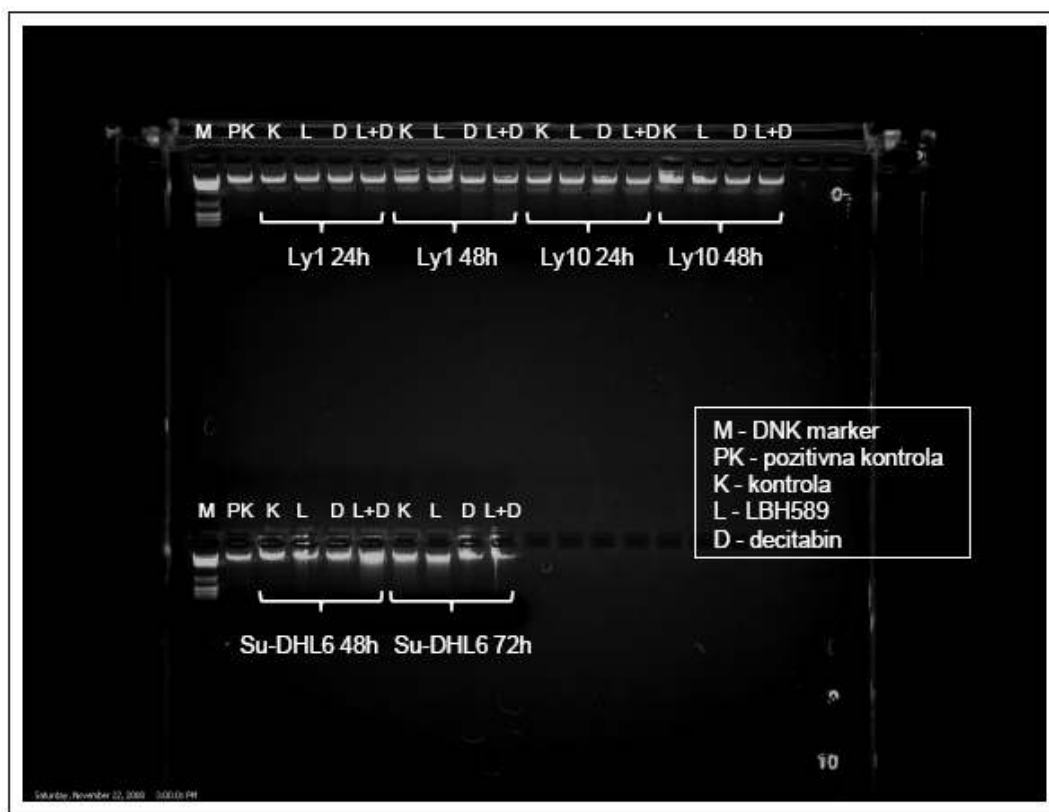
Tijekom statističke analize izračunata je i p vrijednost za površinu pod krivuljom (AUC) odnosno volumen tumora pod krivuljom globalnim testom koristeći trapezoidalno pravilo za aktualne i relativne volumene tijekom čitavog trajanja pokusa (Slika 26). p vrijednosti su bile manje od 0.05 za oba kombinacijska terapijska rasporeda prema lijekovima samostalno i kontroli i za aktualne i za relativne volumene.



Slika 26. Prosječni volumeni tumora tijekom cijelog tajanja pokusa (sve životinje su eutanizirane jer su volumeni tumora prešli veličinu od 2000 mm³). p vrijednosti su bile manje od 0.05 za oba kombinacijska terapijska rasporeda prema lijekovima samostalno i kontroli i za aktualne i za relativne volumene.

5.3. Analiza metilacije genoma u limfomskim stanicama tretiranim inhibitorom histonske deacetilaze i hipometilirajućom tvari

U svrhu razrješenja mehanizma sinergističkog djelovanja inhibitora histonske deacetilaze i hipometilirajuće tvari, učinjena je analiza metilacije čitavog genoma u računalnom programu dChip. Kao platforma za analizu je korišten Illumina HumanMethylation27 mikropostroj sa sposobnošću analize 27 578 probi u području genskih promotora 14 495 gena. Kvaliteta DNK je provjerena spektrofotometrijski i elektroforezom na agaroznom gelu uz bojanje etidij-bromidom (Slika 27)



Slika 27. Fenol-izoamilalkoholom izolirana DNK triju limfomskih linija (Ly1, Ly10 i Su-DHL6) tretiranih panobinostatom i decitabinom nakon elektroforeze na agaroznom gelu obojana etidij-bromidom. Ova DNK je poslužila za analizu metilacije genoma Illumina Humanmethylation27 mikropostrojem.

Prema kriterijima navedenim u Materijalima i metodama analizom u dChip programu dobiven je popis gena s dokazano ili potencijalno značajnom funkcijom u onkogenezi zbirno prikazan u Tablici 11. Hipometiliranost genskih promotora ovih gena je posljedica inkubacije limfomskih stanica samo s kombinacijom panobinostata i decitabina, te je odsutna ili smanjena u uzorcima tretiranim lijekovima samostalno.

Naziv gena	Puno ime gena (Pubmed genome⁷¹)	Lokacija	Funkcija bjelančevine proizvoda gena
MXD4	MAX dimerization protein 4	4p16.3	član MAD obitelji bjelančevina – djeluje kao tumor supresor gen
UBR4	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 4	1p36.13	nepoznata funkcija – veže Rb
SOCS1	suppressor of cytokine signaling 1	16p13.13	član obitelji supresora citokinskih signalnih puteva
PLK3	polo-like kinase 3	1p34.1	serin/treonin kinaza, potencijalna uloga u regulaciji staničnog ciklusa i tumorigenezi
HSPA9B	heat shock 70kDa protein 9 (mortalin)	5q31.1	član obitelji stresnih bjelančevina, regulator stanične proliferacije i bjelančevina pratitelj
HIC1	hypermethylated in cancer 1	17p13.3	tumor supresor gen
SCAND1	SCAN domain containing 1	20q11.1-q11.23	član obitelji bjelančevina koje sadrže SCAN domenu – regulator transkripcijske aktivnosti
CHEK2	CHK2 checkpoint homolog	22q11; 22q12.1	regulator staničnog ciklusa – tumor supresor gen
FOXO3A	forkhead box O3	6q21	član obitelji bjelančevina forkhead – djeluje kao okidač za apoptozu

HTRA2	HtrA serine peptidase 2	2p12	serin proteaza koja djeluje kao inicijator apoptoze
NLK	nemo-like kinase	17q11.2	potencijalni tumor supresor gen
ST7	suppression of tumorigenicity 7	7q31.1-q31.3	nepoznato djelovanje, potencijalno tumor supresor gen
CBFB	core-binding factor, beta subunit	16q22.1	član obitelji bjelančevina PEBP2/CBF koje djeluju kao regulatori transkripcije
BMF	Bcl2 modifying factor	15q14	član obitelji bcl2 bjelančevina, djeluje kao aktivator apoptoze
RNF139	ring finger protein 139	8q24	potencijalni tumor supresor gen
SLC39A3	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 3	19p13.3	nepoznato djelovanje
CDKL3	cyclin-dependent kinase-like 3	5q31	član obitelji CDK bjelančevina, regulator staničnog ciklusa
TAOK2	TAO kinase 2	16p11.2	nepoznato djelovanje
DUSP11	dual specificity phosphatase 11	2p13.2	član obitelji bjelančevina s dvostrukom fosfataznom specifičnošću – negativno reguliraju članove MAP obitelji bjelančevina
AXUD1	cysteine-serine-rich nuclear protein 1	3p22	potencijalni tumor supresor gen
FBXO5	F-box protein 5	6q25.2	član obitelji F-box bjelančevina, regulator staničnog ciklusa
PMAIP1, NOXA	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	18q21.32	bjelančevina s proapoptotičkom aktivnošću
XPC	xeroderma pigmentosum, complementation group C	3p25	tumor supresor gen

MAP3K10	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 10	19q13.2	nepoznato djelovanje
FHL1	four and a half LIM domains 1	Xq26	tumor supresor gen
MPHOSPH6	M-phase phosphoprotein 6	16q23.3	nepoznato djelovanje
RPS6	ribosomal protein S6	9p21	regulator staničnog ciklusa
FHIT	fragile histidine triad gene	3p14.2	član trijade histidinskih gena, bjelančevina proizvod ovog gena sudjeluje u purinskom metabolizmu
RPS18	ribosomal protein S18	6p21.3	nepoznato djelovanje
KBTBD3	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 3	11q22.3	nepoznato djelovanje
CDK9	cyclin-dependent kinase 9	9q34.1	član obitelji CDK bjelančevina
COPS2	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 2	15q21.2	djeluje kao inhibitor stanične proliferacije
DUSP8	dual specificity phosphatase 8	11p15.5	član obitelji bjelančevina s dvostrukom fosfataznom specifičnošću – negativno reguliraju članove MAP obitelji bjelančevina
CDC2L6	cell division cycle 2-like 6	6q21	regulator transkripcijske aktivnosti
H2AFV	H2A histone family, member V	7p13	histonska bjelančevina H2A
CCND1	cyclin D1	11q13	bjelančevina koja regulira prijelaz stanica iz G1 u S fazu staničnog ciklusa

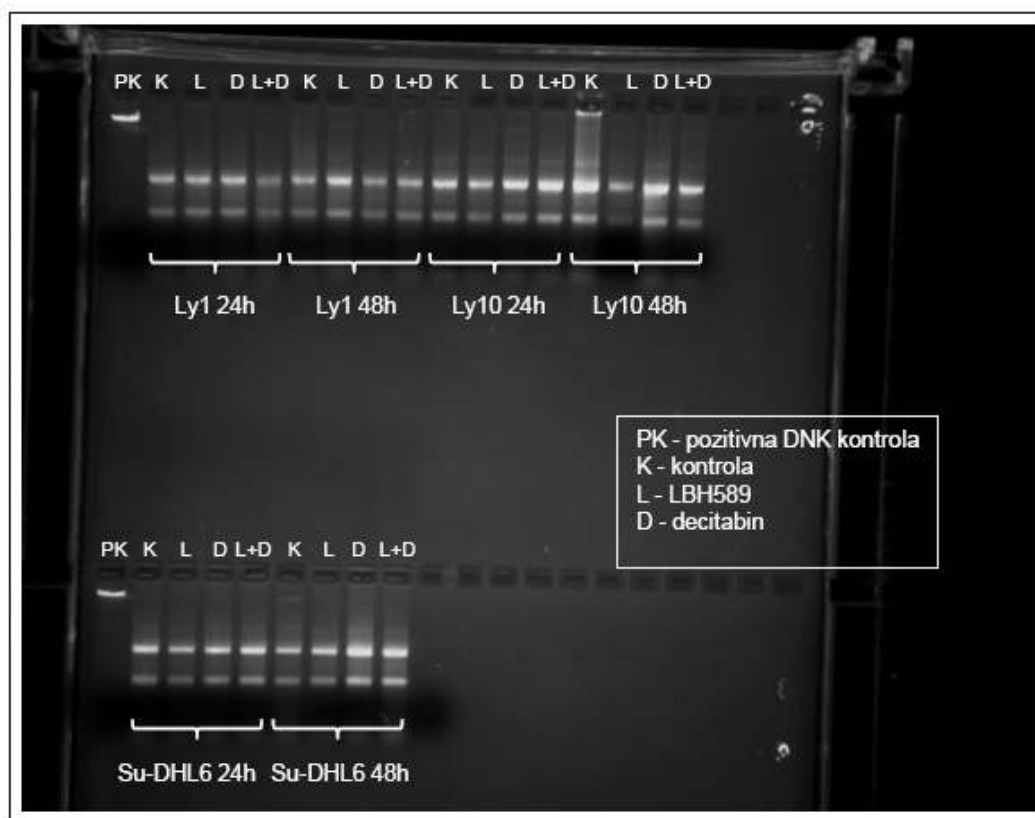
TP73	tumor protein p73	1p36.3	tumor supresor gen, član obitelji bjelančevina iz p53 obitelji, uzrokuje zastoje u staničnoj fazi i apoptozu
ST7L	suppression of tumorigenicity 7 like	1p13.2	nepoznato djelovanje, sličan po funkciji ST7
MPP5	membrane protein, palmitoylated 5	14q23.3	tumor supresor gen
XLF (NHEJ1)	nonhomologous end-joining factor 1	2q35	bjelančevina bitna u popravku dvostrukog loma DNK
PFDN5 (MM1)	prefoldin subunit 5	12q12	suprimira transkripcijsku aktivnost proto-onkogenog c-Myc
CARF (CDKN2AIP)	CDKN2A interacting protein	4q35.1	tumor supresor gen
DENND4A	DENN/MADD domain containing 4A	15q22.31	nepoznato djelovanje
CARS	cysteinyl-tRNA synthetase	11p15.5	tumor supresor gen
PLEKHF2	pleckstrin homology domain containing, family F (with FYVE domain) member 2	8q22.1	facilitator TNF- α posredovanog apoptotičkog učinka
MAK10	MAK10 homolog, amino-acid N-acetyltransferase subunit	9q21.33	bjelančevina s acetilaminotranferaznim djelovanjem
SGOL1	shugoshin-like 1	3p24.3	potencijalni tumor supresor gen
CLK4	CDC-like kinase 4	5q35	član obitelji bjelančevina CLK bitna u kontroli transkripcije
CHAF1B	chromatin assembly factor 1	21q22.13	bjelančevina potrebna pri sintezi histonskih oktamera
CDC14A	CDC14 cell division cycle 14 homolog A	1p21	član obitelji bjelančevina s dvostrukom fosfataznom specifičnošću

MTRF1L	mitochondrial translational release factor 1-like	6q25-q26	nepoznato djelovanje
C12orf5 (TIGAR)	chromosome 12 open reading frame 5	12p13.3	bjelančevina s funkcijom zaštite DNK od oštećenja posredovanih slobodnim kisikovim radikalima
CAV1	caveolin 1	7q31.1	tumor supresor gen koji negativno regulira Ras-p42/44 MAP kinaznu kaskadu
DMTF1	cyclin D binding myb-like transcription factor 1	7q21	tumor supresor gen
PHB	prohibitin	17q21	negativan regulator stanične proliferacije
DUSP10	dual specificity phosphatase 10	1q41	član obitelji bjelančevina s dvostrukom fosfataznom specifičnošću, negativno regulira p38 i SAPK/JNK
TAF12	TAF12 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor	1p35.3	jedna od bjelančevina u osnovnom kompleksu za transkripciju
E2F2	E2F transcription factor 2	1p36	kontrola staničnog ciklusa, tumor supresor gen
PPP2CB	protein phosphatase 2	8p12	negativno kontrolira stanični ciklus i diobu stanica
RB1	retinoblastoma 1	13q14.2	tumor supresor gen
CNKSR2	connector enhancer of kinase suppressor of Ras 2	Xp22.12	kontrola RAS signalnog puta

Tablica 11. Popis gena sa dokazanim CpG otokom u području njihovog genskog promotora čija je metiliranost u uzorku limfomske linije tretirane kombinacijom panobinostata i decitabina reducirana za 1.2 puta u odnosu na kontrolni uzorak, uzorak tretiran panobinostatom samostalno i uzorak tretiran decitabinom samostalno.

5.4. Profiliranje genske ekspresije u limfomskim stanicama tretiranim inhibitorom histonske deacetilaze i hipometilirajućom tvari – korelacija prema metilaciji genoma

Profiliranje genske ekspresije učinjeno je u uzorcima tretiranim jednako kao i onima koji su korišteni u analizi metilacije genoma radi potvrde hipometilacijskog učinka na reaktivaciju metilacijom utišanih gena. Kao platforma za analizu korišten je Illumina HumanHT-12 v3 Expression mikropostroj sa sposobnošću analize 40 000 probi. Kvaliteta RNK je provjerena spektrofotometrijski i elektroforezom na agaroznom gelu uz bojanje etidij-bromidom (Slika 28).



Slika 28. TRIzol reagensom izolirana RNK triju limfomskih linija (Ly1, Ly10 i Su-DHL6) tretiranih panobinostatom i decitabinom nakon elektroforeze na agaroznom gelu obojana etidij-bromidom. Ova RNK je poslužila za analizu genske ekspresije Illumina HumanHT-12 v3 Expression mikropostrojem.

TP73	lbh589	decitabin	lbh+dec
ly1 24h	3.42943	-33.7444	148.428
ly1 48h	23.4526	-20.9845	54.66322
ly10 24h	62.7498	29.6461	90.7514
ly10 48h	-1266.95	-3659.68	3268.392
sudhl6 24h	-87.6813	-201.288	-131.679
sudhl6 48h	13.6743	55.3023	103.186

MXD4	lbh589	decibin	lbh+dec
ly1 24h	18.99596	71.42761	102.8789
ly1 48h	26.69164	27.0923	20.59019
ly10 24h	283.0019	68.36877	155.9889
ly10 48h	98.30075	98.0423	170.8693
sudhl6 24h	117.9726	101.8803	510.5573
sudhl6 48h	212.3187	118.6828	426.3221

CAV1	lbh589	decitabin	lbh+dec
ly1 24h	-8.80152	31.77737	267.4598
ly1 48h	-37.5043	61.88671	101.9467
ly10 24h	77.27061	15.99751	118.1907
ly10 48h	30.90968	-24.0499	57.42065
sudhl6 24h	53.97972	71.74645	53.00215
sudhl6 48h	86.76595	95.97748	166.3982

Tablica 12. Dvostruko povećanje mRNK (označeno podebljanim brojčanim vrijednostima) gena tretiranih kombinacijom panobinostata i decitabina u čijim je genskim promotorima analizom metilacije genoma dokazano smanjenje metiliranosti u 1.2 puta u odnosu na ostala tri uzorka. Prikazan je postotak promjene genske ekspresije za lijekovima tretirane uzorke u odnosu na netretiranu kontrolu.

Od gena u uzorcima tretiranim kombinacijom panobinostata i decitabina, a u području čijih je genskih promotora analizom metilacije dokazana značajna hipometilacija u odnosu na lijekove samostalno i netretiranu kontrolu, profiliranje genske ekspresije je potvrdilo dvostruki porast razine mRNK za tri gena: TP73, MXD4 i CAV1 (Tablica 12).

Proteinski proizvod TP73 gena je p73, član p53 obitelji transkripcijskih čimbenika bitnih u razvoju i staničnom odgovoru na stres. Najvažnija uloga p53 obitelji je funkcija tumor supresora, a obitelj se sastoji od sekvencionalno sličnih bjelančevina p53, p63 i p73. Sekvencionalna sličnost omogućuje p73 i p63 bjelančevinama aktivaciju gena pod kontrolom p53.

Tumor supresorski učinci p53 obitelji jesu: i) aktivacija enzima sa sposobnošću popravka oštećene DNK; ii) zastoj u G1 fazi staničnog ciklusa u kontrolnoj točki na prijelazu G1 u S fazu što omogućuje enzimima za popravak DNK dostatno vrijeme za popravak i u G2 fazi staničnog ciklusa inhibicijom prijelaza G2 faze u mitozu⁷²; iii) inicijaciju apoptoze, u slučaju da su oštećenja DNK prevelika za popravak. Metilacijom utišani TP73 gen je dokazan u Bukittovom limfomu i DLBCL-u⁷³.

MXD4 gen je član MAD obitelji gena koji kodiraju bjelančevine s funkcijom leucinskih zatvarača. Heterodimerizacijom s MAX bjelančevinama formiraju transkripcijske represijske komplekse koji mogu, kako je dokazano u pokusima s glodavcima, funkcionirati kao tumor supresori⁷⁴.

CAV1 (kaveolin 1) je gen čiji je proizvod skelarna (tzv. scaffolding) bjelančevina glavni dio kalveolarnih membrana prisutnih u većini stanica. Dokazana je funkcija ovog gena kao tumor supresora negativnom regulacijom Ras-ERK signalnog puta, a snižena transkripcija ovog gena je dokazana u DLBCL⁷⁵.

6. Rasprava

Tijekom posljednjeg desetljeća jedan od najuzbudljivijih novih pristupa antineoplastičkoj terapiji je epigenetski. Spoznaja da za malignu transformaciju stanice mogu biti odgovorne i mitotski ili/i mejotski naslijedne promjene u funkciji genâ koje se ne mogu objasniti promjenom u slijedu baza DNK (i to barem u jednakom broju kao i genetske promjene)¹⁴ otvorila je brojne nove ciljeve za antineoplastičnu terapiju. Možda najvažnija činjenica koja je ključna za razumijevanje epigenetskih promjena jest da su one potencijalno reverzibilne ciljanom epigenetski usmjerenom terapijom. Hipotetska postavka ovdje glasi da bi vraćanje malignih stanica na normalnu razinu epigenetskih modifikacija dovelo do njihovog sazrijevanja i smrti.

Acetilacija i deacetilacija histonskih bjelančevina ovdje je zauzela vrlo važno mjesto. Smatra se da poremećena ravnoteža u aktivnosti dvaju enzima, histonske acetiltransferaze i histonske deacetilaze, odgovornih za regulaciju acetilacije i deacetilacije histona dovodi do prevage na strani deacetilacije histona. Deacetilirani histoni svojim pozitivnim nabojem jako privlače negativno nabijenu DNK dovodeći do zatvaranja kromatina s posljedičnom smanjenom transkripcijom. Smanjenje transkripcije može biti odgovorno za sniženje koncentracije važnih regulatora staničnog ciklusa, enzima odgovornih za popravak DNK i ostalih bjelančevina s funkcijom tumor supresorâ⁴. Stoga je otkriće da određene poznate kemijske tvari poput butirične i valproične kiseline ili pak dimetilsulfoksida mogu acetilirati histone³¹ otvorilo novi terapijski pristup liječenju malignih bolesti. Acetilacija histona je u ovim prvim pokusima dovela do diferencijacije malignih stanica (eritroleukemijske stanice) i njihove smrti³¹. S obzirom na visoke (molarne) koncentracije ovih molekula potrebne za indukciju apoptoze u malignim stanicama, sintetizirani su višestruko potentniji spojevi skupno nazvani inhibitorima histonske deacetilaze od kojih je najistraživaniji suberoilanolid hidroksumična kiselina (SAHA). Obećavajuća aktivnost SAHA u prvim kliničkim istraživanjima u bolesnika s različitim hematološkim i solidnim novotvorinama je omogućila njezinu registraciju kao lijeka za T-stanične kožne limfome^{36,37}. Isti put su prošle ili prolaze i novije, kemijski različite molekule poput belinostata, panobinostata i depsipeptida.

Metilacija genomske DNK je također epigenetski proces koji je fiziološki poznat i prisutan kao mehanizam inaktivacije normalnoj stanici nepotrebnih gena. Proces kojim se dodavanjem metilnih skupina citozinskim bazama u sklopu CpG otoka u genskom promotoru zaustavlja transkripcija gena kojem navedeni promotor pripada, odgovorna je za utišavanje primjerice

inaktivnog X kromosoma u žena⁹. Isti proces može biti odgovoran i za nastanak malignih stanica u slučaju da metilacijom dolazi do utišavanja tumor supresor gena⁵. Hipometilirajuće tvari su prvotno sintetizirane kao antimetabolička alternativa standardnim kemoterapijskim lijekovima (citozin arabinozid) kako bi se premostila rezistencija malignih stanica⁴⁶. Tek je kasnije otkriveno da se inhibicija rasta malignih stanica, dokazana u brojnim *in vitro* ispitivanjima polučuje i njihovim hipometilirajućim djelovanjem⁴⁷. Hipometilirajuće tvari su kliničku primjenu našle u liječenju mijelodisplastičkog sindroma⁵⁰. Azacitidin je odobren za liječenje MDS-a na osnovi kliničkih istraživanja kojima je dokazano poboljšanje u parametrima ukupnog preživljenja i vremena do razvoja akutne mijeloične leukemije, a klinički je odgovor zabilježen u do 60% bolesnika uključenih u studije⁷⁶. Sličnu aktivnost u MDS-u je pokazao i decitabin⁵⁰.

Čini se da se optimizam proizašao iz djelotvornosti ovih epigenetskih lijekova u pretkliničkim istraživanjima nije u potpunosti preslikao u kliničko okruženje. Epigenetska terapija, naime, nije u u sklopu kliničkih istraživanja I i II faze pokazala djelotvornost jednaku onoj opaženoj u *in vitro* istraživanjima. Stoga je u svrhu optimiziranja učinka ove dvije skupine lijekova, a znajući za poveznicu između epigenetskih procesa na koje utječu, predloženo kombiniranje HDACi i hipometilirajućih tvari. Logička podloga ovim pokusima je nađena u otkrivanju funkcije bjelančevina sa svojstvom vezivanja za metilirane CpG otoke (MBD1, MBD2, MBD3, MeCP2, Kaiso) i njihove poveznice s histonskim deacetilazama²¹ te dokazu procesa metilacije histona²². Hipoteze su pretpostavile da bi njihovo udruženo djelovanje polučilo ne samo aditivan već i sinergistički učinak. Kombinacija HDACi i hipometilirajućih tvari je do sada istraživana u MDS i AML. Bolesnici s MDS i AML su uključivani u klinička istraživanja u kojim je dokazana djelotvornost kombinacije HDACi i hipometilirajućih tvari u povećanju postotka bolesnika koji su klinički odgovorili na terapiju^{53,77}. Do danas nisu pokazani rezultati ove kombinacije epigenetski usmjerenih lijekova u limfomu, pa tako ni u DLBCL.

U ovom istraživanju htio sam istražiti sinergistički učinak inhibitorâ histonske deacetilaze s hipometilirajućim tvarima u *in vitro* i *in vivo* modelima difuznog B-velikostaničnog limfoma. Testovima citotoksičnosti koji analiziraju količinu ATP-a luminiscentnom metodom u limfomskim stanicama prvo sam odredio prozor učinkovitosti i polovicu maksimalne inhibitorne koncentracije svakog od 6 ispitivanih HDACi (panobinostat, vorinostat, depsipeptid, belinostat, scriptaid i MS-275) i 2 hipometilirajuća agensa (decitabin, 5-azacitidin). Djelotvornost HDACi u inhibiranju rasta malignih stanica se mjerila u nanomolima od najpotentnijih depsipeptida i panobinostata do manje potentnih belinostata, vorinostata, MS-275 i Scriptaida. Za hipometilirajuće tvari vrijednosti IC₅₀ su iznosile u mikromolima, a postojale su i limfomske linije koje su bile

rezistentne na 5-azacitidin (Ly1, RIVA) i decitabin (RIVA, HBL-1). Za ostale ispitivane linije decitabin je bio učinkovitiji u inhibiciji rasta malignih stanica od 5-azacitidina. Za sve lijekove je određena vrijednost IC50 u tri vremenska perioda inkubacije (24, 48 i 72h) za 6 staničnih linija DLBCL, a kod svih je opažena ovisnost inhibitornog učinka o vremenu, jače izražena kod hipometilirajućih tvari. Ovako određene vrijednosti omogućile su kombiniranje dviju grupa lijekova koncentracijama nasumice odabranim na koncentracijskoj krivulji prozora učinkovitosti svakog lijeka za svaku staničnu liniju lijevo i desno od vrijednosti IC50. Za svaki lijek u limfomskoj liniji osjetljivoj na njegovo djelovanje je testirana i sposobnost indukcije apoptoze. Protočnom citometrijom (bojanjem propidij-jodom i Yo-Pro-1 bojom) izmjerili smo postotak apoptotičnih i mrtvih stanica za svaku staničnu liniju također u tri vremenska perioda inkubacije (24, 48 i 72h). Ove vrijednosti su slično kao kod testova citotoksičnosti iskorištene u slijedećem koraku istraživanja – mjerenju sinergističkog učinka HDACi i decitabina u indukciji apoptoze malignih stanica nasumično odabranim koncentracijama.

Sinergizam sam odredio računanjem omjera relativnog rizika (RRR), vrijednosti koja se dobije iz omjera aktualne vrijednosti naspram očekivane vrijednosti učinka dvaju lijekova u njihovoj kombinaciji. Ove vrijednosti dobivene za svaki od šest HDACi (panobinostat, depsipeptid, vorinostat, belinostat, MS-275, Scriptaid) u kombinaciji s decitabinom (hipometilirajući agens odabran kao partner HDACi za sve buduće pokuse zbog premoćnosti u inhibiciji rasta malignih stanica u odnosu na drugi u pokusima određivanja vrijednosti IC50 ispitivani hipometilirajući agens, 5-azacitidin) dokazuju sinergizam. Vrijednosti u testovima citotoksičnosti su se kretale od 0.01, koja označuje izrazitu sinergiju, do 1.0, koja označuje aditivni učinak dvaju lijekova. Najniže vrijednosti RRR, označujući ujedno izraziti sinergizam, opažene su u Ly7 limfomskoj liniji, jaki sinergizam je opažen i u Ly1, Ly10 i Su-DHL6 linijama. Izračunate vrijednosti RRR za RIVA i HBL-1 limfomske linije su pokazale blagi sinergizam ili pak aditivni učinak. Ovaj učinak u HBL-1 i RIVA limfomskim linijama je osobito zanimljiv s obzirom na činjenicu da je decitabin samostalno u koncentracijama korištenim u pokusima za analizu sinergizma bio neučinkovit u inhibiciji rasta. Opažene su sinergističke vrijednosti RRR za sve ispitivane HDACi. Računajući RRR u pokusima analize apoptotičkog učinka na stanice, dobio sam slične, u prosjeku niže vrijednosti, od 0.1 do 1.0.

U nastavku istraživanja usredotočio sam se na jedan HDACi. Panobinostat se istaknuo kao logičan izbor. Bio je, uz depsipeptid, najpotentniji u inhibiciji rasta malignih stanica od svih HDACi. Prevagu nad depsipeptidom je odnio zbog širine koncentracijskog učinka. Primjerice, prozor učinkovitosti za panobinostat je bio od 1 do 20 nM, a za depsipeptid između 1 i 3 nM. U

pokusima je stoga vrlo mala promjena koncentracije depsipectida dovela do velike promjene u biološkom učinku lijeka dovodeći do relativno visokih vrijednosti standardne devijacije između dva pokusa.

Sinergizam u djelovanju HDACi (panobinostat) i decitabina sam dokazao i u aktivaciji kaspaznog sustava. Citometrijskim mjerenjem aktivacije efektorske kaspaze 3 u limfomskim stanicama nakon inkubacije s lijekovima opažen je statistički značajniji postotak stanica sa aktiviranom kaspazom 3 nego u uzorcima tretiranim samo decitabinom ili samo panobinostatom. Ovaj učinak je potvrđen i računanjem RRR u dvije limfomske linije (Ly1 i Ly10) te za dvije koncentracije obaju lijekova, odabrane kao učinkovite u synergističkoj indukciji apoptoze, u dva vremenska perioda inkubacije (48 i 72h). Ovim je objašnjena mehanistička podloga synergističkom učinku ovih dvaju lijekova.

Analiza staničnog ciklusa limfomskih stanica tretiranih panobinostatom i decitabinom je pokazala da panobinostat samostalno inducira zastoj malignih stanica u G1 fazi, za razliku od decitabina koji inducira zastoj u G2/M fazi staničnog ciklusa. Profil stanica tretiranih kombinacijom lijekova je sličio uzroku tretiranom decitabinom, dakle smanjenje broja stanica u G1 fazi, uz značajnu razliku u povećanju broja stanica u subG1 fazi, koja označuje mrtve i apoptotične stanice.

Analizom acetilacije histona imunofluorescentnim mikroskopom i Western blottingom pokazana je premoćnost kombinacije panobinostat i decitabina u indukciji ovog, za djelovanje HDACi, ključnog učinka. Jednakim vremenom ekspozicije u kombinacijskom uzorku je pokazan jači signal fluorokromno obilježenog protutijela usmjerenog protiv acetiliranih histona. Ovaj kvalitativno dokazani učinak je potvrđen Western blottingom gdje je na roentgenografskom filmu zabilježen jači signal acetilacije histona u odnosu na ostale skupine uzoraka. Pojačana acetilacija histona u uzorku tretiranom kombinacijom panobinostat i decitabina može se objasniti hipometilacijom metiliranih CpG otoka u sklopu genskih promotora, rezultirajući smanjenim vezivanjem kompleksa bjelančevina s afinitetom za metilirane CpG otoke i histonskih deacetilaza. Smanjena količina histonskih acetilaza vezanih za DNK uz dodatnu inhibiciju njihove aktivnosti panobinostatom dovodi do pojačane acetilacije. Također, Western blottingom je opaženo da i decitabin samostalno polučuje acetilaciju, vjerovatno gore navedenim mehanizmom.

Različiti vremenski rasporedi dodavanja lijekova u limfomsku staničnu kulturu pokazali su kako je u svrhu inhibicije staničnog rasta i citotoksičnosti najbolja opcija kada se stanice

izlože panobinostatu i decitabinu istovremeno. Razlika u dodavanju lijekova od 24h u bilo kojem rasporedu (decitabin 24h prije panobinostata i obrnuto) nije se pokazala potentnijom u citotoksičnom učinku na stanice. Ova pojava je u skladu s podacima objavljenima u literaturi i mojim podacima dobivenima analizom staničnog ciklusa koji su primijetili da HDACi i hipometilirajući agensi imaju različit učinak u zaustavljanju stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa. Kako HDACi uzrokuju zastoj u G1, a decitabin u G2 fazi staničnog ciklusa, u određenim modelima je pokazano da različit vremenski raspored dodavanja lijekova u kulturu malignih stanica može uzrokovati interferiranje HDACi s učinkom hipometilirajuće tvari i čak uzrokovati anatagonizam među lijekovima⁷⁸. U pokusima koje sam proveo nije opažen antagonizam u djelovanju panobinostata i decitabina ni u jednom od ispitivanih vremenskih rasporeda. Dapače, dokazan je sinergizam, pogotovo u višim dozama i nakon dužeg razdoblja inkubacije (48h), ali, kako je već navedeno, taj sinergistički učinak nije bio značajniji od onog u uzorcima u kojima su panobinostat i decitabin dodati u limfomsku staničnu kulturu istovremeno na početku pokusa (0h).

Nakon što sam dokazao da ovi lijekovi uistinu polučuju sinergistički učinak u trajnim limfomskim staničnim kulturama, isti efekt sam potvrdio i protočno-citometrijski u primarnim limfomskim kulturama načinjenim od malignog tkiva uzetog u bolesnika s DLBCL. Ovo je vrlo bitna opservacija s obzirom na činjenicu da često postoje značajne razlike između primarnih i trajnih staničnih kultura.

Kao logičan nastavak *in vitro* ispitivanja, htio sam ispitati sinergističku učinkovitost ovih lijekova i u *in vivo* modelu. Kao dobar ljudski ksenograftski limfomski model koristio sam miševe s teškom kombiniranom imunodeficijencijom. Po prvi put sam razvio model ljudskog ksenografta s OCI-Ly1 limfomskom linijom, njihovom injekcijom na bok SCID beige miševa. Razvoj oku vidljivih tumora, veličine oko 50 mm³ omogućio je početak terapijskog tretmana životinja. Prvo sam odredio maksimalnu tolerabilnu dozu za svaki pojedini lijek modificirajući doze lijekova objavljene u literaturi i imajući na umu činjenicu da su ove doze korištene u životinjskim vrstama različitim od vrste u mojim pokusima. Doza decitabina za koju sam ocijenio da je sigurna za SCID beige miševe, odnosno koja ima prihvatljivu toksičnost (kontrolirajući težinu životinja i vanjske znakove toksičnosti svaki treći dan nakon početka pokusa), je ukupno 4.5 mg/kg, podijeljeno u tri dnevne doze na dane 1, 3 i 5. Prihvatljiva toksičnost panobinostata je primijećena u ukupnoj dozi od 75 mg/kg podijeljeno u 5 dnevnih doza na dane 1-5. Tijekom pokusa opažena je pojačana toksičnost u kombinacijskoj grupi s inicijalnim rasporedom lijekova. Stoga je u pokus uključena još jedna kombinacijska grupa miševa koja je primila smanjenu

ukupnu dozu decitabina. Na smanjenje doze decitabina sam se odlučio poučen iskustvom iz ispitivanja MTD lijekova samostalno, gdje su male promjene u primijenjenoj dozi decitabina vodile velikoj promjeni u toksičnosti i letalitetu životinja.

Rezultati pokusa sa 5 terapijskih grupa (vektorom tretirana kontrolna skupina životinja, decitabin samostalno u ukupnoj dozi od 4.5 mg/kg, panobinostat samostalno u ukupnoj dozi od 75 mg/kg, kombinacija decitabina u dozi od 3 mg/kg s panobinostatom od 75 mg/kg, te kombinacija decitabina u dozi od 4.5 mg/kg s panobinostatom od 75 mg/kg) su upravo potvrdili superiornost kombinacije. Naime, u obje kombinacijske skupine je dokazana statistička premoćnost ovog oblika terapije u inhibiciji rasta volumena tumora (apsolutna i relativna) u odnosu i na lijekove samostalno i na kontrolnu skupinu životinja ($p < 0.05$). Primijećena razlika u kombinacijskim terapijskim rasporedima se ticala toksičnosti i postizanja kompletne remisije.

U kombinacijskoj terapijskoj grupi koja je primila decitabin u višoj dozi, u 62.5% životinja (5/8) primijećena je kompletna remisija, za razliku od terapijskog rasporeda s nižom dozom decitabina, gdje unatoč smanjenju inicijalnog volumena tumora i inhibiciji rasta tijekom trajanja pokusa, nije zabilježena ni jedna kompletna remisija. Toksičnost je bila izražena u skupini s višom dozom decitabina gdje su 3 životinje (37.5%) umrle, a gubitak tjelesne težine veći od 10% u 62.5% miševa (5/8). U skupini s nižom dozom decitabina sve su životinje bile žive do kraja praćenja (eutanizirane su kada je volumen tumora prešao veličinu od 2000 mm³), te nije bilo značajnog gubitka na tjelesnoj težini. Ovi podaci govore u prilog daljnjem istraživanju ove kombinacije u *in vivo* farmakološkim modelima. Naime, potrebno bi idealno pronaći dozu lijekova (ili možda samo modificirati raspored primjene lijekova) gdje bi se polučio poboljšani poželjan učinak (kompletna remisija), a smanjio onaj negativan (toksičnost, koja kako se pokazalo može biti i letalna).

Računanje površine pod čitavom krivuljom prosjeka svih tumora (apsolutnih i relativnih) unutar skupine i njihovim statističkim uspoređivanjem među grupama, dokazana je premoćnost oba kombinacijska terapijska rasporeda naspram ostalih skupina. Osim Wilcoxonovog i globalnog testa računanja statističke značajnosti, sinergizam u djelovanju panobinostata i decitabina u *in vivo* modelu sam potvrdio i modifikacijom računanja RRR. Prosjek volumenâ tumorâ svake grupe sam naime usporedio s prosjekom volumenâ tumorâ netretirane kontrole na dan za koji je RRR izračunat. Aktualnu vrijednost sam dobio ovako izračunatim prosjekom relativnih volumenâ izraženih u obliku postotka u obje kombinacijske skupine, a očekivanu iz relativnih volumenâ grupa koje su primale lijekove samostalno. U skupini miševa s višom dozom

decitabina najniža zabilježena vrijednost RRR je iznosila 0.1, a u skupini s nižom dozom 0.4, još jednom potvrđujući efikasnost ove kombinacije lijekova, ovaj put u *in vivo* modelu.

U svrhu molekularnog razjašnjenja sinergističke osnove djelotvornosti epigenetske terapije korištene u mojem istraživanju, iskoristio sam mogućnosti koje pruža tehnologija mikropostroja u analizi metiliranosti i genske ekspresije. Kao što je navedeno u uvodu, ove metode probirom mogu odgovoriti na važna pitanja o mehanizmu djelovanja lijeka pravilno postavljenim pokusom. Htio sam istražiti utjecaj kombinacije hipometilirajuće tvari i HDACi na metilaciju čitavog genoma malignih stanica, te korelirati dobivene rezultate s analizom promjene genske ekspresije gena koji su se pojavili kao mete u inicijalnoj analizi metilacije. Pri tome sam za obje analize koristio biološke replikate, odnosno htio sam dokazati promjenu u metilaciji gena/povećanju razine mRNA za tri limfomske linije u bilo kojem od dva vremenska razdoblja inkubacije s lijekovima. Izoamilalkohol/kloroformom izoliranu DNK sam podvrgnuo analizi u Illumina Humanmethylation27 mikropostroju, sposobnom analizirati 27 578 probi u genskim promotorima 14 495 gena. Dobivene rezultate, odnosno brojčane vrijednosti (%) metiliranosti pojedinih promotora sam nakon verifikacije da se uistinu radi o pravom CpG otoku, usporedio koristeći dChip računalni program. Za 61 u onkogenezi dokazano ili potencijalno značajan genski promotor je u sve tri limfomske linije otkrivena značajna hipometilacija u odnosu na netretiranu kontrolu i uzorke tretirane lijekovima samostalno, te su ove mete bile od primarnog interesa pri analizi promjene genske ekspresije.

Stoga je kao potvrda da je upravo hipometilacija odgovorna za citotoksični učinak kombinacije decitabina i panobinostatata u malignim stanicama, analizirana promjena genske ekspresije u jednako tretiranim limfomskim linijama (ponovno koristeći biološki replikat triju različitih DLBCL linija). TRIzol reagensom izolirana RNK je podvrgnuta analizi u HumanHT-12 v3 Expression mikropostroju, sposobnom analizirati 40 000 probi. Od 61 gena u području čijih je genskih promotora dokazana hipometilacija nakon inkubacije s decitabinom i panobinostatom zajedno, za njih tri je dokazano značajno povećanje razine njihove mRNA. Od njih tri najvažniji proizvod translacije ovih mRNA je bjelančevina p73 iz obitelji p53 transkripcijskih čimbenika s funkcijom tumor supresora. p73 je sposobna zaustaviti stanicu u G1 i G2 fazi staničnog ciklusa, dajući stanici vrijeme potrebno da bi se oštećenja DNK popravila, ili, u slučaju da je oštećenje DNK preveliko, inicijaciju apoptotičkog procesa preko aktivacije p21. p21 inhibira ciklin ovisne kinaze (CDK – eng. cyclin dependent kinase) 2, 4 i 6, bjelančevine čija koncentracija u stanici ciklički naglo raste i pada ovisno o fazi ciklusa, a koje su potrebne da bi stanica ušla u S fazu staničnog ciklusa⁷⁹. Za razliku od p53, koji je česta meta mutacija, mutacije p73 su rijetke u

ljudskim novotvorinama⁸⁰. U inaktivaciji p73 češću ulogu igra metilacija kao što je pokazano u leukemijskim i limfomskim uzorcima⁷³. Istraživanje Martinez-Delgado i sur. je pokazalo da se analizom različitih uzoraka NHL, uključujući i DLBCL može dokazati inaktivacija p73 metilacijom u otprilike 30% slučajeva. Analizom genske ekspresije u sve tri limfomske linije dokazana je i indukcija pojačane sinteze mRNK za još dva potencijalna tumor supresora – mxd4 i cav1.

Sve dosad navedeno s posebnim naglaskom na podatke dobivene u sklopu analize genoma mikropostrojima je dio velikog istraživanja koje se zbiva u više laboratorija u sklopu ustanove u kojoj su istraživanja u sklopu ove teze i provedena. Skupina znanstvenika iz Herbert Irving Comprehensive Cancer centra Sveučilišta Columbia je naime razvila sustav razjašnjenja genskih regulatornih mreža – primijenjeni princip farmakologije i biologije sustava opisan u uvodu. Ovaj sustav je nazvan algoritmom za rekonstrukciju točnih staničnih mreža – ARACNE (eng. algorithm for the reconstruction of accurate cellular networks)⁸¹. U ARACNE bazu podataka prikupljeni su podaci analize genske ekspresije mikropostrojima iz uzoraka bolesnika s B-staničnim novotvorinama, normalnih B-limfocita i limfomskih staničnih linija. Svi novi podaci dobiveni tehnologijom mikropostroja u analizi B-staničnih regulacijskih puteva u ustanovi u kojoj radim se unose u ARACNE u nadi kako će se analizom ovih podataka iz normalnih i malignih stanica limfoidnog porijekla moći odgonetnuti regulacijske točke koje limfomskoj stanici omogućuju malignu transformaciju iz normalnog B-limfocita ili prekursorske B-stanice. Ovi ciljevi mogli bi omogućiti kreiranje individualne terapije za liječenje svakog pojedinačnog slučaja DLBCL i drugih neoplazmi B-limfocitnog porijekla i tako predstavljaju primijenjeni princip farmakologije sustava.

Ova disertacija je osnova za moguće kliničko istraživanje 1. faze u kojem bi se ispitala maksimalna tolerabilna doza decitabina i panobinostata (ili kojeg drugog istraživanog HDACi) u bolesnika s rezistentnim ili relapsirajućim DLBCL te dobili dragocjeni uzorci za daljnju analizu, a koje se planira provesti u Langone Medicinskom Centru Sveučilišta New York pod vodstvom dr. Jasmine Zain.

7. Zaključci

- i) Inhibitori histonske deacetilaze u kombinaciji s hipometilirajućom tvari polučuju sinergistički učinak u zaustavljanju rasta malignih stanica i citotoksičnom učinku na njih. Sinergizam u njihovom djelovanju prisutan je i u indukciji apoptoze i aktivaciji kaspaznog sustava u limfocitskim stanicama.
- ii) Panobinostat i decitabin u kombinaciji uzrokuju zastoj limfocitskih stanica u G2 fazi staničnog ciklusa te uzrokuju pojačanu acetilaciju histona u odnosu na lijekove pojedinačno
- iii) Razmak u primjeni jednog od lijekova u trajanju od 24h poslije drugog ne uzrokuje statistički značajniji citotoksični učinak u limfocitskim stanicama
- iv) Sinergizam u djelovanju panobinostata i decitabina je prisutan i u primarnim limfocitskim uzorcima dobivenim od bolesnika s DLBCL
- v) U *in vivo* modelu ljudskog limfocitskog ksenografta, panobinostat i decitabin su se pokazali kao efikasni u inhibiciji rasta volumena tumorâ koja je bila statistički značajnija od lijekova samostalno ili vektora
- vi) Analizom metilacije genoma i profiliranjem genske ekspresije otkrivena su tri tumor supresor gena (TP73, MXD4 i CAV1) čiji je porast razine mRNK izravna posljedica hipometilacije posredovane udruženim djelovanjem panobinostata i decitabina

8. Kratki sadržaj disertacije

Epigenetski orijentirana terapija potencijalno predstavlja novi način liječenja hematoloških novotvorina, uključujući i difuzni B-velikostanični limfom (DLBCL), pogotovo onih slučajeva koji su rezistentni na standardnu terapiju ili u bolesnika koji relapsiraju. U ovoj disertaciji pokazano je kako inhibitori histonske deacetilaze (HDACi) i hipometilirajuće tvari polučuju sinergistički učinak u zaustavljanju rasta malignih DLBCL stanica. Ovaj učinak je dokazan *in vitro* u analizi stanične vijabilnosti, indukcije apoptoze, aktivacije kaspaznog sustava te acetilacije histona računajući omjer relativnog rizika (RRR) u trajnim i primarnim limfomskim linijama. Učinkovitost panobinostata (LBH589) i decitabina u zaustavljanju rasta malignih stanica je potvrđena i u *in vivo* modelu ljudskog limfomskog ksenografta uz statistički značajnu razliku ($p < 0.05$) u prosječnom volumenu tumora na boku životinje u grupama koje su primile kombinaciju panobinostata i decitabina u odnosu na grupe životinja tretirane lijekom pojedinačno ili kontrolu koja je primila samo vektor. Mehanističko i molekularno objašnjenje sinergističkog učinka ove kombinacije istraženo je analizom metilacije genoma i promjene genske ekspresije tehnologijom mikropostroja kojima su identificirana tri potencijalna tumor supresora, TP73, MXD4 i CAV1, čija je aktivnost reaktivirana u limfomskim stanicama koje su tretirane panobinostatom i decitabinom. Spoznaje iz ove disertacije uključene su u širu analizu kako bi se stvorio model farmakologije i biologije sustava za B-stanične novotvorine, a praktično se primijenile u kliničkom istraživanju s epigenetski usmjerenom terapijom.

9. Role of Epigenetically Oriented Therapy in the Treatment of Diffuse Large B-Cell Lymphoma –Matko Kalac, M.D.

2009

Abstract

Epigenetically targeted therapy potentially represents a novel way of treating hematologic malignancies, including diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), especially those cases resistant to standard therapeutic options and in patients with relapsed disease. As shown in this thesis, histone deacetylase inhibitors (HDACi) and hypomethylating agents yield synergistic effect in growth inhibition of malignant DLBCL cells. This effect has been demonstrated in *in vitro* analysis of cell viability, apoptosis induction, caspase system activation and histone acetylation in permanent and primary DLBCL lines utilizing the relative risk ratio (RRR) calculations. Efficacy of decitabine and panobinostat (LBH589) in malignant cell growth inhibition has also been confirmed in *in vivo* human lymphoma xenograft model with a significant statistical difference ($p < 0.05$) in the mean tumour volume located on the flank of the animal in the group that received combination of decitabine and panobinostat compared to the single drug groups or the one that received vector only. Genome wide methylation analysis and gene expression profiling has been used to determine mechanistic and molecular basis for the synergistic effect of this combination. These analyses identified three potential tumour suppressors, TP73, MXD4 and CAV1, the synthesis of which was reactivated in cells treated with panobinostat and decitabine. Findings from this thesis are a part of a wider analysis in an effort to establish a pharmacology/biology systems model within B-cell neoplasm context. Practically, it will be a foundation for a clinical trial exploring efficacy of epigenetically targeted therapy.

10. Citirana literatura

-
- ¹ Kruszewski M, Szumiel I. Sirtuins (histone deacetylases III) in the cellular response to DNA damage – Facts and hypotheses. *DNA Repair*. 2005;4:1306-13.
- ² Kalac M, O'Connor OA. The emerging role of histone deacetylase inhibitors in the treatment of lymphoma. *Innovative leukemia and lymphoma therapy*. Editors: Kaspers G, Coiffier B, Heinrich M, Estey E. Informa Healthcare. 2008.
- ³ O'Connor OA. HDAC inhibitors and clinical activity in cancer. *Oncology*. 2006; Supplement.
- ⁴ Kelly WK, O'Connor OA, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: from target to clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs*. 2002;11:1695-713.
- ⁵ Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002;16:6-21.
- ⁶ Erlich M. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. *Nucleic Acids Res*. 1982;10:2709-21.
- ⁷ Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:3740-5.
- ⁸ Rice KL, Hormaeche I, Licht JD. Epigenetic regulation of normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene*. 2007;26:6697-714.
- ⁹ Goto T, Monk M. Regulation of X-chromosome inactivation in development in mice and humans. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62:362-78.
- ¹⁰ Jones PA. The DNA methylation paradox. *Trends Genet*. 1999;15:34-7.
- ¹¹ Bird AP, Wolffe AP. Methylation induced repression – belts, braces and chromatin. *Cell*. 1999;99:451-4.
- ¹² Prokhoutchouk A, Hendrich B, Jorgensen H et al. The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes & Dev*. 2001;15:1613-8.
- ¹³ Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*. 2000;9:2395-402.
- ¹⁴ Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002;3:415-28.
- ¹⁵ Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev cancer*. 2001;1:157-62.
- ¹⁶ Grønbæk K, Hother C, Jones PA. Epigenetic changes in cancer. *APMIS*. 2007;115:1039-59.
- ¹⁷ Herman JG, Umar A, Polyak K et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:6870-5.

-
- ¹⁸ Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*. 2000 Nov 9;343(19):1350-4.
- ¹⁹ Yoon JH, Smith LE, Feng Z, Tang M, Lee CS, Pfeifer GP. Methylated CpG dinucleotides are the preferential targets for G-to-T transversion mutations induced by benzo(a)pyrene diol epoxide in mammalian cells: similarities with the p53 mutation spectrum in smoking-associated lung cancers. *Cancer Res*. 2001;61:7110-7.
- ²⁰ Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. 2005;2:S4-S11.
- ²¹ Jones PL, Veenstra GJC, Wade PA et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genetics*. 1998;19:187-91.
- ²² Jenuwein T. The epigenetic magic of histone lysine methylation. *FEBS J*. 2006;273:3121-35.
- ²³ Margueron R, Trojer P, Reinberg D. The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev*. 2005;15:163-76.
- ²⁴ Pavan A, Spina M, Canzonieri V, Sansonno S, Toffoli G, De Re V. Recent prognostic factors in diffuse large B-cell lymphoma indicate NF- κ B pathway as a target for new therapeutic strategies. *Leuk Lymphoma*. 2008;49:2048-58.
- ²⁵ Pileri SA, Dirnhofer S, Went P et al. Diffuse large B-cell lymphoma: one or more entities? Present controversies and possible tools for its subclassification. *Histopathology*. 2002;41:482-509.
- ²⁶ Coiffier B, Lepage E, Brière J et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma. *NEJM*. 2002;346:235-41.
- ²⁷ Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphomas identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403:503-11.
- ²⁸ Rosenwald A, Wright G, Leroy K et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med*. 2003;198:851-62.
- ²⁹ Amara K, Trimeche M, Ziadi S, Laatiri A, Hachana M, Korbi S. Prognostic significance of aberrant promoter hypermethylation of CpG islands in patients with diffuse large B-cell lymphomas. *Ann Oncol*. 2008;19:1774-86.
- ³⁰ O'Connor OA, Heaney ML, Schwartz L et al. Clinical experience with intravenous and oral formulations of the novel histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid in patients with advanced hematologic malignancies. *J Clin Oncol*. 2006;24:166-73.
- ³¹ Riggs MG, Whittaker RG, Neumann JR, Ingram VM. n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells. *Nature*. 1977;268:462-4.
- ³² Acharya MR, Sparreboom A, Venitz J, Figg WD. Rational development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents: a review. *Mol Pharmacol*. 2005;68:917-32.
- ³³ Sun C, Liu X, Chen Y, Liu F. Anticancer activities of trichostatin A on malignant lymphoid cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2006;26:538-41.

-
- ³⁴ Richon VM, Emiliani S, Verdin E, Webb Y, Breslow R, Rifkind RA et al. A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:3003-7.
- ³⁵ Kelly WK, O'Connor OA, Krug LM et al. Phase I study of an oral histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid, in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23:3923-31.
- ³⁶ Duvic M, Talpur R, Ni X et al. Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood*. 2007;109:31-9.
- ³⁷ Olsen E, Kim YH, Kuzel T, Pacheco TR, Foss F, Parker S et al. Vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) is clinically active in advanced cutaneous T-cell lymphoma (CTCL): Results of a phase IIb trial. *Journal of Clinical Oncology*, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 24, No. 18S (June 20 Supplement), 2006: 7500.
- ³⁸ Ellis L, Pan Y, Smyth GK, George DJ et al. Histone deacetylase inhibitor panobinostat induces clinical responses with associated alterations in gene expression profiles in cutaneous T-cell lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2008;14:4500-10.
- ³⁹ Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, Marks PA. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:10014-9.
- ⁴⁰ Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5:769-84.
- ⁴¹ Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:420-30.
- ⁴² Ruefli AA, Ausserlechner MJ, Bernhard D et al. The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:10833-8.
- ⁴³ Saji S, Kawakami M, Hayashi S et al. Significance of HDAC6 regulation via estrogen signaling for cell motility and prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncogene*. 2005;24:4531-9.
- ⁴⁴ Nimmanapalli R, O'Bryan E, Bhalla K. Geldanamycin and its analogue 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin lowers Bcr-Abl levels and induces apoptosis and differentiation of Bcr-Abl-positive human leukemic blasts. *Cancer Res*. 2001;61:1799-804.
- ⁴⁵ Bereshchenko OR, Gu W, Dalla-Favera R. Acetylation inactivates the transcriptional repressor BCL6. *Nat Genet*. 2002;32:606-13.
- ⁴⁶ Vesely J, Sorm F. The cytologic and the metabolic effects of a new antileukemic analogue 5-azacytidine in normal mice followed autoradiographically with tritium. *Neoplasma*. 1965;12:3-9.
- ⁴⁷ Kihlslinger JE, Godley LA. The use of hypomethylating agents in the treatment of hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma*. 2007;48:1676-95.
- ⁴⁸ Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell*. 1980;20:85-93.

-
- ⁴⁹ Glover AB, Leyland-Jones BR, Chun HG, Davies B, Hoth DF. Azacitidine: 10 years later. *Cancer Treat Rep.* 1987;71:737-46.
- ⁵⁰ Wijermans PW, Lubbert M, Verhoef G, Klimek V, Bosly A. An epigenetic approach to the treatment of advanced MDS; the experience with the DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in 177 patients. *Ann Hematol.* 2005;84 suppl 13:9-17.
- ⁵¹ Kaminskas E, Farrell A, Abraham S et al. Approval summary: azacytidine for treatment of myelodysplastic syndrome subtypes. *Clin Cancer Res.* 2005;11:3604-8.
- ⁵² Steven D. Gore, Anchalee Jiemjit, Lewis B. Silverman et al. Combined Methyltransferase/Histone Deacetylase Inhibition with 5-Azacitidine and MS-275 in Patients with MDS, CMML and AML: Clinical Response, Histone Acetylation and DNA Damage. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts).* 2006;108:517.
- ⁵³ Garcia-Manero G, Yang AS, Klimek V et al. Phase I/II study of a novel oral isotype-selective hHDACi MGCD0103 in combination with azacytidine in patients with high-risk MDS or AML. *J Clin Oncol (meeting abstracts).* 2007;25:7062.
- ⁵⁴ Van der Greef J, McBurney RN. Rescuing drug discovery: *in vivo* systems pathology and systems pharmacology. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4:961-7.
- ⁵⁵ Kunkel EJ, Dea M, Ebens A et al. An integrative biology approach for analysis of drug action in models of human vascular inflammation. *FASEB J.* 2004;18:1279-81.
- ⁵⁶ Nagai MA, Brentani MM. Gene expression profiles in breast cancer to identify estrogen receptor target genes. *Mini Rev Med Chem.* 2008;8:448-54.
- ⁵⁷ Uhlmann K, Rohde K, Zeller C et al. Distinct methylation profiles of glioma subtypes. *Int J Cancer.* 2003 Aug 10;106(1):52-9.
- ⁵⁸ Jiang L, Gonda TA, Gamble MV et al. Global hypomethylation of genomic DNA in cancer-associated myofibroblasts. *Cancer Res.* 2008;68:9900-8.
- ⁵⁹ O'Connor OA, Smith EA, Toner LE et al. The combination of the proteasome inhibitor bortezomib and the bcl-2 antisense molecule oblimersen sensitizes human B-cell lymphomas to cyclophosphamide. *Clin Cancer Res.* 2006;12:2902-11.
- ⁶⁰ Zhao L, Wientjes G, Au JLS. Evaluation of combination chemotherapy: integration of nonlinear regression, curve shift, isobologram, and combination index analyses. *Clin Cancer Research.* 2004;10:7994-8004.
- ⁶¹ Chou TC. Relationship between inhibition constants and fractional inhibitions in enzyme-catalyzed reactions with different numbers of reactants, different reaction mechanisms, and different types of mechanisms of inhibition. *Mol Pharmacol.* 1974;10:235-47.
- ⁶² Chou TC. Derivation and properties of Michaelis-Menten type and Hill type equations for reference ligands. *J Theoret Biol.* 1976;39:253-76.

-
- ⁶³ Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*. 2004;305:626-9.
- ⁶⁴ Wallach D, Kang TB, Kovalenko A. The extrinsic cell death pathway and the élan mortel. *Cell Death Differ*. 2008;15:1533-41.
- ⁶⁵ Žlender V. Detection of apoptosis. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2006;57:229-36.
- ⁶⁶ Smith JA, Martin L. "Do cells cycle?". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1973;70:1263-7.
- ⁶⁷ Nakajima H, Kim YB, Terano H, Yoshida M, Horinouchi S. FR901228, a potent tumor antibiotic, is a novel histone deacetylase inhibitor. *Exp Cell Res*. 1998;25:126-33.
- ⁶⁸ Atadja P. Development of the pan-DAC inhibitor panobinostat (LBH589): success and challenges. *Cancer Lett*. 2009;280:233-41.
- ⁶⁹ Blüthner T, Niederhagen M, Caca K et al. Inhibition of histone deacetylases for the treatment of biliary tract cancer: A new effective pharmacological approach. *World J Gastroenterol*. 2007;13:4761-70.
- ⁷⁰ Al-Romaih K, Sadikovic B, Yoshimoto M, Wang Y, Zielenska M, Squire JA. Decitabine-induced demethylation of 5' CpG island in GADD45A leads to apoptosis in osteosarcoma cells. *Neoplasia* 2008;10:471-80.
- ⁷¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Genome&itool=toolbar>
- ⁷² Taylor WR, DePrimo SE, Agarwal A et al. Mechanisms of G2 arrest in response to overexpression of p53. *Mol Biol Cell*. 1999;10:3607-22.
- ⁷³ Martinez-Delgado B, Melendez B, Cuadros M et al. Frequent inactivation of the p73 gene by abnormal methylation or LOH in non-Hodgkin's lymphomas. *Int J Cancer*. 2002;102:15-19.
- ⁷⁴ McArthur GA, Laherty CD, Quéva C et al. The Mad protein family links transcriptional repression to cell differentiation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1998;63:423-33.
- ⁷⁵ Nishiu M, Yanagawa R, Nakatsuka S et al. Microarray analysis of gene-expression profiles in diffuse large B-cell lymphoma: identification of genes related to disease progression. *Jpn J Cancer Res*. 2002;93:894-901.
- ⁷⁶ Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the Cancer and Leukemia Group B. *J Clin Oncol*. 2002;20:2429-2440.
- ⁷⁷ Kirschbaum M, Gojo I, Goldberg SL et al. Phase I study of vorinostat in combination with decitabine in patients with relapsed or newly diagnosed acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. *ASH annual meeting* 2008;112:Abstract 3651.
- ⁷⁸ Issa JP, Castoro R, Ravandi-Kashani F et al. Randomized phase II study of combined epigenetic therapy: decitabine vs. decitabine and valproic acid in MDS and AML. *ASH annual meeting* 2008;112:Abstract 228.
- ⁷⁹ El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE et al. WAF, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 1993;75:817-25.
- ⁸⁰ Shishikura T, Ichimiya S, Ozaki T et al. Mutational analysis of the p73 gene in human breast cancers. *Int J Cancer*. 1999;84:321-5.

⁸¹ Margolin AM, Menenman I, Basso K et al. ARACNE: An algorithm for the reconstruction of gene regulatory networks in mammalian cellular context. BMC Bioinformatics. 2006;7:Suppl 1.

11. Biografija

Rođen sam u Zagrebu 14. kolovoza 1979., gdje sam završio osnovnu i srednju školu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu sam upisao 1997. i završio 2003. Nakon obavljenog staža i stjecanja licence Hrvatske liječničke komore, zaposlio sam se kao dekanov znanstveni novak pri Odjelu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kliničke bolnice "Merkur" u Zagrebu. Poslijediplomski studij "Biomedicina i zdravstvo" Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pohađao sam od 2004.-2006. g. uz prof. dr. Branimira Jakšića kao mentora. Krajem 2006. odlazim na stručno usavršavanje na Memorial Sloan Kettering Cancer center u New Yorku u laboratorij za eksperimentalne lijekove za liječenje limfoproliferativnih novotvorina. 2007. g. mi je odobrena specijalizacija iz interne medicine na Kliničkoj bolnici "Merkur", a iste godine u sklopu procesa za stjecanje naslova doktora znanosti odlazim na Herbert Irving Comprehensive Cancer center Sveučilišta Columbia u New Yorku, gdje su istraživanja u sklopu ove teze i provedena.