



**INSTYTUT HEMATOLOGII
I TRANSFUZJOLOGII**

Marta Pelon

**Rola gankyriny jako modulatora działania
leków przeciwszpiczakowych**

Rozprawa doktorska napisana
pod kierunkiem
dr hab. Ireny Misiewicz-Krzemińskiej, prof. IHIT

Warszawa 2025



N A R O D O W E C E N T R U M N A U K I

Niniejsza rozprawa doktorska powstała w ramach grantu OPUS-18 „Białko gankyrina jako nowy potencjalny cel terapeutyczny w szpiczaku plazmocytowym” (2019/35/B/NZ5/02824) finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Serdeczne podziękowania za pomoc, poświęcony czas i cenne uwagi pragnę złożyć:

Promotor niniejszej pracy, dr hab. Irenie Misiewicz-Krzemińskiej, Prof. IHIT.

Dziękuję również wszystkim osobom, które przyczyniły się do powstania niniejszej pracy.

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE.....	8
STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM (SUMMARY).....	9
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI.....	10
I WSTĘP.....	12-25
1. PODŁOŻE BIOLOGICZNE SZPICZAKA PLAZMOCYTOWEGO.....	12
2. ROLA PROTEASOMU W SZPICZAKU PLAZMOCYTOWYM.....	13
2.1 Proteasom- budowa i funkcje.....	14
2.2 Immunoproteasom- budowa i sygnały prowadzące do jego powstania.....	15
3. KLASYFIKACJA I ZNACZENIE KLINICZNE SZPICZAKA PLAZMOCYTOWEGO.....	15
4. SCHEMATY LECZENIA SZPICZAKA.....	16-22
4.1 Leki immunomodulujące.....	18
4.2 Inhibitory proteasomu.....	19
4.3 Czynniki wpływające na działanie inhibitorów proteasomu.....	20
5. BIAŁKO GANKYRINA.....	23
II CEL PRACY.....	26
III MATERIAŁY.....	27-37
1. ODCZYNNIKI.....	27
2. ENZYMY I ODPOWIADAJĄCE IM BUFORY.....	28
3. BUFORY.....	29
4. GOTOWE ZESTAWY ODCZYNNIKÓW	30
5. STANDARDY DNA	31
6. PRZECIWCIAŁA	32
7. TaqMan.....	32
8. OLIGONUKLEOTYDY.....	32
9. WEKTORY	34
10. SZCZEPY BAKTERYJNE	35
11. PODŁOŻA DO HODOWLI BAKTERYJNYCH	36

12. POŻYWKI HODOWLANE I ROZTWORY STOSOWANE W PRACY Z KOMÓRKAMI EUKARIOTYCZNYMI	37
13. LINIE KOMÓRKOWE	37
IV METODY	38-48
1. METODY BIOLOGII MOLEKULARNEJ	38
1.1. Przygotowanie chemikompentnych bakterii <i>E. coli</i> DH5α metodą chlorku rubidu.....	38
1.2. Transformacja bakterii chemikompentnych metodą szoku cieplnego.....	38
1.3. Izolacja plazmidowego DNA na „małą skalę” za pomocą zestawu „Plasmid Miniprep”.....	39
1.4. Rozdział elektroforetyczny DNA w żelu agarozowym.....	39
1.5. Oznaczanie ilości i czystości DNA.....	39
1.6. Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi.....	40
1.7. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR).....	40
1.8. Oczyszczanie DNA po reakcji PCR.....	41
1.9. Reakcja ligacji.....	41
1.10. Sekwencjonowanie DNA.....	41
1.11. Izolacja całkowitego RNA.....	42
1.12. Synteza cDNA.....	42
1.13. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym.....	43
1.14. Transfekcja komórek eukariotycznych wektorami plazmidowymi (edycja genetyczna obejmująca nadekspresję i obniżanie poziomu ekspresji gankyriny).....	43
1.15. Transfekcja komórek eukariotycznych (edycja genetyczna obejmująca wyłączenie ekspresji gankyriny).....	44
2. METODY STOSOWANE W ANALIZIE BIAŁEK	44
2.1. Przygotowywanie lizatów komórkowych.....	44
2.2. Oznaczanie ilościowe białka.....	44
2.3. Wykrywanie białek metodą nanoimmunoelktroforezy kapilarnej.....	45
3. HODOWLE KOMÓRKOWE I TESTY IN VITRO	45
3.1. Hodowle komórkowe.....	45
3.2. Test proliferacyjny z użyciem MTS.....	45
3.3. Test proliferacyjny z wykorzystaniem przeciwciała Ki-67.....	46

3.4. Test na aktywność podjednostek proteasomu.....	46
3.5. Test na syntezę białek <i>de novo</i>	46
4. ANALIZA STATYSTYCZNA.....	48
V WYNIKI.....	49-88
1. OCENA WPŁYWU GANKYRINY NA WYBRANE PARAMETRY KOMÓREK SZPICZAKA Z WYKORZYSTANIEM MODELI LUDZKICH LINII KOMÓRKOWYCH SZPICZAKA, PODDAWANYCH MODYFIKACJOM POZIOMU I OBECNOŚCI GANKYRINY	49
1.1.Charakterystyka linii komórkowych szpiczaka plazmocytowego pod kątem ekspresji gankyriny.....	49
1.2.Wyprowadzenie modeli genetycznych.....	50
1.2.1.Otrzymanie linii komórkowych pozbawionych genu <i>PSMD10</i> metodą CRISPR-Cas9.....	50
1.2.2.Otrzymanie linii komórkowych z obniżonym poziomem ekspresji <i>PSMD10</i>	53
1.3.Ocena tempa proliferacji i czasu podwojenia populacji.....	57
1.4. Ocena tempa syntezy białek <i>de novo</i>	60
1.5. Porównanie aktywności proteasomu.....	61
2.OCENA WPŁYWU POZIOMU <i>PSMD10</i> / <i>GANKYRINY</i> NA PRZEŻYCIE PACJENTÓW Z MM W KONTEKŚCIE RÓŻNYCH SCHEMATÓW LECZENIA....	66
2.1. Ocena wpływu poziomu ekspresji mRNA <i>PSMD10</i> na rokowanie pacjentów z MM leczonych schematami z uwzględnieniem PI, IMiD oraz kombinatorycznych...	66
2.2.Ocena wpływu poziomu gankyriny na przeżycie pacjentów leczonych schematem bez wykorzystania inhibitorów proteasomu.....	72
2.3.Porównanie aktywności leków przeciwszpiczakowych na linii komórkowe szpiczaka o zmienionej ekspresji <i>PSMD10</i>	73
2.3.1 Ocena wpływu poziomu gankyriny na aktywność inhibitorów proteasomu.....	73
2.3.2. Ocena wpływu poziomu gankyriny na aktywność leków z pozostałych grup leczenia.....	76
2.3.3 Ocena wpływu poziomu gankyriny na aktywność leków w kombinacjach.....	77
3. REGULACJA ŚCIEŻEK SYGNAŁOWYCH	79
3.1. Ocena zmian profilów ekspresji genów wywołane wyłączeniem ekspresji <i>PSMD10</i> w komórkach szpiczaka.....	79

3.2. Identyfikacja ścieżek i procesów biologicznych istotnie zmienionych po wylączeniu ekspresji gankyriny w komórkach szpiczaka.....	87
VI PODSUMOWANIE WYNIKÓW.....	89
VII DYSKUSJA.....	90-97
VIII WNIOSKI.....	98
IX BIBLIOGRAFIA.....	99-106
X WYKAZ ILUSTRACJI I TABEL.....	107-112

STRESZCZENIE

Białko gankyrina kodowane przez gen *PSMD10* w guzach litych jest znanym onkogenem. Funkcjonalnie działa jako regulator proteasomu i dostarcza mu substratów. Poprzednie badania wykazały, że podwyższony poziom gankyriny w komórkach plazmatycznych pacjentów z nowo zdiagnozowanym szpiczakiem plazmocytowym (MM) wiąże się z gorszym rokowaniem po leczeniu schematem VRD (bortezomib+ lenalidomid+ deksametazon). Analiza danych z bazy CoMMpass MMRF porównująca wpływ poziomów *PSMD10* na przeżycie pacjentów wolne od wznowy (PFS) i całkowite (OS) pacjentów wykazała, że wysoka ekspresja *PSMD10* była niekorzystnym czynnikiem prognostycznym u pacjentów, których terapia była oparta na inhibitorach proteasomu (PI) zarówno w obecności, jak i przy braku leków immunomodulujących (IMiD) w schemacie leczenia. Gdy terapia opierała się wyłącznie na IMiD, poziomy *PSMD10* nie wpływał na rokowanie.

Ekspresję *PSMD10* mierzono w liniach komórkowych szpiczaka plazmocytowego. Komórki *PSMD10_KO/WT* zostały uzyskane przy wykorzystaniu techniki CRISPR/Cas9. Funkcjonalne skutki wyłączenia ekspresji *PSMD10* za pomocą technologii CRISPR oceniano w testach funkcjonalnych *in vitro*.

Komórki pozbawione gankyriny (*PSMD10_KO*) charakteryzowały się zwiększoną aktywnością proteasomu i czasem podwojenia populacji komórek, zmniejszoną proliferacją i obniżoną syntezą białek w porównaniu do komórek kontrolnych, z obecną gankyriną (*PSMD10_WT*). Linie komórkowe pozbawione gankyriny wykazywały istotnie statystycznie zwiększoną oporność na bortezomib w porównaniu do komórek kontrolnych. Poprzez analizę profili ekspresji transkryptomu- techniką RNASeq, wykazano znaczące zmniejszenie odpowiedzi na stres retikulum endoplazmatycznego i odpowiedź na niesfałdowane białka.

Podsumowując, wyniki wskazują, że zmiany w biologii komórki szpiczaka oraz ich odpowiedzi na bortezomib wywołane zmianą poziomu ekspresji *PSMD10* są uzależnione od wyjściowego poziomu gankyriny w komórkach. Wykazanie związku między gankyriną a odpowiedzią na bortezomib może zatem stanowić nowy sposób kwalifikacji pacjentów z nowo zdiagnozowanym szpiczakiem do schematów leczenia. Dzięki zastosowaniu medycyny spersonalizowanej, gankyrina może stać się czynnikiem prognostycznym i przyczynić się do poprawy jakości i długości życia pacjentów, u których zdiagnozowano MM.

STRESZCZENIE W JEZYKU ANGIELSKIM (SUMMARY)

The gankyrin protein encoded by the *PSMD10* gene in solid tumors is a known oncogene. Functionally, it acts as a regulator of the proteasome and provides substrates to it. Previous studies showed that elevated levels of gankyrin in plasma cells of patients with newly diagnosed multiple myeloma (MM) are associated with a worse prognosis after treatment with the VRD (bortezomib+ lenalidomide+ dexamethasone) regimen. Analysis of data from the CoMMpass MMRF database comparing the impact of *PSMD10* levels on patients survival PFS and OS showed that high *PSMD10* expression was an unfavorable prognostic factor in patients whose therapy was based on proteasome inhibitors (PI), both in the presence and absence of immunomodulatory drugs (IMiDs) in the treatment regimen. When therapy was based on IMiDs only, *PSMD10* levels did not affect prognosis.

PSMD10 expression was measured in multiple myeloma cell lines. *PSMD10_KO/WT* cells were created by CRISPR/Cas9. The functional effects of *PSMD10* genetic knockout with CRISPR technology were evaluated using functional tests *in vitro*.

Cells lacking gankyrin (*PSMD10_KO*) were characterized by increased proteasome activity and cell population doubling time, reduced proliferation and downregulated protein synthesis compared to cells with gankyrin present (*PSMD10_WT*). Cell lines lacking gankyrin showed statistically significant increased resistance to bortezomib compared to control cells. By analyzing transcriptomic expression profiles by RNASeq, we showed a significant reduction in response to endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response.

In summary, the results indicate that changes in myeloma cell biology and their response to bortezomib induced by changes in *PSMD10* expression levels are dependent on the baseline level of gankyrin in the cells. Demonstrating a link between gankyrin and response to bortezomib may therefore provide a new way to qualify patients with NDMM for treatment modalities. Through the use of personalized medicine, gankyrin may become a prognostic factor and contribute to improving the quality and length of life of patients diagnosed with MM.

Wykaz stosowanych skrótów

ADCC z ang. antibody dependent cell cytotoxicity; zależna od przeciwciał cytotoksyczność komórkowa

ADCP z ang. antibody dependent cellular phagocytosis;

AP-1 z ang. activating protein; aktywowane białko-1

BCMA z ang. B cell maturation antigen; antygen dojrzewania limfocytów B

BM z ang. bone marrow; szpik kostny

CDC z ang. complement-dependent cytotoxicity; cytotoksyczność zależna od dopełniacza

ER z ang. endoplasmic reticulum; siateczka śródplazmatyczna

FcRH5 z ang. Fc receptor homologue; homolog receptora Fc 5

GPRC5D z ang. G protein-coupled receptor family C group 5 member D; receptor sprzężony z białkiem G

IGH z ang. immunoglobulin heavy chain; geny łańcucha ciężkiego immunoglobulin

IL-2 z ang. interleukin-2; interleukina-2

IMiD z ang. immunomodulatory drugs; leki immunomodulujące

KEAP1 z ang. Kelch-like ECH-associated protein 1;

MDM2 z ang. mouse double minute 2;

MGUS z ang. Monoclonal gammopathy of undetermined significance; gammapatia monoklonalna o niezdefiniowanym znaczeniu

MHCI z ang. Major Histocompatibility Complex; główny układ zgodności tkankowej klasy I

MM z ang. multiple myeloma, szpiczak plazmocytowy

MRD z ang. Minimal residual disease, choroba resztkowa

Nrf2 z ang. nuclear factor erythroid 2-related factor 2; jądrowy czynnik transkrypcyjny pochodzenia erytroidalnego typu 2

NFκB z ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; kompleks czynnika jądrowego kappa B

NK z ang. natural killers; naturalni zabójcy

PC z ang. plasma cells; komórki plazmatyczne

PFS z ang. progression free- survival; czas wolny od wznowy

PHGDH z ang. Phosphoglycerate dehydrogenase; dehydrogenazy fosfoglicerynianowej

PI z ang. proteasome inhibitors; inhibitory proteasomu

SMM z ang. Smoldering multiple myeloma; stan pośredni tłącego się szpiczaka

TNF- α z ang. tumor necrosis factor α ; czynnik martwicy nowotworów α

TRAIL z ang. Tumour necrosis factor-related apopto-sis-inducing ligand; czynnik martwicy nowotworów

UPR z ang. unfolded protein response; odpowiedź na niesfałdowane białka

UPS z ang. ubiquitin proteasome system; system ubikwityna-proteasom

I Wstęp

1.Podłoże biologiczne szpiczaka plazmocytoowego

Szpiczak plazmocytowy (ang. *Multiple Myeloma*, MM) jest chorobą charakteryzującą się nagromadzeniem wydzielających immunoglobuliny, klonalnych komórek plazmatycznych (ang. *Plasma cells*, PC) w szpiku kostnym (ang. *Bone marrow*, BM).

Nieustająca synteza immunoglobulin, naraża komórki na stres siateczki śródplazmatycznej (ang. *Endoplasmic reticulum*, ER), czyniąc komórki MM wysoce zależnymi od odpowiedzi na niesfałdowane białka (ang. *Unfolded protein response*, UPR) (Nikesitch et al., 2018). Coraz więcej dowodów sugeruje ściśle powiązanie między stresem ER i stresem oksydacyjnym, wykazane przez nakładające się szlaki sygnałowe i komunikację między organellami, kluczową dla decyzji o losie komórki. Zaburzenie homeostazy wewnątrzkomórkowej może prowadzić do nieprawidłowej kontroli funkcji komórkowych i wywoływać apoptozę z powodu wzajemnej aktywacji stresu ER i generowania reaktywnych form tlenu w samonapędzającym się cyklu (Xiong et al., 2021a).

Ciągły stres ER powoduje uruchomienie szlaków umożliwiających komórkom dostosowanie się do dodatkowego obciążenia wywołanego czynnikami stresogennymi. To właśnie geny zaangażowane w homeostazę białek, przetwarzanie RNA, translację białek i UPR zostały zidentyfikowane, jako geny o wysokim stopniu mutacji w MM (Fabris et al., 2007). Dane uzyskane na drodze profilowania ekspresji genów pacjentów z MM wskazują zwiększoną ekspresję genów zaangażowanych w wewnątrzkomórkowy transport białek (Chapman et al., 2011). Do aktywacji UPR w komórkach MM dochodzi za pośrednictwem białek transmembranowych: PERK, ATF6 i IRE1 regulowanych poprzez stres ER.

PERK jest niezbędny do złośliwej transformacji i przetrwania komórek MM. Zahamowanie szlaku PERK-eIF2 α w ludzkich liniach komórkowych MM nasila stres ER i promuje autofagiczną śmierć komórek. Aktywacja zarówno ATF6, jak i IRE1 α jest niezbędna do osiągnięcia maksymalnej indukcji UPR, co jest związane z procesem różnicowania i dojrzewania komórek plazmatycznych wydzielających przeciwciała. Aktywowany IRE1 α prowadzi do produkcji białka XBP1, często o podwyższonym poziomie ekspresji w komórkach MM. Służy on jako czynnik pro-przeżycia, który kontroluje produkcję immunoglobulin i hamuje apoptozę (Xiong et al., 2021b). Rolą UPR jest monitorowanie poziomów nieprawidłowych białek, poprzez regulację szlaków degradacji takich jak system ubikwityna-

proteasom (ang. *Ubiquitin proteasom-system*, UPS) (Shoulders et al., 2013). W przypadku gdy poziom stresu ER, przewyższa możliwości UPR, komórka ulega apoptozie.

2. Rola proteasomu w szpiczaku plazmocytowym

Komórki MM charakteryzują się intensywną syntezą immunoglobulin, co prowadzi do nagromadzenia dużej ilości białek w ER. Taka aktywność zwiększa stres białkowy w komórkach nowotworowych. W warunkach fizjologicznych proteasom eliminuje nieprawidłowo sfałdowane białka, zapobiegając ich toksycznemu działaniu.

Proteasom, będący kluczowym kompleksem enzymatycznym odpowiedzialnym za degradację białek w komórkach eukariotycznych, odgrywa istotną rolę zarówno w patogenezie jak i leczeniu MM. Jego znaczenie w MM wynika przede wszystkim z dużej aktywności metabolicznej komórek nowotworowych i ich zwiększonej zależności od prawidłowego funkcjonowania szlaku proteasomalnego. Jako podstawa głównego systemu proteolitycznego-UPS, proteasom odpowiada za kontrolowanie wzrostu oraz funkcji komórek poprzez regulację degradacji białek. Jego rola jest oparta na regulacji stanu proteomu podczas rozwoju i starzenia się komórek (Çetin et al., 2021)

Prawidłowe funkcjonowanie każdej ludzkiej komórki wymaga koordynacji funkcji licznych struktur komórkowych. Komórki wymagają ciągłego recyklingu i usuwania uszkodzonych lub niechcianych białek. Zniszczeniu poprzez proteasom ulegają jedynie białka oznaczone przez komórkę w trzyetapowym procesie ubikwitynacji. Aktywujący enzym E1 w pierwszej kolejności przenosi ubikwitynę (ang. *Ubiquitin*, Ub) do nośnika E2, gdzie przy pomocy ligazy E3 jest ona trwale przyłączana do białka. Jedynie pierwszy etap reakcji kontrolowany jest przez klasę proteaz ATP-zależnych. Reakcja katalizowana przez specyficzną ligazę E3 prowadzi do ostatecznego przyłączenia ubikwityny do lizyny w docelowym białku. Proces przyłączania kolejnych cząsteczek ubikwityny zwany wydłużaniem skutkuje utworzeniem łańcucha poliubikwityny i ostatecznym skierowaniem znakowanego białka do proteasomu 26S (Çetin et al., 2021). W komórkach szpiczaka proteasom odgrywa podwójną rolę. Poprzez eliminację nieprawidłowych białek pochodzących z syntezy immunoglobulin zapobiega toksycznemu efektowi ich akumulacji a także reguluje szlaki sygnałowe związane z przeżyciem komórek nowotworowych takie jak NF- κ B (El Yaagoubi et al., 2021) Konsekwencją blokady proteasomu jest nagromadzenie toksycznych białek i wywołanie programowanej śmierci komórki. Z drugiej strony zablokowanie proteasomu prowadzi do aktywacji apoptozy poprzez inhibicję NF- κ B. Proteasom działa zatem jak podwójny strażnik

— chroni komórkę przed stresem jednocześnie wspierając kluczowe szlaki sygnałowe, które utrzymują komórki MM przy życiu. Właśnie ze względu na swój dualny sposób działania PI są tak skuteczne w leczeniu MM.

2.1 Proteasom- budowa i funkcje

Proteasom to kompleks białkowy, którego składniki wykazują różne właściwości enzymatyczne. W komórkach eukariotycznych proteasomy występują w 2 podstawowych formach: 20S i 26S.

Głównym składnikiem UPS w komórkach eukariotycznych jest proteasom 26S o masie 2,4-MDa (Lo et al., 1981). Proteasom 26S katalizuje degradację białek, w tym szybką degradację białek nieprawidłowo sfałdowanych i regulatorowych (Collins & Goldberg, 2017). Struktura proteasomu 26S składa się z rdzenia katalitycznego 20S i kompleksu regulatorowego 19S. Rdzeń katalityczny zbudowany jest z 4 pierścieni tworzących strukturę cylindryczną. Każdy pierścień składa się z 7 podjednostek - zewnętrzne pierścienie to podjednostki alfa, podczas gdy wewnętrzne pierścienie są utworzone przez podjednostki beta. Miejsca katalityczne znajdują się na wewnętrznej powierzchni cylindra proteasomu 20S, gdzie wiązane są substraty białkowe. N-końcowe przedłużenie peptydu eukariotycznej podjednostki $\alpha 3$ jest kluczowym czynnikiem przyczyniającym się do otwarcia pierścienia α -przeważnie zamkniętego pod nieobecność aktywatorów (Osmulski et al., 2009). W przypadku pierścienia β tylko trzy podjednostki rdzenia wykazują aktywność enzymatyczną. $\beta 1$, $\beta 2$ i $\beta 5$ odpowiedzialne są odpowiednio za aktywność kaspazopodobną, trypsynopodobną i chymotrypsynopodobną (Budenholzer et al., 2017). Wyżej wymienione aktywności prezentowane przez podjednostki rdzenia proteasomu, są celem dla inhibitorów proteasomu, mających duży wpływ na leczenie nowotworów hematologicznych.

Drugą częścią proteasomu 26S jest aktywator 19S zbudowany z pokrywy - ośmiopodjednostkowego subkompleksu cząsteczki regulatorowej (ang. *Regulatory part*, RP) i podstawy zawierającej sześć proteasomalnych ATPaz: Rpt1-Rpt6, oraz cztery podjednostki nie będące ATPazami: Rpn1, Rpn2, Rpn10 i Rpn13. Rolą cząsteczki regulatorowej 19S jest kontrola dostępu do aktywnych miejsc proteolitycznych rdzenia 20S (Bard et al., 2018).

2.2 Immunoproteasom- budowa i sygnały prowadzące do jego powstania

W większości komórek, pod wpływem odpowiedniej stymulacji, konstytutywnie produkowany proteasom ulega przekształceniu w immunoproteasom. Jego indukcja następuje po ekspozycji na TNF i cytokiny prozapalne, takie jak IFN- α , IFN- β lub IFN- γ (Murata et al., 2018a). Ten typ proteasomu ulega natomiast ciągłej ekspresji w komórkach hematopoetycznych. Trzy standardowe katalitycznie aktywne podjednostki rdzenia $\beta 1$, $\beta 2$ i $\beta 5$ są zastępowane przez podjednostki $\beta 1i$ (LMP2), $\beta 2i$ (MECL-1) i $\beta 5i$ (LMP7), podczas gdy część regulatorowa 19S jest zastępowana przez regulatorową strukturę 11S (Crawford et al., 2011). Izoforma proteasomu generowana przez IFN- γ została nazwana immunoproteasomem, aby podkreślić jego rolę w przetwarzaniu antygenów wewnątrzkomórkowych w celu prezentacji na głównym układzie zgodności tkankowej klasy I (ang. *Major Histocompatibility Complex*, MHC I). Szybką odpowiedź na bodźce immunologiczne zapewnia szybkość składania immunoproteasomu, która jest czterokrotnie szybsza niż w przypadku proteasomu konstytutywnego (Murata et al., 2018b)

3. Klasyfikacja i znaczenie kliniczne szpiczaka plazmocytozy

Stanem przednowotworowym MM jest gammopatia monoklonalna o nieustalonym znaczeniu (ang. *Monoclonal gammopathy of undetermined significance*, MGUS) ze stanem pośrednim tłącego się szpiczaka (ang. *Smoldering multiple myeloma*, SMM), będącego jego bezobjawową odmianą. Zarówno MGUS jak i SMM charakteryzują się obecnością białka M, czyli białka monoklonalnego, zwanego paraproteiną, oraz zajęciem BM przez PC, przy jednoczesnym braku zmian osteolitycznych, hiperkalcemii, niedokrwistości i upośledzeniu funkcji nerek towarzyszącym zaburzeniom proliferacji komórek plazmatycznych. Samo ryzyko progresji do MM związane jest ze stanem początkowym. W przypadku SMM ryzyko progresji do MM jest 10 razy większe niż w przypadku MGUS (Mahindra et al., 2010). Chociaż źródła MGUS/SMM i MM pozostają w dużej mierze nieznane, badania epidemiologiczne wykazały, że MM jest związany ze starszym wiekiem. Większość przypadków (90%) występuje powyżej 50 r.ż., a mediana wieku w czasie rozpoznania wynosi ok. 70 lat (Silberstein et al., 2022).

MM jest chorobą heterogeniczną, z licznymi nieprawidłowościami chromosomalnymi w obrębie PC, wśród których można wyróżnić translokacje oraz zmiany w obrębie ilości oraz struktury chromosomów (Rajkumar, 2022). Translokacje obejmujące geny łańcucha ciężkiego immunoglobulin (ang. *immunoglobulin heavy chain*, IGH), do których należą: t(11;14), t(6;14),

t(4;14), t(14;16) i t(14;20) prowadzą do nadekspresji odpowiednio cykliny D1, cykliny D3, FGFR3/MMSET, c-MAF i MAF-B. Tymczasem nieprawidłowości na chromosomie 1, delecje 17p i wtórne translokacje do genu MYC, są kluczowymi zmianami genetycznymi związanymi z progresją. Te dwie ostatnie nieprawidłowości powodują odpowiednio utratę supresora nowotworu p53 lub nadekspresję onkogenu c-MYC (Chesi & Bergsagel, 2013; Herrero et al., 2016). Pomimo tej różnorodności genetycznej na poziomie DNA, profilowanie ekspresji genów ujawniło wspólną cechę genetyczną MM, którą jest dysregulacja jednego z trzech genów D-cykliny. Ekspresja *CCND1*, *CCND2* lub *CCND3* jest zwiększona praktycznie we wszystkich przypadkach MM (Yadav & Gonsalves, 2024). U około połowy pacjentów ekspresja na poziomie mRNA nie przekłada się na poziom białka, co może sugerować, że cykliny-D mogą nie odgrywać roli onkogennej u części pacjentów z MM. Na podstawie opisanych zmian zidentyfikowano dwie grupy pacjentów z MM: i) grupa wysokiego ryzyka (z ang. *high risk*, HR), z obecnością co najmniej jednej z następujących zmian: (del17p), t(4;14) lub t(14;16), t(14;20), gain(1q), dowolne 2 anomalie genetyczne wysokiego ryzyka („double hit”) lub obecność minimum 3 anomalii genetycznych wysokiego ryzyka („triple hit”) oraz ii) grupę standardowego ryzyka, obejmującą wszystkie inne aberracje chromosomalne w tym: trisomie, t(11;14) lub t(6;14) (Rajkumar, 2024a).

4. Schematy leczenia szpiczaka

Leczenie MM szybko ewoluuje. Początkowy wpływ na rozwój miało wprowadzenie talidomidu, bortezomibu i lenalidomidu. Leki przeznaczone do leczenia nawrotowego MM wprowadzane na przestrzeni kolejnych lat jeszcze bardziej poprawiły wyniki leczenia. Zatwierdzone leki na szpiczaka działają w oparciu o różne mechanizmy, z których nie wszystkie są w pełni poznane.

Obecne terapie MM opierają się głównie na potrójnych kombinacjach, w tym inhibitorach proteasomu (PIs: bortezomib (V-Velcade®), karfilzomib i iksazomib), lekach immunomodulujących (IMiDs - talidomid (T), lenalidomid (R-Revlimid®) lub pomalidomid), cyklofosfamid (C) i glikokortykoidach (GC), takich jak deksametazon (D). Czterokrotny schemat daratumumabu, bortezomibu, lenalidomidu i deksametazonu (Dara-VRd) stał się ostatnio standardem leczenia początkowego u pacjentów kwalifikujących się do przeszczepu z nowo zdiagnozowanym szpiczakiem plazmocytowym (ang. *Newly diagnosed multiple myeloma*, NDMM). Wskaźniki odpowiedzi, ujemne wskaźniki choroby resztkowej- małej liczby przetrwałych w organizmie komórek nowotworowych, w ilościach niewykrywanych

standardowo stosowanymi metodami diagnostycznymi (ang. *Minimal residual disease*, MRD) i przeżycie wolne od progresji (ang. *Progression free- survival*, PFS) są lepsze w przypadku Dara-VRd w porównaniu ze schematem leczenia opartym na z bortezomibie, lenalidomidzie i deksametazonie (VRd) (Rajkumar, 2024b).

Ponadto do dyspozycji są także nowe terapie, takie jak przeciwciała monoklonalne, inhibitory deacetylazy histonów (z ang. *histone deacetylase inhibitors*, HDACis) czy terapia wykorzystująca zmodyfikowane (chimeryczne) limfocyty T (ang. *chimeric antigen receptor T-cell therapy*, CART).

Pierwsze zatwierdzone do leczenia MM ludzkie przeciwciało monoklonalne-daratumumab skierowane przeciwko CD38 wykazuje aktywność przeciwszpiczakową poprzez cytotoksyczność komórkową zależną od przeciwciał (z ang. *Antibody-dependent cell cytotoxicity*, ADCC), fagocytozę komórkową zależną od przeciwciał (z ang. *Antibody-dependent cellular phagocytosis*, ADCP), cytotoksyczność zależna od dopełniacza (z ang. *Complement-dependent cytotoxicity*, CDC) czy bezpośrednią apoptozę i immunomodulację (Offidani et al., 2021). Elotuzumab z kolei jest humanizowanym przeciwciałem IgG1 skierowanym przeciwko cząsteczce F7 aktywacji limfocytów sygnalizujących (z ang. *antibody targeting signaling lymphocytic-activation molecule F7*; SLAMF7)- cząsteczce ulegającej wysokiej ekspresji na komórkach plazmatycznych MM. Elotuzumab selektywnie rozpoznaje SLAMF7, działając poprzez cytotoksyczność komórkową zależną od przeciwciał na komórkach MM z ekspresją SLAMF7 i bezpośrednią aktywację komórek NK (Bruzzese et al., 2023). Skuteczność leków z grupy HDACis przypisuje się zakłóceniu wielu procesów wywołanych hamowaniem deacetylazy histonowej czego konsekwencją w przypadku MM jest tłumienie sygnalizacji NF- κ B i HSP90, zwiększona ekspresja regulatorów cyklu komórkowego (p21, p53) i redukcja białek antyapoptotycznych, w tym Bcl-2. Inhibitory HDAC wzmacniają prawidłową funkcję immunologiczną, zmniejszając w ten sposób proliferację złośliwych komórek plazmatycznych i promując autofagię (Pu et al., 2024). Terapia CART polega z kolei na genetycznej modyfikacji limfocytów T pobranych od pacjenta w taki sposób by stały się zdolne do rozpoznawania i eliminacji nowotworowych komórek plazmatycznych (Cohen et al., 2022; Moreau et al., 2021)

Wprowadzenie nowych immunoterapii zmieniło sposób leczenia MM przyczyniając się do poprawy wyników pacjentów. Intensywne leczenie jednak w dużej mierze w dalszym ciągu wiąże się z krótszym czasem przeżycia. Sposobem na rozwiązanie tej sytuacji są bispecyficzne przeciwciała (BsAb), które jednocześnie wiążą się z komórkami efektorowymi układu odpornościowego i komórkami MM. Obecnie opracowywanych jest kilka BsAb

przekierowujących komórki T, które celują w antygen dojrzewania limfocytów B (z ang. *B cell maturation antigen*, BCMA), receptor sprzężony z białkiem G (z ang. *G protein-coupled receptor family C group 5 member D*, GPRC5D) i homolog receptora Fc 5 (z ang. *Fc receptor homologue 5*, FcRH5). Te BsAb wykazują imponującą aktywność kliniczną w odniesieniu do populacji z nawrotem/opornością na leczenie i prawdopodobnie staną się istotną częścią protokołów leczenia MM w przyszłości (Landgren & Nadeem, 2023).

4.1. Leki immunomodulujące

IMiD to grupa związków będących analogami talidomidu, pochodnej kwasu glutaminowego. Ze względu na swoją aktywność przeciw TNF wykazuje właściwości antyangiogenne i silne działanie przeciwzapalne. Jeśli chodzi o cele komórkowe i mechanizm działania IMiDs, badania przedkliniczne ujawniły wiele efektów, w tym ich działanie przeciwproliferacyjne, antyangiogenne, przeciwzapalne i współstymulujące komórki T. Mechanizm współstymulacji limfocytów T przez IMiD obejmuje zwiększoną aktywność transkrypcyjną aktywowanego białka-1 (ang. *activating protein-1*, AP-1), kluczowego czynnika napędzającego produkcję IL-2. Ta zwiększona transkrypcja i produkcja IL-2 z kolei promuje proliferację i aktywność komórek zwanych „naturalnymi zabójcami” (ang. *Natural killers*, NK), zwiększając w ten sposób również aktywność wrodzonego układu odpornościowego (Strzelec et al., 2023). Wykazano, że lenalidomid zwiększa zależną od ADCC i naturalną cytotoksyczność komórek NK. ADCC to proces, w którym immunoglobuliny przyłączone do antygenów nowotworowych aktywują receptory Fc na komórkach NK. Wyzwala cytotoksyczność komórek nowotworowych, poprzez perforyny i granzymy uwalniane przez komórki NK, a także apoptozę komórek nowotworowych indukowaną przez ligandy śmierci: ligand Fas (ang. *Fas ligand*, FasL) i ligand indukujący apoptozę związany z czynnikiem martwicy nowotworów (ang. *Tumour necrosis factor-related apopto-sis-inducing ligand*, TRAIL) (Quach et al., 2010).

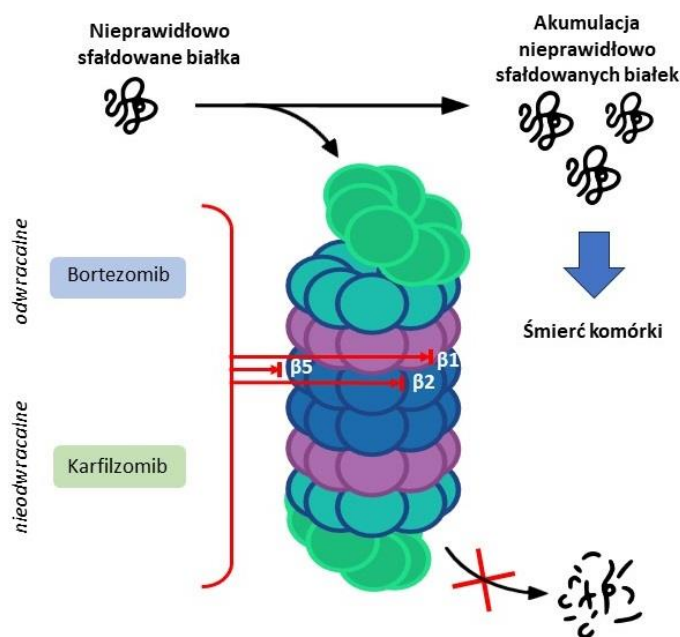
4.2. Inhibitory proteasomu

PI to grupa leków skupiających swoje działanie na fundamentalnym procesie metabolicznym jakim jest proteoliza. Poprzez całkowite zablokowanie aktywności proteasomu, prowadzą do śmierci komórki (*Rycina 1*). Bortezomib oprócz działania na komórki MM, wykazuje również wpływ na mikrośrodowisko BM. Przyczynia się do hamowania adhezji komórek MM do komórek zrębu szpiku kostnego, co zwiększa wrażliwość na apoptozę, a także wykazuje działanie anaboliczne na kości (Curran & McKeage, 2009). Bortezomib przerywa prożyciowe parakrynnie i autokrynnie pętle cytokinowe w mikrośrodowisku BM, w których pośredniczą interleukina-6 (ang. *Interleukin-6*, IL-6), czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (ang. *Insulin-like growth factor*, IGF-1) i czynnik martwicy nowotworów α (ang. *tumor necrosis factor α* , TNF- α) (Hideshima et al., 2003). Główny mechanizm jego działania opiera się na stabilizacji kompleksu czynnika jądrowego kappa B (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NF κ B). Bortezomib indukuje zmiany w poziomie ekspresji genów zaangażowanych w regulację apoptozy, funkcji proteasomu, wzrostu komórek i odpowiedzi na szok cieplny (Khalesi et al., 2021).

Drugim przedstawicielem leków z grupy PI jest karfilzomib - inhibitor drugiej generacji o podobnym działaniu proapoptotycznym do bortezomibu. Oba inhibitory inicjują apoptozę poprzez szlak zewnętrzny, w którym pośredniczy aktywacja sygnalizacji zależnej od Fas/kaspazy-8 oraz szlak wewnętrzny obejmujący uwalnianie cytochromu c i aktywację kaspazy-9 (Kuhn et al., 2007). Wykazano, że karfilzomib indukuje, zależne od dawki i czasu, hamowanie proliferacji prowadzące do zaprogramowanej śmierci komórki. Apoptoza w tym przypadku jest związana z depolaryzacją błony mitochondrialnej, aktywacją szlaków kaspaz i kinazy c-Jun-N-końcowej (Ziogas et al., 2017).

Marizomib jest nowym lekiem z grupy nieodwracalnych PI przekraczających barierę krew-mózg przeznaczonym do leczenia pacjentów z nawrotowym lub opornym na leczenie szpiczakiem mnogim (z ang. *relapsed or refractory multiple myeloma*, RRMM). Podobnie jak w przypadku bortezomibu, marizomib celuje w NF- κ B jednak co ważne w porównaniu z bortezomibem jest silniejszym inhibitorem NF- κ B i związanego z nim wydzielania cytokin (Bozic et al., 2021). Śmierć komórek MM indukowana marizomibem jest związana ze spadkiem mitochondrialnego potencjału błonowego oraz indukcją apoptozy głównie przez kaspazę-8. Dotychczasowe badania wskazują, że marizomib jest bardziej zależny od domeny

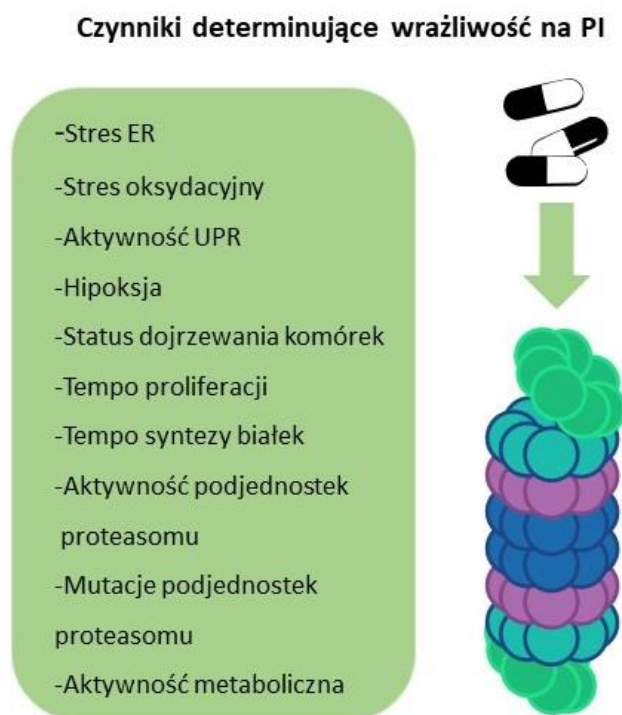
śmierci związanej z FAS niż bortezomib sugerując zróżnicowany sposób działania tych dwóch PI przeciwko komórkom MM. Ponadto, w przeciwieństwie do marizomibu, apoptoza indukowana bortezomibem wymaga aktywacji proapoptotycznego szlaku sygnałowego (Potts et al., 2011).



Rycina 1. Schemat działania leków z grupy inhibitorów proteasomu (Na podstawie (Pelon et al., 2024)).

4.3. Czynniki wpływające na działanie inhibitorów proteasomu

PI są znane ze swojej skuteczności w leczeniu MM. Leki z tej grupy wykazują unikalne cechy w porównaniu z innymi lekami przeciwnowotworowymi. Choć dysponujemy obecnie dużą wiedzą na temat PI, wszystkie mechanizmy ich działania, a także podatność na ich wpływ u przyjmujących je pacjentów wciąż pozostają niejasne. Jakie mechanizmy odpowiadają za wrażliwość komórek nowotworowych na inhibitory proteasomu i co determinuje siłę odpowiedzi na dany lek - odpowiedzi na te pytania wciąż pozostają w sferze badań i spekulacji. Poniżej omówiono niektóre z głównych czynników determinujących stopień odpowiedzi na leki z grupy inhibitorów proteasomu (Rycina 2).



Rycina 2. Czynniki determinujące wrażliwość na PI w MM (Na podstawie (Pelon et al., 2024))

Niepowodzenie w fałdowaniu, transporcie lub degradacji białek może powodować stres ER, który jest określany jako brak równowagi między komórkowym zapotrzebowaniem na funkcję ER, a pojemnością ER. Stres ER prowadzi do aktywacji UPR, który jest wysoce konserwatywną grupą szlaków odpowiedzialnych za przywracanie homeostazy. Hamowanie proteasomu aktywuje stres ER, powodując zwiększoną ekspresję ATF4, a następnie regulację ATF3. Heterodimeryzacja tych dwóch białek promuje aktywację czynników proapoptotycznych. W komórkach MM, stres ER i następująca po nim UPR są głównymi mechanizmami wyzwalającymi apoptozę indukowaną PI (Obeng et al., 2006a). Wykazano, że bortezomib hamuje proliferację komórek zwiększając jednocześnie ekspresję ATF3. Uzyskane wyniki potwierdziły wcześniejsze doniesienia opisujące zwiększoną oporność na bortezomib po obniżeniu ekspresji ATF3. Dodatkowo wyciszenie ATF3 w komórkach szpiczaka obniża wpływ bortezomibu na apoptozę wskazując ATF jako ważny regulator skuteczności PI przeciwko MM (Lai et al., 2021).

Ponieważ system proteasomalny jest odpowiedzialny za degradację niefunkcjonalnych białek, a także za odpowiedź komórki na stres oksydacyjny, oczekuje się, że komórki posiadające zwiększoną aktywność proteasomu, będą miały zwiększoną przeżywalność. Bardziej funkcjonalny proteasom zapewnia zwiększoną przeżywalność po leczeniu farmakologicznym, a tym samym zmniejsza wrażliwość na PI.

Celem degradacji mogą być nie tylko nieprawidłowe ale także nowo syntetyzowane białka. Brak równowagi między stopniem obciążenia proteasomu, a jego wydajnością prowadzi do akumulacji białek poliubikwitynowanych. Powyższe procesy poprzez zwiększenie obciążenia proteasomu, a także aktywację procesów adaptacyjnych, prowadzą z kolei do zaburzenia homeostazy.

Wykazano, że zarówno poziom stresu, jak i wrażliwość na hamowanie proteasomu, były skorelowane z szybkością proliferacji komórek. Spadek tempa proliferacji prowadził do znacznego obniżenia poziomu poliubikwitynowanych białek i toksyczności inhibicji proteasomów. Różną toksyczność inhibitorów proteasomu, wiązano zatem głównie z warunkami stresowymi i reakcjami adaptacyjnymi (Bazzaro et al., 2006).

Adaptacja metaboliczna jest kolejnym ważnym czynnikiem kształtującym odpowiedź komórek na PI. Obejmuje ona zmiany w metabolizmie glukozy, szlaku fosforanu pentozy (PPP), mitochondrialnym transporcie pirogronianu i metabolizmie seryny. Niedotlenienie jako brak równowagi między zwiększonym zapotrzebowaniem na tlen, a niewystarczającą jego podażą, jest stanem obniżonego poziomu tlenu. W szpiczaku indukuje on odróżnicowanie komórek czy obniża tempo proliferacji. Promuje również progresję nowotworu. (Maiso et al., 2015a).

Również metabolizm seryny odgrywa kluczową rolę we wrażliwości na PI. Wykazano, że zmieniony metabolizm seryny, był obecny we wszystkich badanych liniach komórkowych opornych na bortezomib, w porównaniu z liniami wrażliwymi, co wskazuje, że odgrywa on ważną rolę we wrażliwości na PI. Występowanie oporności wiąże się nie tylko z wysoką aktywnością szlaku syntezy seryny, ale także z nadekspresją dehydrogenazy fosfoglicerynianowej (ang. *Phosphoglycerate dehydrogenase*, PHGDH). (Wu et al., 2020; Zaal et al., 2017)

Ważnym czynnikiem transkrypcyjnym w odniesieniu do komórek nowotworowych i ich podatności na PI jest NF- κ B regulujący reakcje zapalne i immunologiczne, a także proliferację

i przeżycie komórek nowotworowych. Jako odwracalny PI, bortezomib hamuje aktywację NF- κ B, zapobiegając jego proteasomalnemu rozszczepieniu i degradacji represora kinazy I κ B. Głównym mechanizmem działania bortezomibu w MM jest hamowanie podjednostki odpowiedzialnej za aktywność chymotrypsynową w rdzeniu proteolitycznym 20S, indukując w ten sposób zatrzymanie cyklu komórkowego i apoptozę poprzez tłumienie sygnalizacji NF- κ B. I κ B, czynnik hamujący NF- κ B, jest substratem proteasomu 26S. PI powoduje akumulację I κ B, co skutkuje blokowaniem translokacji jądrowej NF- κ B i wykazuje aktywność przeciwnowotworową przeciwko komórkom MM (Bai & Su, 2021).

5. Białko gankyrina

W opracowywaniu zindywidualizowanych interwencji terapeutycznych istotną rolę pełnią biomarkery. Zmiany komórkowe, biochemiczne lub molekularne, które można zmierzyć w ludzkich tkankach czy komórkach zdefiniowane zostały jako biomarkery. Wykazywane przez nie cechy biologiczne mogą służyć jako wskaźnik prawidłowych i patogennych procesów biologicznych lub odpowiedzi farmakologicznych na interwencje terapeutyczne (Mayeux, 2004). Ustalenie korelacji między chorobami a zmianami w biomarkerach może przyczynić się zatem do lepszego zrozumienia przyczyn, progresji choroby lub samego wyniku leczenia. Wiele chorób wiąże się ze zmianami w szlakach molekularnych jednak weryfikacja powiązań między chorobami a dużymi zestawami biomarkerów jest ogromnym wyzwaniem (Aronson & Ferner, 2017)

Potencjalnym czynnikiem prognostycznym w przypadku MM wydaje się być gankyrina. To białko onkogenne odgrywające ważną rolę w rozwoju wielu nowotworów jest kodowane przez gen *PSMD10*, którego locus mieści się na chromosomie X.

Gankyrina po raz pierwszy została odkryta w drożdżach. Badania prowadzone z ludzką ATP-azą S6 proteasomu 26S, zidentyfikowały gankyrinę jako białko oddziałujące zarówno z wolnymi jak i regulatorowymi kompleksami S6. Gankyrina jest jednym z wielu powtarzających się białek pomocniczych wymaganych do złożenia cząsteczki regulacyjnej proteasomu. To stosunkowo małe białko składa się z 226 aminokwasów, które w sposób niestabilny wiążą się z ATPazą S6 cząsteczki regulatorowej 19S proteasomu 26S (Kanabar & Muth, 2020; Kashyap et al., 2022).

Podwyższony poziom gankyriny został odnotowany w wielu guzach litych takich jak: rak płuc, wątroby, trzustki, jamy ustnej, jajnika, jelita grubego czy glejaka (H. Li et al., 2018). Dodatkowo, analiza poziomu białka gankyrina w próbkach pobranych od pacjentów z NDMM. wykazała, że podwyższony poziom białka gankyrina w komórkach plazmatycznych wiąże się z gorszym rokowaniem wśród pacjentów leczonych według schematu VRD (Misiewicz-Krzeminska et al., 2020a).

Gankyrina w guzach litych odgrywa rolę onkoproteiny i jest zaangażowana w negatywną regulację supresorów nowotworowych RB, P53 czy KEAP1.

Zaangażowany w stabilność genomu supresor nowotworu RB jest częścią systemu naprawy DNA. Podczas procesu naprawy RB z jądra rekrutowany jest on do miejsc pęknięć DNA (Dick et al., 2018). Dezaktywacja omawianego szlaku upośledza zatem mechanizm naprawy materiału genetycznego, prowadząc w konsekwencji do ogromnej liczby nieprawidłowości genomowych występujących w komórkach szpiczaka (Gourzones-Dmitriev et al., 2013). W zależności od lokalizacji komórkowej, RB reguluje różne aspekty biologii komórkowej. W stanie spoczynku RB wiąże się z rodziną białkowych czynników transkrypcyjnych E2F w postaci niefosforylowanej i zapobiega indukcji progresji cyklu komórkowego. Po fosforylacji RB przez CDK, E2F są uwalniane i ułatwiają wejście w fazę S. Oprócz roli regulatora fazy S w jądrze, RB jest również zlokalizowany w cytoplazmie, gdzie może modulować funkcje mitochondriów i indukować apoptozę. Aktywacja progresji cyklu komórkowego jest kontrolowana przez UPS. Inhibitory CDK4/6 nie tylko powodują defosforylację RB, ale prawie zawsze również spadek poziomu białka RB. Wykazano, że gankyrina uczestniczy w degradacji RB wywołanej inhibicją CDK4/6 (Hong et al., 2024).

Innym z mechanizmów onkogennych przypisywanych gankyrinie jest rekrutacja kompleksu MDM2/p53 do proteasomu (ang. *mouse double minute 2*, MDM2). W tym procesie białko gankyrina wiąże się z białkiem MDM2 i zwiększa jego zdolność do ubikwitynacji p53 odpowiedzialnego za ograniczanie proliferacji genetycznie uszkodzonych komórek. P53 jest w stanie hamować rozwój nieprawidłowych komórek poprzez indukcję trwałego zatrzymania cyklu komórkowego, starzenia się lub aktywację śmierci, gdy uszkodzenie komórki jest zbyt poważne (Lozano & Zambetti, 2005). Wykazano, że wyciszenie gankyriny powoduje wzrost ekspresji białka p53, bez zmiany jego ekspresji na poziomie mRNA. Eksperymenty koimmunoprecypitacji wykazały, że gankiryna i MDM2 tworzą kompleks w komórkach raka piersi. W mysich fibroblastach embrionalnych pozbawionych zarówno MDM2, jak i p53,

zaobserwowano, że kompleks gankyrin/MDM2 prowadzi do ubikwitynacji p53. Co więcej, wyciszenie ekspresji gankyriny w komórkach zakłóciło tworzenie kompleksu gankyrin/MDM2 utrudniając degradację p53 (Lei et al., 2023).

Gankyrina oddziałująca z Keap1 (ang. Kelch-like ECH-associated protein 1) ściśle reguluje jądrowy czynnik transkrypcyjny pochodzenia erytroidalnego typu 2 (ang. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*, Nrf2). Dane literaturowe wskazują na pełnienie przez geny docelowe dla Nrf2 istotnych funkcji związanych z przeżyciem komórek nowotworowych i onkogenezą. Deregulacja aktywności transkrypcyjnej Nrf2 wywołana przez białko KEAP1 została opisana w patogenezie wielu chorób, a oś Nrf2/Keap1 stała się kluczowym modulatorem homeostazy komórkowej. Skuteczna konkurencja gankyriny z Nrf2 o wiązanie KEAP1 prowadzi do zahamowania degradacji Nrf2 przez proteasom. Regulacja sprzężenia zwrotnego obejmująca Nrf2 i gankyrinę, zapobiega śmierci komórek i uszkodzeniom mitochondriów indukowanym przez ciągły stres oksydacyjny w komórkach nowotworowych wątroby (Wang & Cheng, 2017)

Potwierdzone jest również oddziaływanie gankyriny z Rel A, podjednostką kompleksu białkowego NF- κ B. NF- κ B pełni nadzór nad genami zaangażowanymi w apoptozę, proliferację i różnicowanie komórek, odpowiedzi immunologiczne czy zapalne. Aktywność transkrypcyjna NF- κ B jest wyciszana w cytoplazmie przez I κ B. Różne białka z rodziny I κ B zawierają powtórzenia ankyryny, ułatwiające jej wiązanie z domeną homologii Rel. Właśnie ze względu na podobieństwo strukturalne gankyrina odgrywa rolę w regulacji szlaku NF- κ B/I κ B hamując aktywność transkrypcyjną NF- κ B poprzez modulację acetylacji aktywności RelA (Kashyap et al., 2022)

II. Cel pracy

Mimo licznych dostępnych terapii oraz postępów w zakresie strategii terapeutycznych MM jest nadal uważany za chorobę nieuleczalną. U zdecydowanej większości pacjentów choroba nawraca, doprowadzając do oporności na leczenie, co w konsekwencji skutkuje bardzo niekorzystnymi rokowaniami w przypadku leczenia z wykorzystaniem PI lub IMiD. W związku z tym poszukiwanie nowych celów terapeutycznych i badanie mechanizmów ich działania, stanowi kluczowy obszar badań. Analizy poziomu białek w próbkach pobranych od pacjentów, w zależności od zastosowanego schematu leczenia, pozwoliły bliżej przyjrzeć się problemowi. Przeprowadzone analizy wskazały białko gankyrina jako czynnik związany z gorszym rokowaniem wśród pacjentów, leczonych według schematu VRD, sugerując w ten sposób jego potencjalne zaangażowanie w odpowiedź na leki z grupy PI i IMiD.

Biorąc pod uwagę przedstawione fakty, hipoteza badawcza niniejszej pracy brzmi: **Białko gankyrina bierze udział w odpowiedzi na leczenie szpiczaka plazmocytozowego z wykorzystaniem leków przeciwszpiczakowych.**

Celem niniejszej pracy, była ocena roli gankyriny, w odpowiedzi na leczenie szpiczaka plazmocytozowego, z wykorzystaniem najczęściej stosowanych klas leków przeciwszpiczakowych.

Cele szczegółowe niniejszej rozprawy doktorskiej:

1. Ocena wpływu gankyriny na wybrane parametry komórek szpiczaka, z wykorzystaniem modeli ludzkich linii komórkowych szpiczaka, poddawanych modyfikacjom poziomu i obecności gankyriny.
2. Ocena wpływu poziomu gankyriny na skuteczność leczenia szpiczaka plazmocytozowego, z zastosowaniem terapii przeciwszpiczakowych
 - 2.1 Ocena wpływu poziomu *PSMD10/gankyriny* na przeżycie pacjentów z MM w kontekście różnych schematów leczenia
 - 2.2 Porównanie aktywności leków przeciwszpiczakowych na linie komórkowe szpiczaka o zmienionej ekspresji gankyriny
3. Zbadanie wpływu gankyriny na regulację ścieżek sygnałowych w komórkach szpiczaka, z wykorzystaniem modeli ludzkich linii komórkowych szpiczaka, pozbawionych ekspresji gankyriny.

III. Materiały

1.Odczynniki

Tabela 1. Stosowane w pracy odczynniki.

Nazwa	Producent	Nr katalogowy
Aceton	POCH	
Agar	Roth	
Albumina bydlęca		
Alkohol etylowy	POCH	
Alkohol izopropylowy	POCH	
Alkohol metylowy	POCH	
Ampicylina	Sigma	
BigDie	Thermo Fischer	4337455
Bortezomib	Tocris	7282
Chlorek manganu	POCH	
Chlorek sodu	POCH	
Chlorek rubidu	POCH	
Deksametazon	Tocris	1126
Deoksynukleotydu (dNTP)	EurX	E0503-01
DMSO	Sigma	D8418
Doksocyklina	Sigma	
Ekstrakt drożdżowy	Roth	
Etylenodiaminotetraoctan (EDTA)	Sigma	
Genetycyna	Roth	
Glicerol	POCH	
GreenSafePremium	NZYtech	MB13201

Karfilzomib	Tocris	7188
Kwas 4-morfolinopropanosulfonowy (MOPS)	Roth	
Kwas octowy	POCH	
Kwas solny	POCH	
Medium RPMI1640 bez metioniny	Gibco	A1451701
Melfalan	Selleckchem	S8266
MTS	Promega	G3581
B-Merkaptoetanol	Gibco	
NP40	Invitrogen	
Lenalidomid	Tocris	6305
Panobinostat	Selleckchem	S1030
PBS	Milipore	524650
Tris(hydroksymetylo)aminoetan (Tris)	BioShop	
Trypton	Roth	

2. Enzymy i odpowiadające im bufor

Tabela 2 . Stosowane w pracy enzymy.

Enzym	Bufor	Producent	Nr katalogowy
BstXI	Fast Digest Green	ThermoFisher	FD1024
SacI	Fast Digest Green	ThermoFisher	FD1133
SFII	Bufor G	ThermoFisher	ER1821
BglI	Bufor O	ThermoFisher	ER0071
ligaza T4	bufor do ligazy T4	ThermoFisher	EL0011

3. Bufory

Tabela 3 . Stosowane w pracy bufory.

Nazwa	Skład	Molarność
Bufor do lizy	NaCl	5M
	Tris-HCl pH 7	1M
	EDTA	0,5M
	glicerol	
	NP40	
	dH ₂ O	
Bufor transformujący I	RbCl	100mM
	MnCl ₂	50mM
	CH ₃ COOH	30mM
	CaCl ₂	100mM
	15% v/v glicerol pH 5,8	
Bufor transformujący II	RbCl	100mM
	CaCl ₂	75mM
	MOPS	20mM
	15% v/v glicerol pH 6,4	
Bufor TAE	Tris-HCl pH 8	40mM
	EDTA	1mM

4. Gotowe zestawy odczynników

Tabela 4 . Stosowane w pracy zestawy odczynników.

Nazwa	Producent	Nr katalogowy
Zestaw do izolacji DNA/RNA „Universal DNA/RNA/ Protein Purification Kit”	EurX	E3597-02
Zestaw do izolacji DNA plazmidowego na małą skalę „Plasmid Miniprep DNA Purification Kit”	EurX	E3500-01
Zestaw do izolacji DNA plazmidowego na dużą skalę „EndoFree Plasmid Maxi Kit”	Qiagen	12362
Zestaw do usuwania terminatorów po reakcji sekwencyjnej „ExTerminator”	A&A Biotechnology	444-50
Zestaw do oczyszczania DNA po reakcji PCR „DNA & RNA Cleaner”	NZYtech	021-50
Zestaw do reakcji qPCR „GoTag qPCR Master Mix”	Promega	A6002
Zestaw do reakcji odwrotnej transkrypcji „Transcriptor Universal cDNA Master”	Roche	05893151001

Zestaw do wykrywania komórek apoptycznych „FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I”	BD Biosciences	556547
Zestaw do separacji białek 12-230 kDa	Biotechnne/proteinsimple	
Zestaw do oznaczania stężenia białka „Pierce™ BCA™”	ThermoFischer Scientific	786-0000
Zestaw do badania syntezy białek <i>de novo</i> „The Click-iT™	Invitrogen	C10428
HPG Alexa Fluor™ 488 Protein Synthesis Assay Kit”		
Zestaw do oceny aktywności podjednostek proteasomu „Cell-Based Proteasome-Glo™ Assays”	Promega	G1180

5. Standardy DNA

Tabela 5 . Stosowane w pracy wzorce wielkości.

Nazwa	Producent	Nr katalogowy
GeneRuler™ 100bp Plus Ladder	Thermo Scientific™	SM0322
GeneRuler™ 100bp Ladder	Thermo Scientific™	15628050

6. Przeciwciała

Tabela 6. Charakterystyka stosowanych w pracy przeciwciał.

Nazwa	Producent	Nr katalogowy
Królicze monoklonalne przeciwciała skierowane przeciwko Gankyrinie	Abcam	EPR14455
Królicze monoklonalne przeciwciała skierowane przeciwko GAPDH	Cell Signalling	2118
Mysie przeciwciała monoklonalne Ki-67	BioLegend	652404

7. TaqMan

Tabela 7. Charakterystyka stosowanych w pracy sond TaqMan.

Nazwa	Gen	Producent	Nr katalogowy
Hs00605652_m1	Psmb5		4331182
Hs00382586_m1	Psmb6		4331182
Hs00160607_m1	Psmb7	Thermo Scientific™	4331182
Hs00544758_m1	Psmb8		4331182
Hs00160610_m1	Psmb9		4331182

8. Oligonukleotydy

Tabela 8. Charakterystyka stosowanych w pracy oligonukleotydów.

Nazwa	Sekwencja 5'-3'	Zastosowanie
gRNA1	CTCTCAGCTGGTACACGGCA	Edycja genetyczna- wyłączenie ekspresji genu
gRNA2	GAGAATCAAAATCGGTGAAT	
gRNA3	ACAAAACTGTGCTAGACATG	

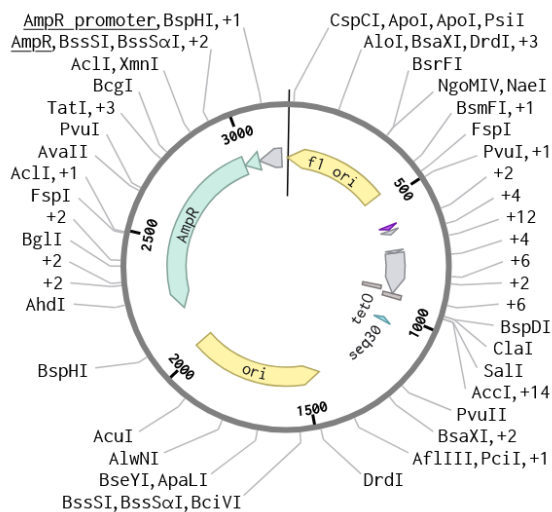
sh1F	gatctGGTTCTACTGTTGTCGTATATTTTCAAGAGAAATATACGACA ACAGTAGAACTTTTTTgagct	Edycja genetyczna- wyciszenie ekspresji genu
sh1R	cAAAAAAGTTCTACTGTTGTCGTATATTTCTCTTGAAAATATACG ACAACAGTAGAACC	
sh2 F	gatctGGGAAGCTGGAAGAGTTGAATTCAAGAGATTCAACTCTTCC AGCTTCCTTTTTTgagct	
sh2 R	cAAAAAAGGAAGCTGGAAGAGTTGAATCTCTTGAATTCAACTCT TCCAGCTTCCCa	
sh3 F	gatctGGGAGTGCCAGTGAATGATATTCAAGAGATATCATTCACTG GCACTCCTTTTTTgagct	
sh3 R	cAAAAAAGGAGTGCCAGTGAATGATATCTCTTGAATATCATTCA CTGGCACTCCCa	
sh4 F	gatctGGAAGAGTTGAAGGAGAGTATTTTCAAGAGAAATACTCTCC TTCAACTCTTCTTTTTTgagct	
sh4 R	cAAAAAAGAAGAGTTGAAGGAGAGTATTTCTCTTGAAAACTCT CCTTCAACTCTTCCa	
sh5 F	GatctGTAGTAGCCAGGGATTTATCGGTTCAAGAGATAGTACCCAG GGATTTATCGGTTTTTgagct	
sh5 R	cAAAAAACCGATAAATCCCTGGCTACTATCTCTTGAACCGATAA ATCCCTGGCTACTACa	
Seq30	AAACAGCTATGAC	Sekwencjonowanie
201Seq Rev2	GGACTTTCCACACCCTAACT	
GAPDH_F	CATGCCATCACTGCCACCC	
GAPDH_R	ACCTGGTGCTCAGTGTAGC	Reakcje qPCR
ACTIN_B_F	CGCCGCCAGCTCACCATG	
ACTIN_B_R	CACGATGGAGGGGAAGACGG	
ADORA1_F1	GCCCAGCATCCTTAATACA	
ADORA1_R	CTTCTGGGAGATCCTCGTCA	
SLAMF7_F1	GTGGACATTTGTCTGGGAAAC	
SLAMF7_R	GGCAAATAGCCTTGGTGTGT	
TNFSF10_F	TTCACAGTGCTCCTGCAGTC	
TNFSF10_R	ACGGAGTTGCCACTTGACTT	
NFE2L1_F1	GAGGTAAATGCCTGGCTGGT	
NFE2L1_R	AGGGGGCTCACTCTCACTAG	
TENM3_F1	CAGTTCCAGCGAGACATTGA	
TENM3_R	TCCTCTTCGAGTTGCTGGTT	
HSP90AA1_F	ATGAAACTGCGCTCCTGTCT	
HSP90AA1_R	TTCTTCCATGCGTGATGTGT	
SMAD1_F	CTACCCTCACTCTCCCACCA	
SMAD1_R	GCACCAGTGTTTTGGTTCCT	
IL32_F1	CTGGGGAGCTTTTGTGAC	
IL32_R	TTGAGGATTGGGGTTCAGAG	
HSPA8_F1	CGTGCTAAGCGTACCCTCTC	
HSPA8R	GTGACATCCAAGAGCAGCAA	
FHOD3_F	AAACCGCAATGAAACCATT	
FHOD3_R	TTGACCCCTCTTTTCGTGTC	
DUSP10_F1	TGACAGCAACAAGCAGAACC	
DUSP10_R	ATTGGTCGTTTGCCCTTGAC	
APOBEC3B_F1	TTGAAAACGAACCCATCCTC	
APOBEC3B_R	AGGGGGTCCAGGATACAAAC	
XBP1_F	CCTTGATGTTGAGAACCAGG	
XBP1_R	GGGGCTTGGTATATATGTGG	
IRE_F	CGGCCTTTGCAGATAGTCTC	
IRE_R	ACGTCCCCAGATTCACTGTC	
PHGDH-F	CTGCGGAAAGTGCTCATCAGT	
PHGDH-R	TGGCAGAGCGAACAATAAGGC	

PSAT1-F	CGGTCCTGGAATACAAGGTG
PSAT1-R	AACCAAGCCCATGACGTAGA
PSPH-F	GCATAAGGGAGCTGGTAAGTCG
PSPH-R	ACCTGCATATTCACCGTTAAAGT
SHMT1-F	CTGGCACAACCCCTCAAAGA
SHMT1-R	AGGCAATCAGCTCCAATCCAA
SHMT2-F	TGATTCCCTCGCCTTTCAAGC
SHMT2-R	TTTCCGGTAGAAGATGAGCCC
NFE2L2_F	GCGACGGAAGAGTATGAGC
NFE2L2_R	GTTGGCAGATCCACTGGTTT
ATF3_F	ATGATGCTTCAACACCCAGG
ATF3_R	GCTCTGCAATGTTCTTCTTTT
ATF4_F	TCAAACCTCATGGGTCTCC
ATF4_R	GTGTCATCCAACGTGGTCAG

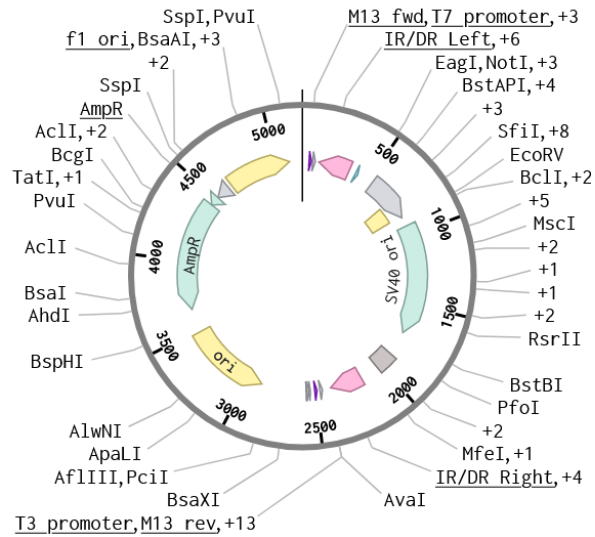
Oligonukleotydy zakupiono w firmie Synthego (sgRNA) oraz Sigma-Aldrich.

9. Wektory

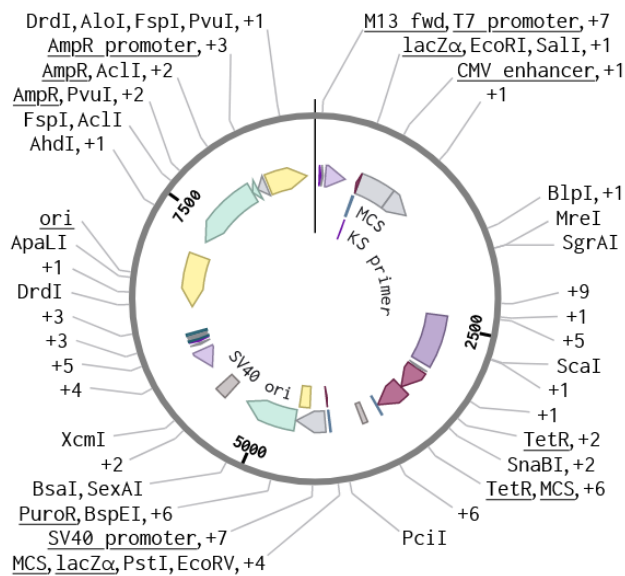
- TST30 plazmid służący do I etapu konstrukcji linii komórkowych z obniżonym poziomem gankyriny w systemie sleeping beauty



- TST201 plazmid służący do II etapu konstrukcji linii komórkowych z obniżonym poziomem gankyriny w systemie sleeping beauty



- TST209- plazmid służący do konstrukcji linii komórkowych o obniżonym poziomie gankyriny



10. Szczepy bakteryjne

Escherichia coli DH5α o genotypie:

[F⁻ ϕ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rK⁻, mK⁺) phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1]¹⁹⁹

11. Podłoża do hodowli bakteryjnych

Tabela 9 . Skład pożywek mikrobiologicznych.

Nazwa	Skład	Stężenie
Pożywka SOC (ang. <i>superoptimal</i> <i>catabolite repression</i>)	Trypton	2%
	ekstrakt drożdżowy	0,5%
	NaCl	8,5mM
	KCl	2,5mM
	D-glukoza	20mM
	MgCl ₂ · 6H ₂ O	10mM
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	10mM
Pożywka LB (Luria-Bertani)	Bakto-trypan	1%
	NaCl pH 7	1%
	ekstrakt drożdżowy	0,5%
Pożywka zestalona LB-agar	Bakto-trypan	1%
	NaCl pH 7	1%
	ekstrakt drożdżowy	0,5%
	agar	1,5%

Pożywki przed użyciem sterylizowano w autoklawie przez 30min., przy 120°C i ciśnieniu 1,2 Ba. Po schłodzeniu do 50°C dodawano ampicylinę w stężeniu 100 µg/ml.

12. Pożywki hodowlane i roztwory stosowane w pracy z komórkami eukariotycznymi

Pożywka RPMI-1640 (Sigma-Aldrich nr katalogowy:R8758) z dodatkiem:

Tabela 10. Składniki dodatkowe pożywki RPMI-1640.

Nazwa	Stężenie końcowe	Producent/nr katalogowy
Płodowa surowica bydlęca	10%	Sigma-Aldrich/ F9665
Penicylina/ Streptomycyna	100ug/ml	Sigma/ P4333

Pożywka RPMI1640 bez metioniny wykorzystywana w teście syntezy białek *de novo* Gibco A1451701

13. Linie komórkowe

Tabela 11. Charakterystyka linii komórkowych szpiczaka plazmocytozowego, wykorzystanych w niniejszej pracy.

Linia komórkowa	JJN3	L363	RPMI8226	U266	H929
Płeć	kobieta	kobieta	mężczyzna	mężczyzna	kobieta
IGH Tx	t(14;16)	HRD	t(14;16)	t(11;14)	t(4;14)
Status p53	-	t(4;14)	t(4;14)	t(4;14)	t(11;14)
NRAS	Q61K	Q61H	WT	WT	G13D
KRAS	WT	WT	G12D	WT	WT
Immunoglobuliny	Igκ	-	Igλ	-	-

Tożsamość linii komórkowych potwierdzano poprzez analizę genotypu metodą STR-PCR i porównaniem genotypów do ujętych w bazach danych DMSZ i Cellosaurus. Badanie wykonywano w firmie Eurofins Genomics.

IV Metody

1. Metody biologii molekularnej

1.1. Przygotowanie chemikompetentnych bakterii *E. coli* DH5 α metodą chlorku rubidu

Do przygotowania chemikompetentnych bakterii wykorzystano szczep *E. coli* DH5 α . Bakterie wysiano na płytkę Petriego pokrytą pożywką LB zestaloną 1,5% agarem i inkubowano w temperaturze 37°C przez noc w celu uzyskania pojedynczych kolonii. Następnie kolonią bakteryjną szczepiono 10ml pożywki LB i ponownie pozostawiono na noc w temperaturze 37°C. Z otrzymanej w ten sposób zawiesiny bakterii pobierano 4ml i przenoszono do 300ml świeżej pożywki LB. Hodowlę bakterii prowadzono do osiągnięcia przez nią gęstości optycznej $OD_{600} = 0,5$. Uzyskaną zawiesinę bakterii wirowano przy 2500xg przez 10min w temperaturze 4°C. Osad zawieszono w 32ml buforu transformującego I. Bakterie ponownie wirowano przy niezmienionych warunkach po czym osad zawieszono w 9ml schłodzonego buforu transformującego II. Po tym etapie zawiesinę bakterii rozdzielono, w porcjach po 100 μ l, do probówek eppendorfa i mrożono w ciekłym azocie. Tak przygotowane bakterie chemikompetentne przechowywano w temperaturze -80°C.

1.2. Transformacja bakterii chemikompetentnych metodą szoku cieplnego

Zawiesinę chemikompetentnych bakterii *E. coli* DH5 α (100 μ l) rozmrażano na lodzie i dodano 10 μ l (10-100 ng) plazmidowego DNA lub mieszaniny reakcyjnej po ligacji. Próbkę inkubowano na lodzie przez 20 min. Kolejną próbkę przełożono do termobloku ustawionego na 42°C na 2 min a następnie na 5 min na lód. Po tym czasie dodano 1 ml pożywki SOC i pozostawiono, przy lekkim wytrząsaniu, na 1 godzinę w temperaturze 37°C. Następnie odpowiednią ilość zawiesiny bakteryjnej wysiewano metodą powierzchniową na płytki Petriego z pożywką LB zestaloną agarem, zawierającą ampicylinę w stężeniu (80-100 μ g/ml) i hodowano przez noc w temperaturze 37°C.

1.3. Izolacja plazmidowego DNA na „małą skalę” za pomocą zestawu „Plasmid Miniprep”

Pożywkę LB (4 ml) z dodatkiem ampicyliny (100 µg/ml) inokulowano pojedynczą kolonią bakteryjną, pobraną sterylną końcówką z szalki Petri’ego po transformacji bakterii chemikompetentnych odpowiednim plazmidowym DNA. Hodowlę bakterii prowadzono w temperaturze 37°C przy ciągłym wytrząsaniu. Po 14 godzinach hodowle wirowano przy 12 000xg przez 2 minuty a osad bakteryjny zawieszono w 250 µl buforu „Cell R” i 250 µl buforu lizującego „Lysis Blue”. Następnie do uzyskanej zawiesiny dodano 350 µl buforu „Neutral B” i dokładnie mieszano przez kilkukrotne odwracanie. Całość wirowano przez 7 minut przy 12 000xg. 700 µl klarownego supernatantu, przenoszono do kolumnienki wiążącej i wirowano przez 1 min z prędkością 11 000xg. Do kolumnienki dodano kolejno 500 µl buforu płuczającego „Wash PLX1” i 650 µl „Wash PLX2” za każdym razem wirując 1 min z prędkością 11 000xg. W celu elucji DNA minikolumnę umieszczono w nowej probówce typu Eppendorf, dodano 100 µl buforu „Elution” i wirowano jak poprzednio. Tak przygotowane DNA przechowywano w -20°C.

1.4. Rozdział elektroforetyczny DNA w żelu agarozowym

DNA poddawano rozdziałowi w celach analitycznych stosując elektroforezę w żelu agarozowym, w stężeniu od 1 do 2% z dodatkiem „GreenSafePremium” w buforze TAE, przy napięciu 90V. Fragmenty DNA wykrywano w świetle UV, z wykorzystaniem aparatury do dokumentacji żeli agarozowych firmy Syngene, a uzyskane obrazy zapisywano w postaci cyfrowych plików graficznych, tworzonych w programie G:Box Chemi-XT4 GENESys.

1.5. Oznaczanie ilości i czystości DNA

W celu oznaczenia ilości plazmidowego DNA i stopnia jego zanieczyszczenia, absorbancję mierzono przy długości fali 260 nm i 280 nm. Ilość DNA wyznaczano korzystając z następującego równania: $Abs_{260} \cdot 50 \cdot (10/0,5)$

Stosunek wartości absorbancji mierzonej przy fali długości 260 nm do jej wartości mierzonej przy długości fali 280 nm, jest wskaźnikiem stopnia zanieczyszczenia DNA białkami i powinien się mieścić w przedziale 1,7– 2,0.

1.6. Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi

Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi prowadzono w buforach, zalecanych przez producenta przez okres 30 min, w temperaturze 37°C lub 50°C. Stosowano 10 U restryktazy na 1 µg DNA. Końcowa objętość prób wynosiła od 10 µl do 50 µl.

1.7. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)

Reakcje PCR prowadzono w termocyklerze firmy BIO-RAD. Próbkki o końcowej objętości 10 µl zawierały:

Tabela 12. Składniki reakcji PCR.

Nazwa	Stężenie	Ilość [µl]
Matryca DNA	2,5ng	0,1
dNTPmix	10mM	0,25
starter 5'-3'	10 µM	0,5
starter 3'-5'	10 µM	0,5
stężony (10x) bufor Pfu		1
Polimeraza ColorPfuPlus!		0,5
ddH ₂ O		7,15

Kolejne etapy reakcji PCR prowadzono w następujących warunkach:

Tabela 13. Warunki reakcji PCR.

Etap	Temperatura [°C]	Czas	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	95	5 minut	1
Denaturacja	95	30 sekund	
Hybrydyzacja	70	30 sekund	35
Elongacja	72	1 minuta	
Końcowa elongacja	72	7 minut	1

1.8. Oczyszczanie DNA po reakcji PCR

Do uzyskanej po reakcji PCR mieszaniny, dodawano 5 objętości buforu wiążącego, wchodzącego w skład zestawu „DNA & RNA Cleaner”, a następnie przenoszono na kolumnę i wirowano 1 minutę, z prędkością powyżej 12000xg. Na kolumnę наносono 600 µl buforu płuczającego i wirowano jak poprzednio. W celu uzyskania DNA, po dodaniu buforu do elucji, kolumnę wirowano ponownie przez 1 minutę. Tak uzyskane DNA przechowywano w temperaturze -20°C.

1.9. Reakcja ligacji

Reakcję ligacji prowadzono z plazmidowymi wektorami i insertami docelowego DNA, poddany wcześniej trawieniu enzymami restrykcyjnymi (rozdz. IV 1.6). Mieszaniny reakcyjne o końcowej objętości 10 µl zawierały wstawkę i wektor w przybliżonych stosunkach molowych 3:1, 2:1, 1:1. Mieszanina reakcyjna oprócz DNA, zawierała również 1 U ligazy T4 i stężony (10x) bufor. Reakcje prowadzono przez 16 godzin w temperaturze 16°C. Po zakończonej reakcji całość mieszaniny używano do transformacji bakterii chemikompetentnych (rozdz. IV 1.2).

1.10. Sekwencjonowanie DNA

Oczyszczone DNA uzyskane na drodze reakcji PCR (rozdz. IV 1.7 i 1.8) poddano kolejnej reakcji amplifikacji prowadzonej w następujących warunkach:

Tabela 14. Warunki reakcji PCR do sekwencjonowania.

Etap	Temperatura [°C]	Czas	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	96	1 minuta	1
Denaturacja	96	10 sekund	
Hybrydyzacja	50	5 sekund	25
Elongacja	60	4 minuty	
Chłodzenie	4	∞	

Mieszanina reakcyjna o końcowej objętości 10 μ l zawierała:

BigDye 4 μ l

Primer SeqR2 (3,2 μ M) 1 μ l

ddH₂O 4 μ l

Produkty reakcji oczyszczano przy użyciu zestawu ExTerminator, a następnie tak przygotowane próbki wysyłano do Pracowni Biologii Molekularnej Instytutu Hematologii i Transfuzjologii i sekwencjonowano przy użyciu aparatu 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems/Hitachi). Otrzymane wyniki sekwencjonowania, analizowano przy użyciu programu FinchTV.

1.11. Izolacja całkowitego RNA

W celu izolacji całkowitego RNA, za pomocą zestawu „Universal DNA/RNA/Protein Purification Kit”, hodowlę komórek wirowano przy 300xg przez 5min. Do osadu dodano 400 μ l buforu „DRP” i 100 μ l buforu „Lyse All” z dodatkiem β -ME (10 μ l/ml) i wirowano przez 2 min z maksymalną prędkością. Supernatant przeniesiono do minikolumny wiążącej DNA i ponownie zwirowano z maksymalną prędkością przez 1 min. Do przesączu dodano 0,7 objętości alkoholu etylowego (96-100%), przeniesiono na kolumnę wiążącą RNA i wirowano przy 11 000xg przez 1min. Do minikolumny dodano kolejno: 400 μ l buforu płuczącego „Wash DN1”, 600 i 300 μ l buforu „Wash RBW”, każdorazowo wirując 1 min przy 11 000xg. Następnie Minikolumnę umieszczono w nowej probówce typu Eppendorf i celem elucji RNA dodano 50 μ l wody RNase-free. Ponownie poddano wirowaniu. Uzyskane w ten sposób RNA przechowywano w -80°C.

1.12. Synteza cDNA

Syntezę cDNA prowadzono z wykorzystaniem odczynników wchodzących w skład gotowego zestawu „Transcriptor Universal cDNA Master” zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. W tym celu, do roztworu oczyszczonego RNA o stężeniu 10 ng/ml, dodano 1 μ l Transcriptor Universal Reaction Buffer oraz 0,5 μ l Transcriptor Universal Reverse Transcriptase. Tak przygotowaną mieszaninę poddano reakcji PCR, prowadzonej w następujących warunkach:

Tabela 15. Warunki reakcji syntezy cDNA.

Etap	Temperatura[°C]	Czas[min]
Przyłączanie starterów	25	5
Odwrotna transkrypcja	55	10
Denaturacja	85	5

1.13. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym

Reakcję PCR w czasie rzeczywistym prowadzono w aparacie BIO-RAD.

W przypadku sond Taqman pojedyncza mieszanina reakcyjna zawierała: 20µl MasterMix-u, 8 µl cDNA, 2 µl TaqMan'a i 10 µl wody ddH₂O. Poziom ekspresji badanych genów wyznaczano wobec genu referencyjnego *PGK1*. Reakcje PCR w czasie rzeczywistym prowadzono w następujących warunkach: 95°C 15sec- 50x(95°C 1sec-60°C 20sec).

W przypadku pracy ze starterami reakcje prowadzone były w warunkach: 95°C 2min-40x(95°C 15sec-60°C 1min)-95°C 20min, a mieszanina reakcyjna zawierała: 5 µl GoTag pochodzącego z zestawu GoTag qPCR Master Mix, 0,5 µl startera F (2 µM), 0,5 µl startera R (2 µM), 0,5 µl cDNA oraz 3,5 µl H₂O. Poziom ekspresji badanych genów wyznaczano wobec genu referencyjnego *GAPDH*.

Wyniki analizowano przy użyciu programu BioRadCFXManager.

1.14. Transfekcja komórek eukariotycznych wektorami plazmidowymi (edycja genetyczna obejmująca nadekspresję i obniżanie poziomu ekspresji gankyriny)

Komórki w ilości 5x10⁶/ml wirowano 5 min z prędkością 300xg i zawieszano w medium RPMI-1640 w objętości 500 µl. Następnie dodawano 5 µg wektora plazmidowego, przenoszono do kuwet i transfekowano z wykorzystaniem aparatu BIO-RAD GenePulserXcell w warunkach 280-300V, 950 µF. Tak przygotowane komórki przenoszono na płytkę 6-dołkową zawierającą 3 ml medium RPMI-1640, z dodatkiem 10% FBS-u. Hodowle kontynuowano w pożywce RPMI-1640 z dodatkiem 10% FBS-u, penicyliny, streptomycyny i dodatkiem genetycyny w stężeniu 2mg/ml.

1.15. Transfekcja komórek eukariotycznych (edycja genetyczna obejmująca wyłączenie ekspresji gankyriny)

Komórki w ilości 4×10^5 wirowano 5 min z prędkością 300xg i zawieszano w 200 μ l SE-nucleofection solution. Następnie mieszaninę 18 μ l SE-nucleofection solution, 6 μ l sgRNA (30pmol/ μ l) i 1 μ l Cas9 (20pmol/ μ l) inkubowano w temperaturze pokojowej. Po upływie 20min dodawano 75 μ l komórek, przenoszono do kuwet i transfekowano z wykorzystaniem aparatu Lonza™ Cell Line Optimization 4D-Nucleofector™X, korzystając z programu CM138. Tak przygotowane komórki przenoszono na płytkę 24-dółkową zawierającą 500 μ l 10% FBS-u.

2. Metody stosowane w analizie białek

2.1. Przygotowywanie lizatów komórkowych

Komórki płukano przez trzykrotne zawieszenie w buforze PBS i wirowanie przy 300xg przez 5 min w temperaturze 4°C. Uzyskany w ten sposób osad komórkowy zawieszano w buforze do lizy (rozdz. III 3) i pozostawiano na lodzie na 15 minut. Po tym czasie lizat komórkowy wirowano przy 10 000xg przez 10 min w temperaturze 4°C. Supernatant przenoszono do czystych probówek eppendorf, pobierano odpowiednią ilość do oznaczenia stężenia białka, a pozostałość przechowywano w temperaturze -20°C.

2.2. Oznaczanie ilościowe białka

Do oznaczeń ilościowych białka próbki lizatów komórkowych o objętości 5 μ l uzupełniano wodą MiliQ do objętości 50 μ l. Do 10 μ l rozcieńczonych próbek dodano po 200 μ l mieszaniny reagentów A i B wchodzących w skład zestawu „Pierce™ BCA™” w stosunku 1:50 (v/v), po czym inkubowano w temperaturze 37°C przez 30 min. Absorbancję mierzono przy 562 nm wobec ślepej próby odczynnikowej w spektrofotometrze Multiskan Go firmy Thermo Scientific. Do sporządzenia krzywej standardowej wykorzystywano kolejne rozcieńczenia standardu BSA, o stężeniu wyjściowym 2mg/ml, których absorbancję mierzono w analogiczny sposób.

2.3. Wykrywanie białek metodą nanoimmunoelektroforezy kapilarniej

3 μ l lizatu białkowego o stężeniu 0,25mg/ml mieszało z 1 μ l „Master Mix” zawierającym 1x bufor do próbek, 1x fluorescencyjny marker masy cząsteczkowej i 40mM ditiotritolu (DTT), a następnie podgrzewano 5 min w temperaturze 95°C. Na mikropłytkę dostarczoną przez producenta, rozpipetowano próbki, odczynnik blokujący, bufor płuczający, przeciwciała pierwszo i drugo-rzędowe oraz substrat chemiluminescencyjny. Po załadowaniu płytki, elektroforeza separacyjna i immunodetekcja, zostały przeprowadzone w systemie kapilarnym w sposób zautomatyzowany. Ekspresja białek została zanalizowana przy użyciu wbudowanego oprogramowania CommpasTM. Każdy pik sygnału pochodzącego od badanego białka został automatycznie zmierzony i znormalizowany, w odniesieniu do mediany pola powierzchni białka kontrolnego GAPDH oraz do białka całkowitego

3. Hodowle komórkowe i testy in vitro

3.1. Hodowle komórkowe

Komórki hodowano w pożywce RPMI-1640 suplementowanej 10% płodową surowicą bydlęcą (ang. *fetal bovine serum*, FBS), penicyliną ze streptomycyną (100ug/ml). Komórki pasażowano po osiągnięciu gęstości 1×10^6 /ml. W tym celu komórki wirowano przy 300xg przez 5 min w temperaturze pokojowej i zawieszano w świeżym medium.

Komórki hodowano w inkubatorze o składzie atmosfery 5%/CO₂/95% w temperaturze 37 °C.

3.2. Test proliferacyjny z użyciem MTS

50 μ l komórek o gęstości 3×10^5 /ml wysiewano do płaskodennych 96-dółkowych płytek hodowlanych i dodawano 50 μ l wcześniej przygotowanych stężeń leków bądź inhibitorów. Tak przygotowaną płytkę pozostawiano na 48 lub 72h w zależności od leku. Po zakończonej inkubacji dodawano 20 μ l odczynnika MTS i inkubowano przez 1,5 godziny. Wyniki odczytywano przy 490 nm. Od zmierzonej absorbancji odejmowano absorbancję samego medium, a absorbancję przy komórkach kontrolnych przyjmowano za 100% proliferacji. Wartości określające stężenie hamujące żywotność komórek o 50% (ang. *half maximal*

inhibitory concentration, IC₅₀) wyznaczono za pomocą regresji nieliniowej przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism v6.0

3.3. Test proliferacyjny z wykorzystaniem przeciwciała Ki-67

Komórki o gęstości 1×10^6 /ml dwukrotnie przemywano buforem PBS i wirowano przy 350xg przez 5 min. Do uzyskanego osadu wkraplano 3 ml schłodzonego, 70% etanolu i inkubowano przez godzinę w -20°C. Kolejno trzykrotnie przepłukano „BioLegends staining buffer”, a uzyskany osad, zawieszono w 100 µl buforu z dodatkiem 2 µl przeciwciała Ki-67. Inkubowano w ciemności przez 30 min. Na koniec komórki dwukrotnie przepłukano wykorzystanym wcześniej buforem i zawieszano w objętości 500 µl. Tak przygotowane komórki, analizowano z wykorzystaniem cytometru przepływowego, porównując parametr FITC, przy widmie 488nm. Mierzono średnie natężenie fluorescencji, przy którym osiągany jest pik, czyli najczęściej występująca wartość.

3.4. Test na aktywność podjednostek proteasomu

Do przeprowadzenia testu wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw „Cell-Based Proteasome-Glo™ Assays”. Komórki o gęstości 6×10^5 /ml wysiano na białą płytkę 96-dołkową w objętości 25 µl/dołek. Następnie poprzez zmieszanie buforu, substratu, inhibitorów oraz odczynnika wykrywającego lucyferynę, przygotowano odczynniki odpowiednie, do określania każdej z trzech aktywności proteasomu. 25 µl przygotowanej mieszaniny dodawano do wcześniej wysianych komórek i inkubowano 10 min. Pomiaru dokonano z wykorzystaniem luminometru Victor X3 firmy PerkinElmer i programu PerkinElmer 2030 Workstation.

3.5. Test na syntezę białek *de novo*

Komórki o gęstości 5×10^5 /ml wirowano 300xg przez 5minut, a następnie osad zawieszono w 250 µl medium RPMI1640, bez metioniny, z dodatkiem HPG (1:1000) pochodzącym z zestawu The Click-iT™ HPG Alexa Fluor™ 488 Protein Synthesis Assay Kit i inkubowano 30 minut. Po tym czasie, celem utrwalenia komórki, dwukrotnie wirowano w niezmiennych warunkach, dodano 1ml 3,7% formaldehydu i inkubowano 15 min w temperaturze pokojowej. Kolejno komórki dwukrotnie płukano 3% BSA. W celu

permabilizacji błony, do komórek dodano 1ml 0,1% Triton-u X-100. Próbki inkubowano 20 minut w temperaturze pokojowej, po czym ponownie dwukrotnie przepłukano 3% BSA. Następnie dodano 100 μ l „Reaction cocktail” i inkubowano 30 minut w ciemności. Po zakończonym barwieniu próbki, wirowano przy 300xg przez 5 minut i zawieszono w 200 μ l PBS-u. Tak przygotowane komórki, analizowano z wykorzystaniem cytometru przepływowego, porównując parametr FITC, przy widmie 488nm

4. Analiza statystyczna

Analiza danych pacjentów: PFS oceniono przy użyciu modeli hazardu przyczynowego typu Coxa (ang. *Cause-specific hazard*, CSH). Za zdarzenia będące przedmiotem zainteresowania, uznano progresję/nawrót MM oraz zgon z powodu progresji choroby. Oprogramowanie Cutoff Finder (<http://molpath.charite.de/cutoff>) zostało użyte, do określenia optymalnego punktu odcięcia ekspresji białka. Został on zdefiniowany jako punkt zapewniający największe zróżnicowanie na długość przeżycia podczas testowania wszystkich możliwych punktów odcięcia za pomocą testu log-rank. Wpływ zdarzenia konkurencyjnego, zgonu niezwiązanego z MM, PFS nie był istotny statystycznie ($P > .05$)

Wstępne przetwarzanie danych RNA-seq: Znormalizowane zliczenia RNA-seq dla próbek KO i WT zostały zaimportowane przy użyciu funkcji `read.csv` w R. Dane zawierały identyfikatory genów Ensembl, które następnie zostały zmapowane do symboli genów przy użyciu funkcji `mapIds` z pakietu `org.Hs.eg.db`. Wiersze zawierające brakujące lub zduplikowane symbole genów zostały usunięte, aby zapewnić czyste i spójne dane. Wszelkie geny z zerową liczbą we wszystkich próbkach, zostały wykluczone.

Analiza głównych składowych (PCA): Aby zbadać globalną zmienność transkryptomiczną między próbkami KO i WT, przeprowadzono PCA przy użyciu funkcji `PCA` z pakietu `FactoMineR`.

Analiza DESeq2 dla ekspresji różnicowej: Analizę ekspresji różnicowej przeprowadzono przy użyciu pakietu `DESeq2`. Liczby ekspresji genów, zostały znormalizowane, a zmiana $\log_2$ oraz i skorygowane wartości p , zostały obliczone między próbkami KO i WT. Geny ze skorygowaną wartością p (padj) $< 0,05$ i bezwzględną krotną zmianą $\log_2 \geq 1$, uznano za istotnie różniące się ekspresją.

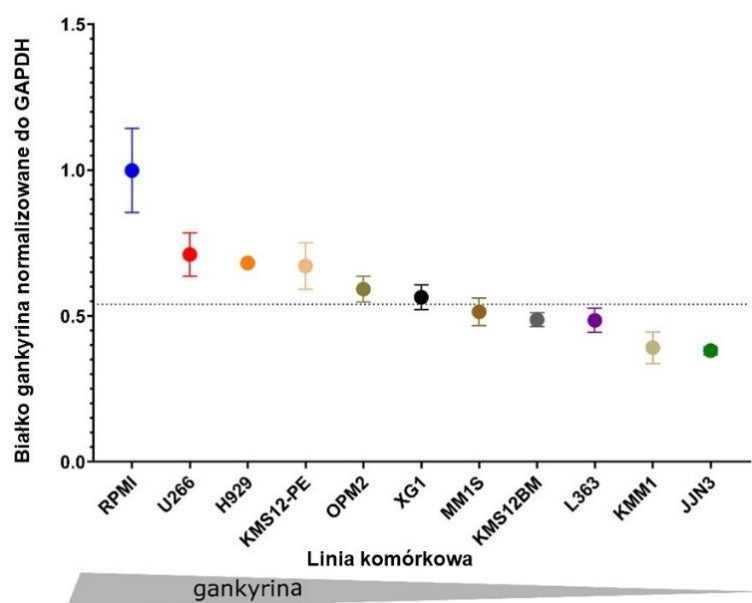
Analiza wzbogacenia zestawu genów (GSEA): W celu dalszego zbadania szlaków biologicznych, na które wpływ ma PSMD10 KO, przeprowadzono GSEA przy użyciu pakietu `clusterProfiler`. Uszeregowane listy genów, zostały wygenerowane na podstawie wyników `DESeq2` i wprowadzone do GSEA, względem zestawów uzyskanych z bazy danych MSigDB.

V Wyniki

1. Ocena wpływu gankyriny na wybrane parametry komórek szpiczaka z wykorzystaniem modeli ludzkich linii komórkowych szpiczaka, poddawanych modyfikacjom poziomowi i obecności gankyriny.

1.1. Charakterystyka linii komórkowych szpiczaka plazmocytoowego pod kątem ekspresji gankyriny

Linie komórkowe szpiczaka plazmocytoowego charakteryzują się dużą różnorodnością cytogenetyczną i genetyczną (rozdz. III 13, tabela 11), podobnie jak pierwotne komórki szpiczaka u pacjentów. Wiedza na temat różnych aspektów komórek ma kluczowe znaczenie w doborze odpowiednich linii komórkowych, jako modeli do badania choroby. Celem poszerzenia wiedzy na temat linii komórkowych szpiczaka plazmocytoowego, w pierwszej kolejności zbadano poziom ekspresji gankyriny (wykres 1). Analizie poddano następujące linie komórkowe: JJN3, KMM1, L363, KMS12BM, MM1S, XG1, OPM2, KMS12-PE, H929, U266, RPMI.



Wykres 1. Poziom białka gankyrina w liniach komórkowych szpiczaka plazmocytoowego. Białko gankyrina normalizowane do GAPDH i białka całkowitego- nanoimmunoelktroforeza kapilarna JESS™ (ProteinSimple, USA). Linia przerywana wskazuje poziom gankyriny u pacjentów, który pozwala na zróżnicowane rokowanie, ustalona na podstawie danych pochodzących z (Misiewicz-Krzeminska et al., 2020a).

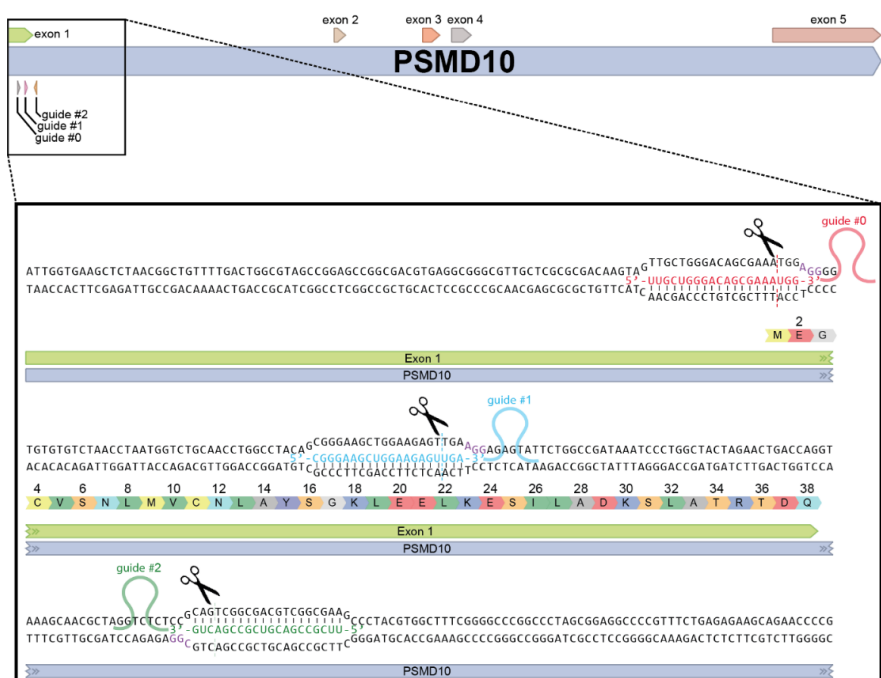
Przeprowadzona analiza wykazała duże zróżnicowanie w poziomie badanego białka w zależności od linii komórkowej. Linie komórkowe RPMI, U266 i H929 wykazywały najwyższy poziom gankyriny odpowiadający wcześniej opisanemu poziomowi związanemu ze złym rokowaniem podczas gdy linie komórkowe JJN3 i L363 charakteryzowały się najniższym poziomem gankyriny.

W celu sprawdzenia, jak wyjściowy poziom gankyriny oddziałuje na zachowanie komórek do dalszych badań, wybrano linie komórkowe, wykazujące skrajne poziomy ekspresji interesującego nas białka.

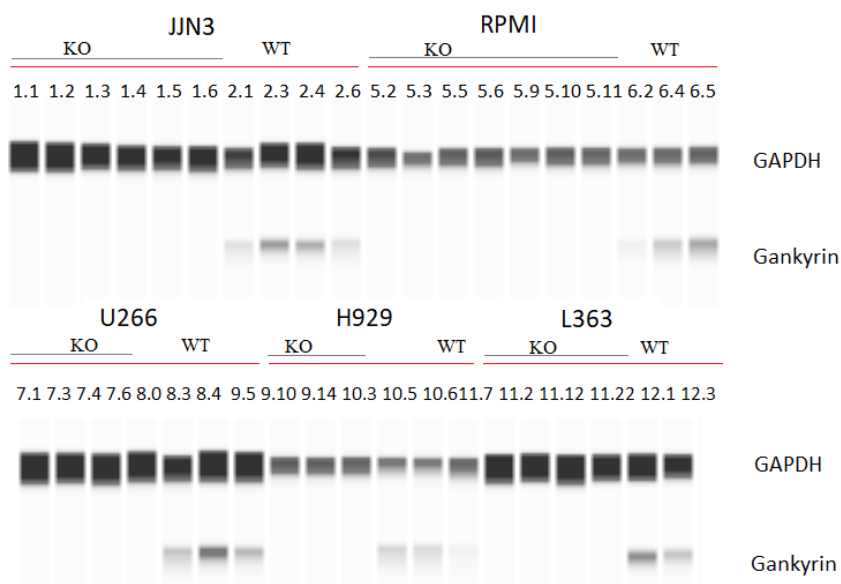
1.2. Wyprowadzenie modeli genetycznych

1.2.1 Otrzymanie linii komórkowych pozbawionych genu *PSMD10* metodą CRISPR-Cas9

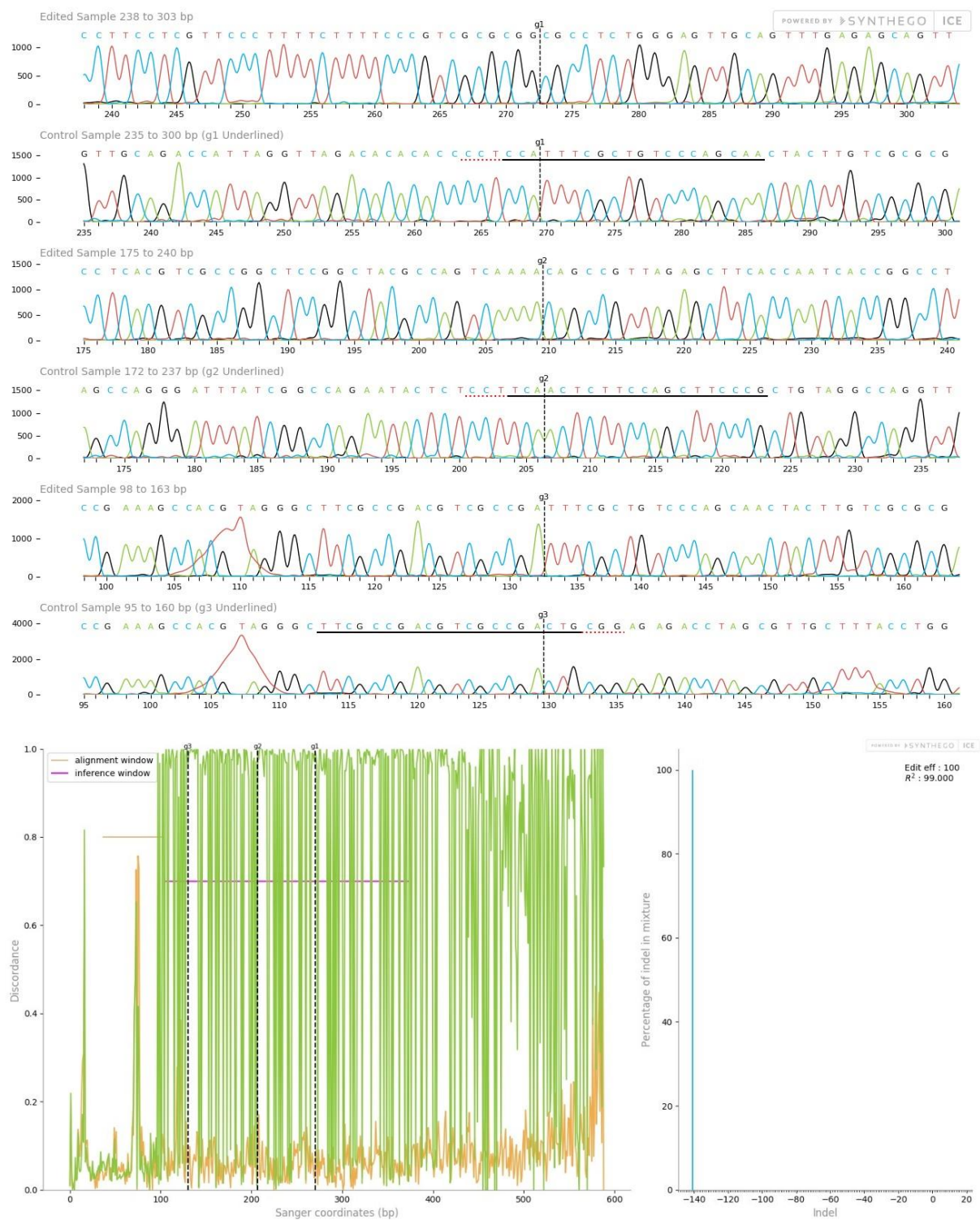
W celu ustalenia roli gankyriny w biologii komórek szpiczaka plazmocytoowego, wyprowadzono model komórkowy pozbawiony ekspresji genu *PSMD10*. Wybrane wcześniej linie komórkowe, nukleofekowano (rozdz. IV 1.14) zaprojektowanymi sekwencjami gRNA (rozdz. III 8 tabela 8). Zaprojektowana strategia miała na celu uzyskanie delecji w obrębie egzonu 1 (Rycina 3). Po 72h do komórek dodano 600μl pożywki RPMI z dodatkiem 20% FBS-u i pozostawiono w inkubatorze. Następnego dnia komórki o gęstości 1×10^4 /ml przeniesiono na płytki 96-dółkowe, celem uzyskania zawiesiny pojedynczych komórek w każdym dołku. Tak przygotowane komórki hodowano przez kilka tygodni. Po upływie tego czasu, za pomocą nanoimmunoelektroforezy kapilarnej, sprawdzono poziom białka gankyrina w każdej z powstałych kolonii komórkowych (Rycina 4) ostateczne potwierdzenie delecji w genie *PSMD10* uzyskano na drodze sekwencjonowania fragmentów tego genu (Rycina 5). Ocena efektywności edycji wykonana algorytmem Synthego ICE, wykazała w 92,3% klonów 100% edycję, a w 7,7% edycję częściową. Dalsze badania prowadzono na klonach wykazujących 100% edycję (Tabela 16).



Rycina 3. Schemat przedstawiający edycję genetyczną przy użyciu bezplazmidowego systemu Gene Knockout kit_V2 (Synthego) multi-gRNA przeciw PSMD10 + białko Cas9-2NLS



Rycina 4 . Poziom białka gankyrina w klonach wyprowadzonych metodą CRISPR-Cas9. Białko gankyrina normalizowane do GAPDH - capillary nanoimmunoassay JESS™ (ProteinSimple, USA).



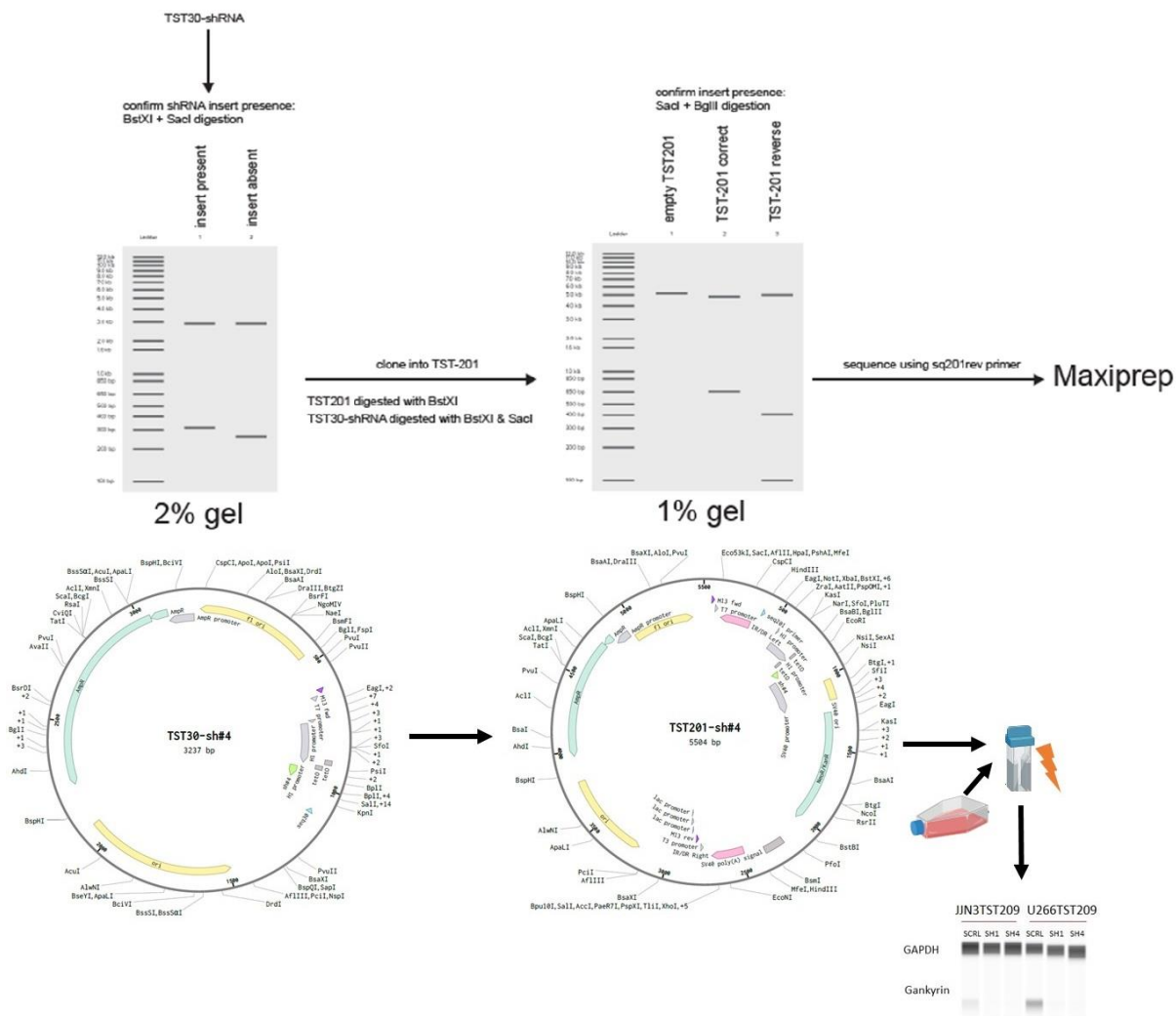
Rycina 5. Przykładowa analiza stopnia edycji ekspresji PSMD10 uzyskanych klonów. Analizę sekwencji wszystkich klonów przeprowadzono przy użyciu programu SYNTHEGO ICE

Tabela 16. Charakterystyka wyprowadzonych klonów pod względem stopnia edycji poziomu ekspresji *PSMD10* oceniana przy użyciu programu *SYNTHEGO ICE*. Klony kontrolne WT wykazały edycję 0%.

Linia komórkowa	Rodzaj	Numer klonu	% edycji
JJN3	<i>PSMD10_KO</i>	1.1	100
		1.3	100
		1.4	100
		1.5	77
		1.6	100
L363	<i>PSMD10_KO</i>	11.1	100
		11.2	100
		11.7	100
		11.10	100
		11.12	100
		11.22	100
RPMI	<i>PSMD10_KO</i>	5.1	100
		5.2	100
		5.3	100
		5.5	100
		5.6	100
		5.9	100
		5.10	95
		5.11	100
U266	<i>PSMD10_KO</i>	7.1	100
		7.2	100
		7.5	100
		7.7	100

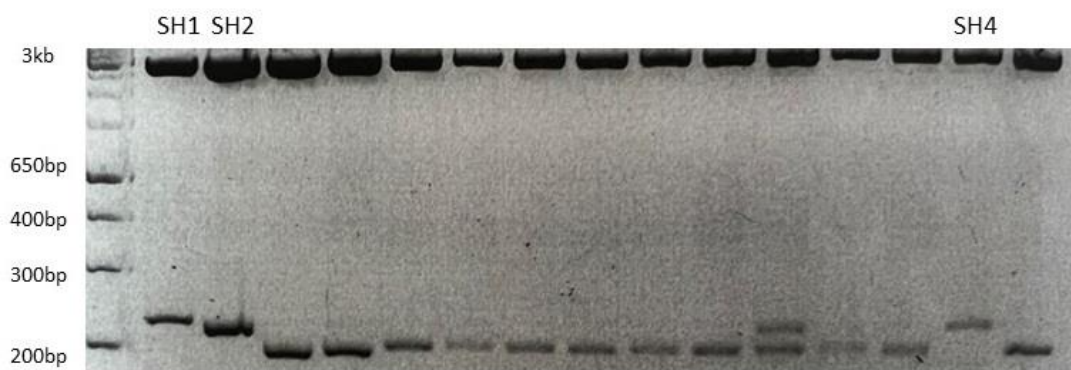
1.2.2. Otrzymanie linii komórkowych z obniżonym poziomem ekspresji *PSMD10*

W celu sprawdzenia, czy poziom białka gankyrina ma wpływ na biologię komórek szpiczaka plazmocytoowego, wyprowadzono indukowalny model komórkowy, pozwalający na obniżenie ekspresji genu *PSMD10*, przy pomocy *shRNA* po aktywacji doksocykliną. Z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych Dharmacon (<http://dharmacon.gelifesciences.com/design-center/>), Clontech (http://www.clontech.com/FR/Support/Online_Tools) i Genescript (<https://www.genscript.com/ssl-bin/app/rnai>) w pierwszej kolejności zaprojektowano sekwencje *shRNA* skierowane na gen *PSMD10* (rozd. III 8 tabela 8), których użyto do wyprowadzenia omawianego modelu (Rycina 6).



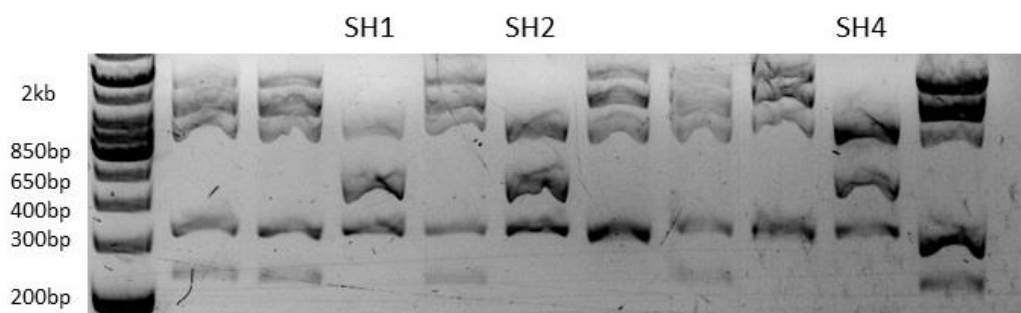
Rycina 6. Schemat przedstawiający wyprowadzenie modeli o obniżonej ekspresji gankyriny za pomocą systemu Sleeping beauty

Oligonukleotydy o stężeniu 10 μM poddano reakcji ligacji ze strawionym wcześniej przy pomocy enzymów SacI i BglII wektorem TST30 (procedury opisane odpowiednio w rozdz. IV 1.9 i 1.6). Uzyskany produkt ligacji wykorzystano następnie do transformacji bakterii. Po nocnej inkubacji, z komórek bakteryjnych wyizolowano DNA. W celu sprawdzenia powodzenia procedury DNA, poddano reakcji trawienia enzymami SacI i BSTXI, po czym wykonano rozdział elektroforetyczny (Rycina 7).



Rycina 7. Rozdział elektroforetyczny DNA przedstawiający strawiony plazmid TST30-sh. Próbkę oznaczoną jako SH1, SH2 i SH4 zawierają wstawkę.

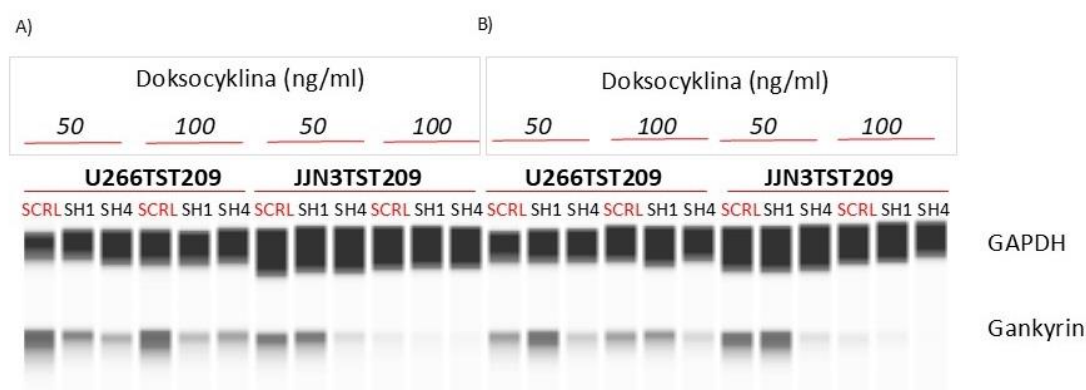
Próbek zawierających wstawkę użyto do ligacji z plazmidem TST201, strawionym BstXI i ponownie transformowano bakterie. Wyizolowane DNA plazmidowe, strawiono restryktazą BglI i ponownie rozdzielono elektroforetycznie (Rycina 8).



Rycina 8. Rozdział elektroforetyczny DNA przedstawiający strawiony plazmid TST201-sh. Próbkę oznaczoną jako SH1, SH2 i SH4 zawierają wstawkę.

Celem potwierdzenia obecności shRNA, uzyskane DNA poddano sekwencjonowaniu metodą Sanger (rozd. IV 1.10). Próbek zawierających docelowe sekwencje użyto do nukleofekcji (rozd. IV 1.14) linii komórkowych JJN3TST209 i U266TST209. Tak wyprowadzone linie komórkowe, poddano kolejno selekcji genetyczną i puromycyną. Zastosowano system, w którym ekspresja *PSMD10* jest indukowana doksocykliną, dlatego celem uzyskania jak najwyższego stopnia wyciszenia, przeprowadzono optymalizację dawek doksocykliny oraz czasu inkubacji. Komórki zawierające wstawki, celem indukcji wyciszeń hodowano przez 48 i 72h w obecności 50 i 100ng/ml doksocykliny. Poziom obniżenia poziomu gankyriny, sprawdzono następnie za pomocą nanoimmunoelktroforezy kapilarnej (Rycina 9).

Jako kontroli użyto komórek transfekowanych wektorem, zawierającym oligonukleotydy o sekwencji niespecyficznej do genomu ludzkiego (scrambled, scr).



Rycina 9. Poziom białka gankyrina w liniach komórkowych wyprowadzonych przy użyciu metody *Sleeping Beauty*. A) 48h aktywacja dokso-cykliną B) 72h aktywacja dokso-cykliną. Białko gankyrina normalizowane do GAPDH - capillary nanoimmunoassay JESSTM (ProteinSimple, USA).

Najwyższy poziom wyciszeń uzyskano po 72h aktywacji dokso-cykliną, w dawce 100ng/ml. Powyższe warunki stosowano w kolejnych eksperymentach prowadzonych z wykorzystaniem modeli wyprowadzonych przy użyciu systemu *Sleeping Beauty*.

W przypadku wyciszeń długotrwałych, ze względu na toksyczne działanie dokso-cykliny, dawkę obniżono do 50ng/ml (Rycina 10).

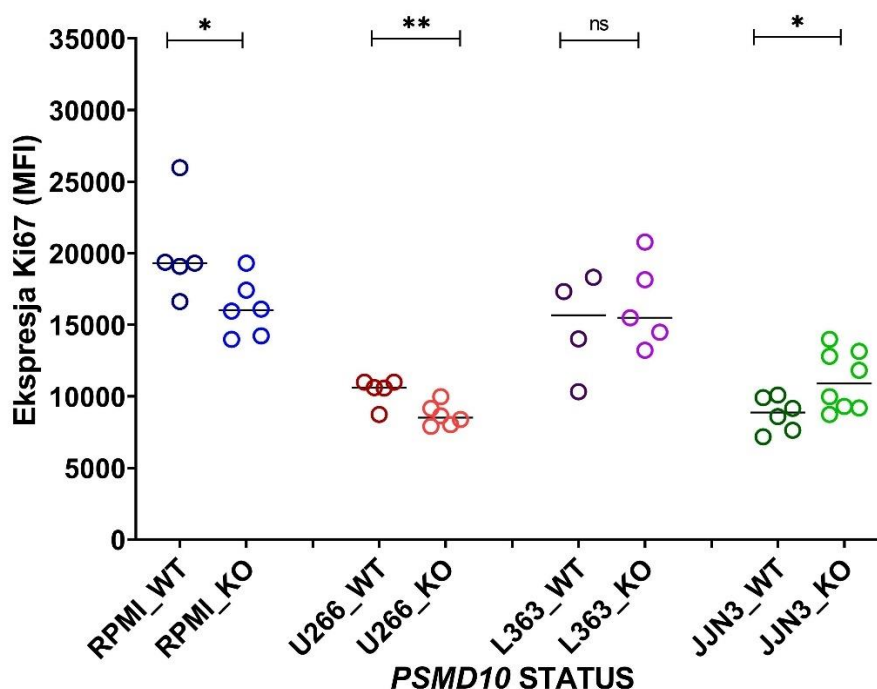


Rycina 10. Poziom białka gankyrina w liniach komórkowych wyprowadzonych przy użyciu metody *Sleeping Beauty*. Wyciszenia dwutygodniowe, dwutygodniowa aktywacja dokso-cykliną 50ng/ml. Białko gankyrina normalizowane do GAPDH - capillary nanoimmunoassay JESSTM (ProteinSimple, USA).

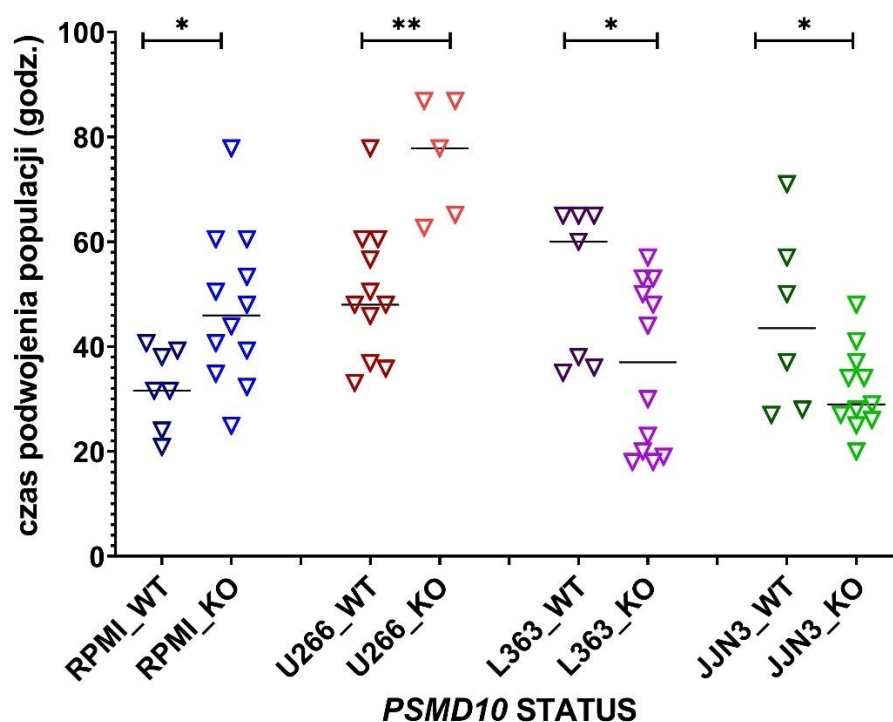
1.3. Ocena tempa proliferacji i czasu podwojenia populacji

Proliferacja i czas podwojenia populacji to kluczowe pojęcia w biologii komórki, które odgrywają istotną rolę w wielu aspektach biologicznych, w tym w rozwoju organizmów czy procesach chorobowych takich jak nowotworzenie. Pojęcie proliferacji odnosi się do procesu wzrostu liczby komórek, następującego poprzez podziały komórkowe, w których jedna komórka dzieli się na dwie komórki potomne. Czas podwojenia populacji (ang. *Population doubling time*), będący wskaźnikiem szybkości wzrostu to z kolei okres, w którym liczba komórek w populacji ulega podwojeniu.

Biorąc pod uwagę znaczenie wyżej wymienionych procesów, sprawdzono jaki wpływ na kluczowe parametry ma pozbawienie komórek gankyriny (*Rycina 11 i 12*). Skupiono się na dwóch liniach o wysokim poziomie gankyriny (RPMI8226 i U266) i dwóch o niższym poziomie (JJN3 i L363).



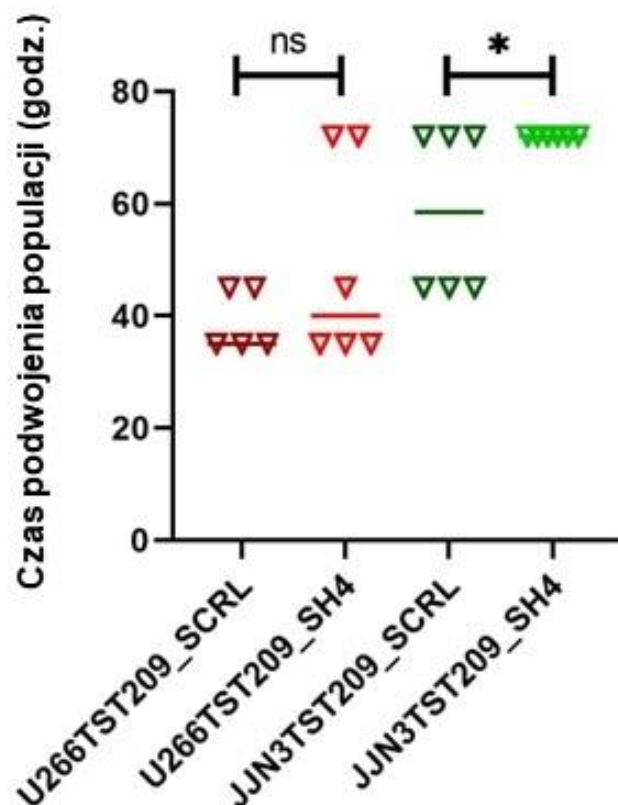
*Rycina 11. Wpływ wyłączenia ekspresji gankyriny na proliferację komórek szpiczaka. Proliferacja mierzona przy pomocy oceny ekspresji białka Ki-67. Test t-Studenta do oceny istotności statystycznej (GraphPad 9.3) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (każdy klon w trzech powtórzeniach biologicznych, uśredniona ilość klonów RPMI_WT $n=3$, RPMI_KO $n=3$, U266_WT $n=3$, U266_KO $n=2$, L363_WT $n=2$, L363_KO $n=3$, JJN3_WT $n=2$, JJN3_KO $n=3$)*



Rycina 12. Wpływ wyłączenia ekspresji gankyriny na czas podwojenia populacji mierzony przy pomocy liczenia żywych komórek z wykorzystaniem barwienia błękitem trypanu. Test t-Studenta do oceny istotności statystycznej (GraphPad 9.3) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (każdy klon w trzech powtórzeniach biologicznych, uśredniona ilość klonów RPMI_WT $n=3$, RPMI_KO $n=3$, U266_WT $n=3$, U266_KO $n=2$, L363_WT $n=2$, L363_KO $n=3$, JJN3_WT $n=2$, JJN3_KO $n=3$)

Przedstawione wyniki ukazują zależność między tempem proliferacji a czasem podwojenia populacji. We wszystkich badanych liniach komórkowych zaobserwowano istotnie statystycznie różnice między komórkami kontrolnymi, a komórkami pozbawionymi gankyriny. Co bardziej interesujące, linie komórkowe uległy podziałowi na dwie grupy. Komórki RPMI_KO i U266_KO charakteryzują się obniżonym tempem proliferacji oraz przyspieszonym czasem podwojenia populacji w stosunku do komórek kontrolnych. Druga grupa wykazuje z kolei odwrotny efekt. Komórki L363_KO oraz JJN3_KO charakteryzują się przyspieszoną proliferacją przy jednoczesnym obniżeniu czasu podwojenia populacji.

Pod kątem ewentualnych zmian w tempie proliferacji, sprawdzono również komórki linii komórkowych o obniżonym poziomie ekspresji gankyriny (Wykres 2).

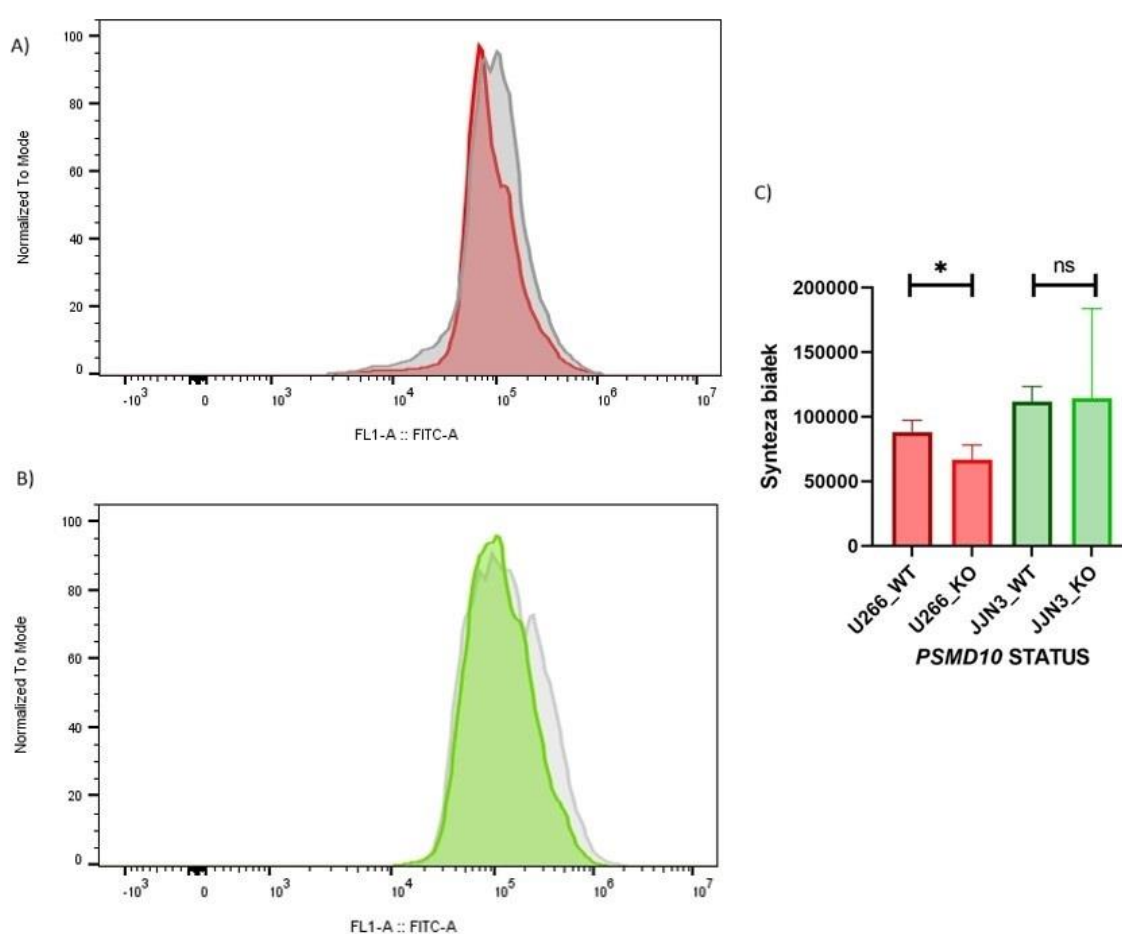


Wykres 2. Czas podwojenia populacji komórek o obniżonym poziomie ekspresji gankyriny, wyprowadzonych metodą Sleeping beauty. test t-Studenta do oceny istotności statystycznej (GraphPad 9.3) * $p < 0,05$ (trzy powtórzenia biologiczne)

Przeprowadzona analiza wykazała różnice w czasie podwojenia populacji pomiędzy komórkami kontrolnymi, a komórkami o obniżonym poziomie ekspresji *PSMD10*. Zmiany istotne statystycznie obserwowano w przypadku linii JJN3TST209. Komórki o obniżonym poziomie gankyriny, charakteryzował szybszy czas podwojenia populacji w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Obserwowane zmiany, mają odmienny charakter do zmian wywołanych całkowitym wyłączeniem ekspresji *PSMD10*.

1.4. Ocena tempa syntezy białek *de novo*

Synteza białek stanowi jeden z najbardziej podstawowych procesów zachodzących w komórce. Jest procesem biologicznym, zapewniającym komórkom zdolność do pełnienia określonych funkcji. Zmiany w regulacji syntezy białek, mogą prowadzić do niekontrolowanej proliferacji komórek, a w konsekwencji do nowotworzenia. Celem sprawdzenia czy gankyrina ma wpływ na ogólną syntezę białek oraz odpowiedzi na pytanie, czy obserwowane przez nas zmiany tempa proliferacji korelują z tempem syntezy białek *de novo*, omawiany proces zbadano przy użyciu cytometrii przepływowej (Rycina 13).



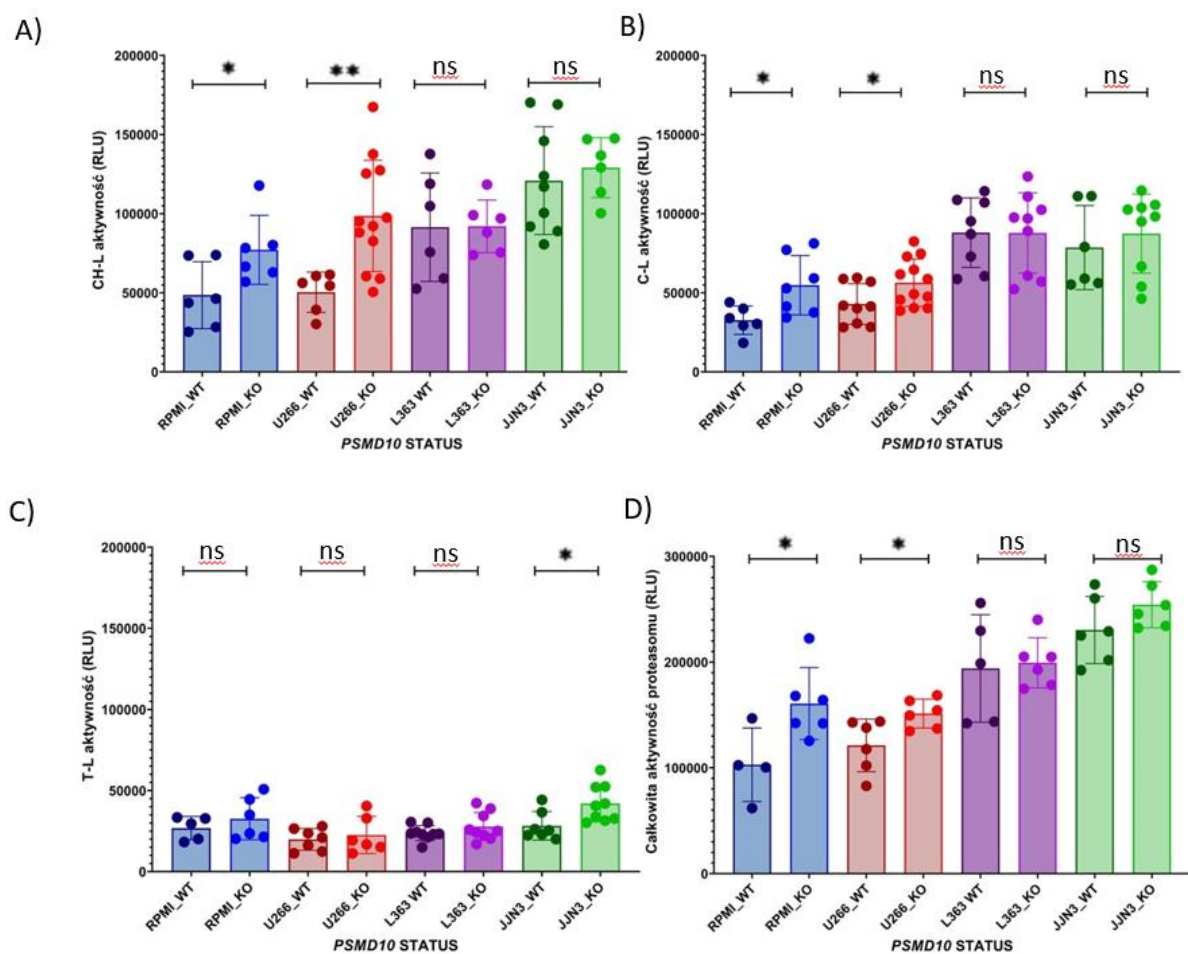
Rycina 13. Przykładowy poziom syntezy białka, klonów wyprowadzonych metoda CRISPR-Cas9 w linii U266 (A) i JJN3 (B). Porównanie średniego poziomu syntezy białek *de novo* poprzez porównanie intensywności fluorescencji pików (C). test t-Studenta do oceny istotności statystycznej (GraphPad 9.3) * $p < 0,05$ ($n = 12$; 3 powtórzenia biologiczne) ■ linia komórkowa U266, ■ linia komórkowa JJN3, ■ komórki kontrolne.

Uzyskane wyniki wskazują istotnie statystycznie różnice w stopniu syntezy białek pomiędzy komórkami kontrolnymi, a komórkami o wyłączonej ekspresji *PSMD10* linii komórkowej U266. Komórki U266_KO charakteryzują się obniżoną syntezą białek, w porównaniu do komórek kontrolnych. Analogicznych różnic nie obserwowano w linii komórkowej JJN3.

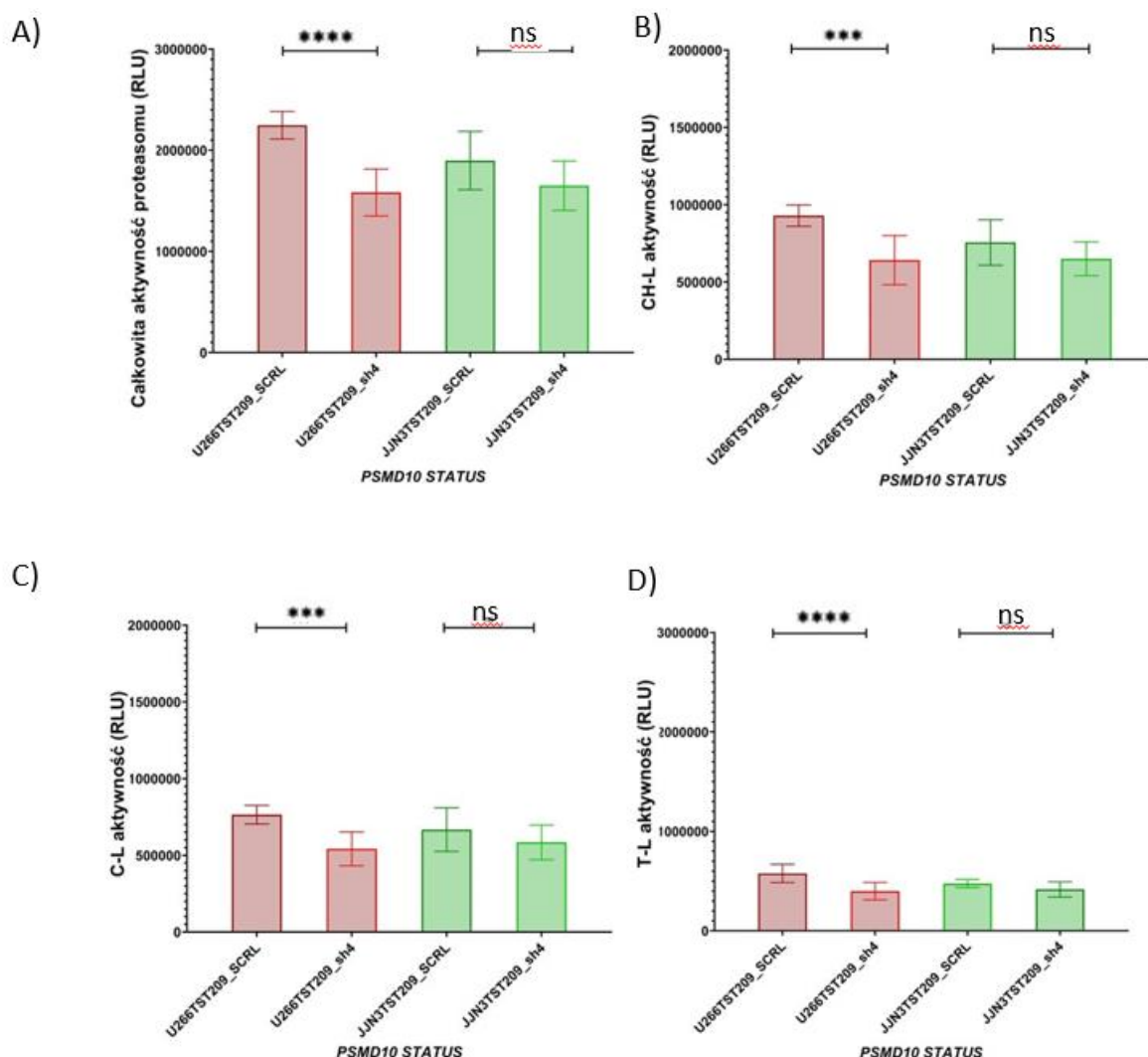
Obserwowany spadek tempa syntezy białek *de novo*, pokrywa się z kierunkiem zmian uzyskanych w rozdziale V 1.3 potwierdzając tym samym zależność tempa proliferacji ze stopniem syntezy białek.

1.5. Porównanie aktywności proteasomu

W związku z tym, że gankyrina jest znana jako białko pomocnicze w składaniu proteasomu, wysunięto hipotezę, że gankyrina może regulować aktywność proteasomu w komórkach szpiczaka. W celu potwierdzenia tej hipotezy, sprawdzono różnice w aktywności wszystkich trzech rodzajów katalitycznych aktywności proteasomu. W tym celu, oba wyprowadzone modele komórkowe poddano testowi luminescencyjnemu Proteasome Glo, pozwalającemu na pomiar aktywności proteaz, w tym osobno aktywności chymotrypsynowej (CH-L), Caspazowej (C-L) oraz trypsynowej (T-L) (*Rycina 14 i 15*).



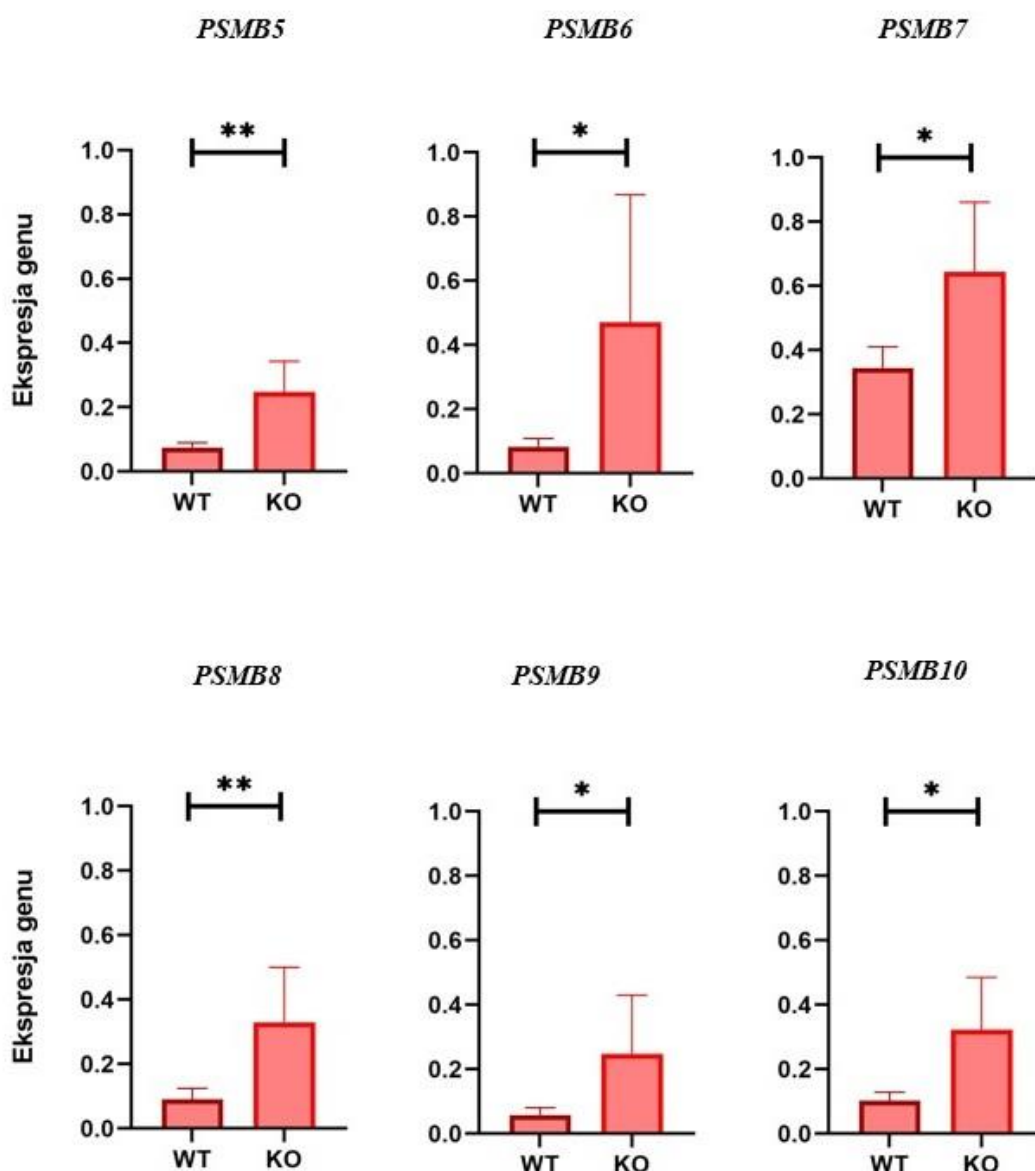
Rycina 14. Aktywność proteasomu w liniach komórkowych pozbawionych ekspresji PSMD10
 A) całkowita aktywność proteasomu B) CH-L- aktywność chymotrypsynowa C) C-L- aktywność kaspazowa D) T- aktywność trypsynowa; test t-Studenta do oceny istotności statystycznej (GraphPad 9.3) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (każdy klon w minimum trzech powtórzeniach biologicznych, ilość klonów RPMI_WT $n=2$, RPMI_KO $n=2$, U266_WT $n=2$, U266_KO $n=3$, L363_WT $n=2$, L363_KO $n=2$, JJN3_WT $n=2$, JJN3_KO $n=2$)



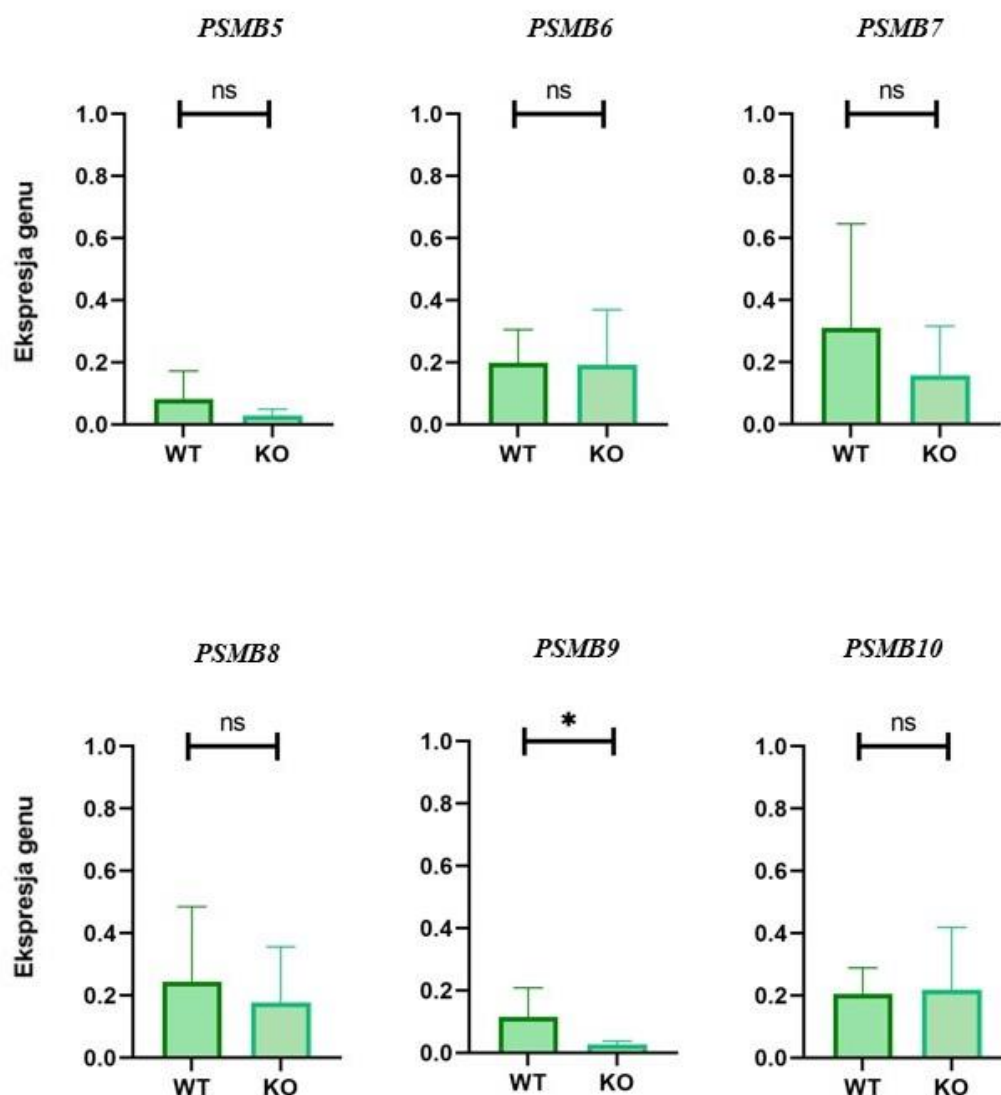
Rycina 15. Aktywność proteasomu w liniach komórkowych o długotrwałym obniżonym poziomie PSMD10 (wyciszenie 2-tygodniowe) A) całkowita aktywność proteasomu B) CH-L-aktywność chymotrypsynowa C) C-L-aktywność kaspazowa D) T-aktywność trypsynowa; test *t*-Studenta do oceny istotności statystycznej (GraphPad 9.3) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (3 powtórzenia biologiczne)

Otrzymane wyniki, wskazują zmiany w całkowitej aktywności proteasomu w obu badanych modelach. Istotny statystycznie wzrost aktywności, zaobserwowano w komórkach pozbawionych gankiryny linii RPMI i U266, podczas gdy obniżony poziom gankiryny w linii U266TST209, doprowadził do znaczącego obniżenia całkowitej aktywności proteasomu. W przypadku pozostałych, badanych linii komórkowych nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie. Wyjątek stanowiły komórki JNJ3 PSMD10_KO wykazujące wzrost jedynie aktywności trypsynowej w stosunku do komórek kontrolnych PSMD10_WT.

Celem sprawdzenia, czy obserwowane zmiany aktywności proteasomu są związane z ekspresją genów kodujących podjednostki proteasomu za pomocą qRT-PCR, sprawdzono ekspresję genów kodujących podjednostki proteasomu konstytutywnego. Ze względu na obecność w komórkach hematopoetycznych również drugiego rodzaju proteasomu (rozdz. I 5.2), sprawdzono także ekspresję genów kodujących podjednostki immunoproteasomu (*Rycina 16 i 17*).



*Rycina 16. Poziom ekspresji podjednostek proteasomu w klonach linii komórkowej U266 wyprowadzonych metodą CRISPR-Cas9 sprawdzony za pomocą RT-PCR, normalizowany do PGK1 (2-ΔCt). test t-Studenta do oceny istotności statystycznej (GraphPad 9.3) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ ($n=12$; 3 powtórzenia biologiczne)*



Rycina 17. Poziom ekspresji podjednostek proteasomu w klonach JJN3 wyprowadzonych metodą CRISPR-Cas9 sprawdzony za pomocą RT-PCR, normalizowany do PGK1 (2-ΔCt). test *t*-Studenta do oceny istotności statystycznej (GraphPad 9.3) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ ($n=12$; 3 powtórzenia biologiczne)

Otrzymane wyniki pokazują ponowny podział badanych linii komórkowych na dwie grupy. Istotny statystycznie wzrost ekspresji wszystkich badanych podjednostek proteasomów, obserwowano w przypadku linii U266, wskazując w ten sposób na zależność aktywności proteasomu od poziomu ekspresji genów kodujących jego podjednostki. Opisywaną zależność potwierdza również fakt braku występowania analogicznych różnic w przypadku linii JJN3,

będącej przedstawicielem drugiej grupy. W tym przypadku wyłączenie ekspresji gankyriny, nie doprowadziło do zmian aktywności poszczególnych podjednostek proteasomu. Zmian nie obserwowano również na poziomie ekspresji genów.

Uzyskane rezultaty potwierdzają zależność badanych procesów od gankyriny, wskazując na odmienną sposobu ich regulacji w zależności od linii komórkowej oraz badanego modelu komórkowego.

2. Ocena wpływu poziomu *PSMD10*/gankyriny na przeżycie pacjentów z MM w kontekście różnych schematów leczenia

2.1. Ocena wpływu poziomu ekspresji mRNA *PSMD10* na rokowanie pacjentów z MM leczonych schematami z uwzględnieniem PI, IMiD oraz kombinatorycznych

Baza COMPASS (ang. *Clinical Outcomes in Multiple Myeloma to Personal Assessment*) jest zbiorem danych klinicznych i genetycznych pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym szpiczakiem plazmocytowym (nr badania klinicznego NCT01454297). Projekt uruchomiony przez Fundację Badań nad Szpiczakiem Plazmocytowym (ang. *The Multiple Myeloma Research Foundation*, MMRF) jest jednym z największych i najbardziej kompleksowych badań w tej dziedzinie. Zbiór danych pacjentów oraz informacji na temat stosowanych terapii i wyników leczenia, ma pomóc w lepszym zrozumieniu odmiennej skuteczności terapii. Głównym celem jest profilowanie genetyczne pacjentów ze szpiczakiem plazmocytowym. Analiza genomów i transkryptomu, pozwala zidentyfikować mutacje genetyczne i inne biomarkery, mogące wpływać na rozwój choroby i odpowiedź na leczenie.

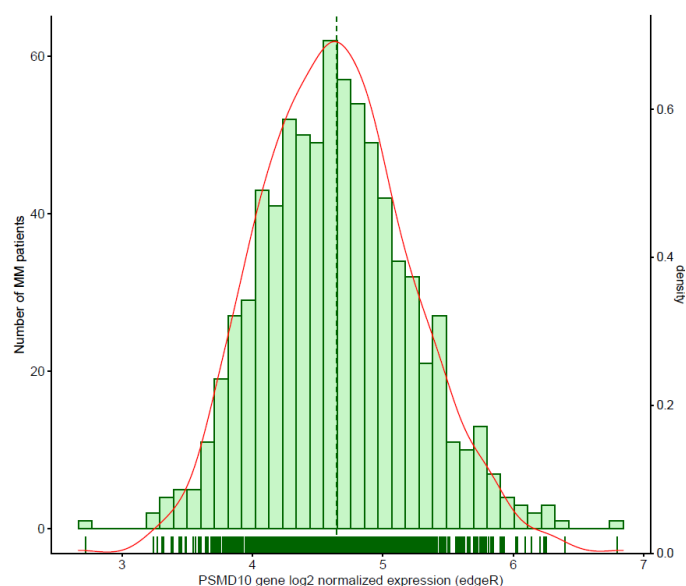
Dotychczasowe analizy poziomu białek w próbkach pobranych od pacjentów z NDMM wykazały, że podwyższony poziom białka gankyrina w komórkach plazmatycznych wiąże się z gorszym rokowaniem wśród pacjentów (Misiewicz-Krzeminska et al., 2020b)

W związku z tym, przeanalizowano wyniki oznaczeń poziomu ekspresji genu *PSMD10* w komórkach plazmatycznych CD138+. Próbkę pobrane były od 938 pacjentów z nowo zdiagnozowanym szpiczakiem, zakwalifikowanych do udziału w badaniu Commpass. Połowę pacjentów stanowili pacjenci poniżej 65 roku życia. Podczas diagnozy w I, II i III stadium było odpowiednio 18%, 47% oraz 8% pacjentów zaawansowania choroby, oceniane R-ISS (Tabela 17)

Tabela 17. Charakterystyka pacjentów uczestniczących w badaniu Compass

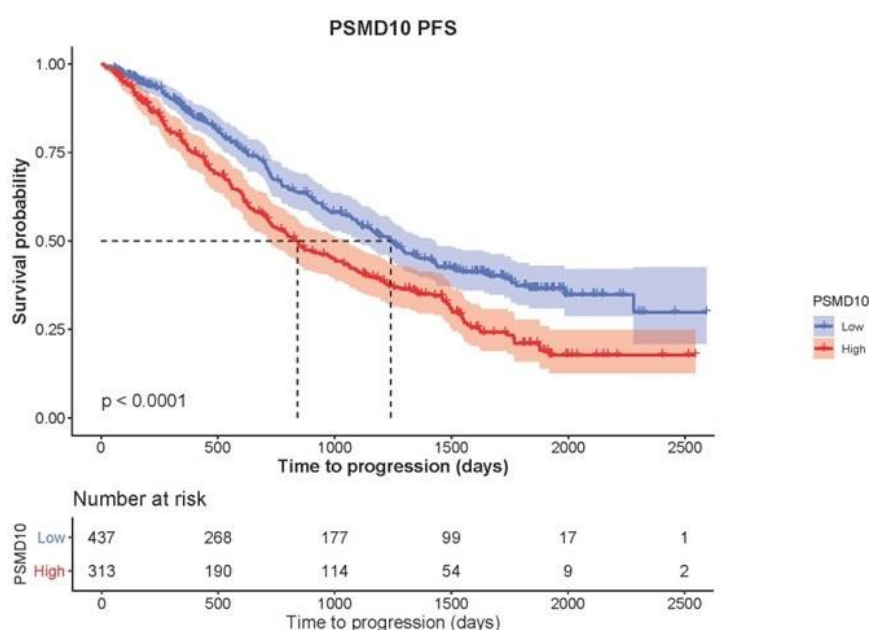
		Liczba pacjentów	Liczba pacjentów (%)
Przedział wiekowy	<65	468	50
	≥65	470	50
R-ISS	I	169	18
	II	444	47
	III	75	8
	brak danych	250	27
Dalszy los pacjenta	zgon	269	40
	brak danych	669	60
Przyczyna zgonu	postęp choroby	151	56
	inna	118	44
Całkowita liczba pacjentów		938	100

Wykazano, że *PSMD10* ulega ekspresji w komórkach plazmatycznych CD138+ (Wykres 3), co pozwoliło na ocenę wpływu poziomu *PSMD10* podczas diagnozy na przeżycie pacjentów. W związku z czym wysunęliśmy hipotezę, że poziom ekspresji *PSMD10* może wpływać na przeżycie pacjentów chorujących na szpiczaka.

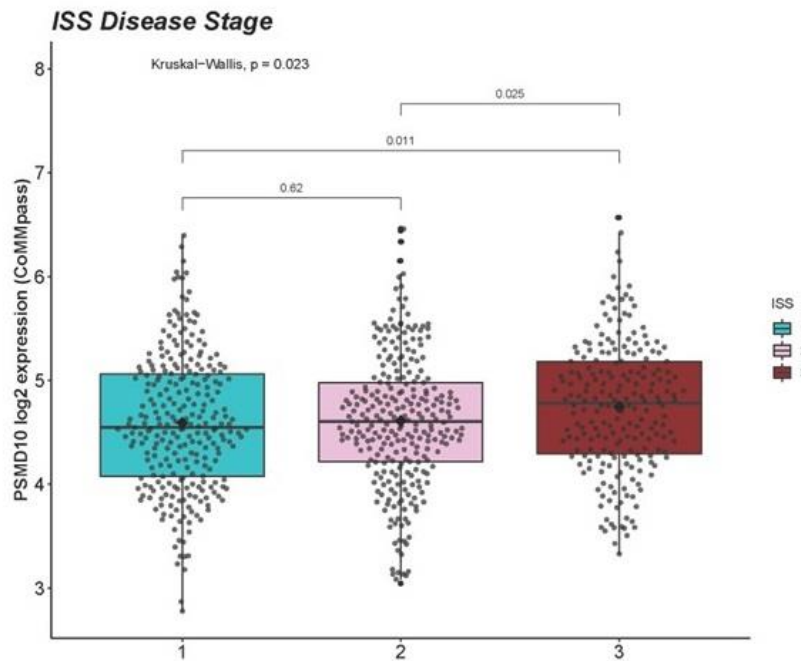


Wykres 3. Ekspresja *PSMD10* w komórkach plazmatycznych CD138+ pobranych od pacjentów ze zdiagnozowanym MM.

Ocena wpływu poziomu ekspresji *PSMD10* na czas przeżycia wolny od wznowy, na podstawie danych bazy CoMMpass wykazała, że wysoki poziom ekspresji *PSMD10* jest złym czynnikiem prognostycznym, niezależnie od zastosowanego sposobu leczenia ($p < 0,001$) (Rycina 18). Jednocześnie zaobserwowano również, że wysoki poziom *PSMD10* jest związany ze stopniem zaawansowania choroby (ISS) podczas diagnozy. Pacjenci w III stadium choroby (ISS3) mają istotnie wyższy poziom *PSMD10* w porównaniu z pacjentami zdiagnozowanymi w stadium ISS1 i ISS2 ($p < 0,05$) (Rycina 19).

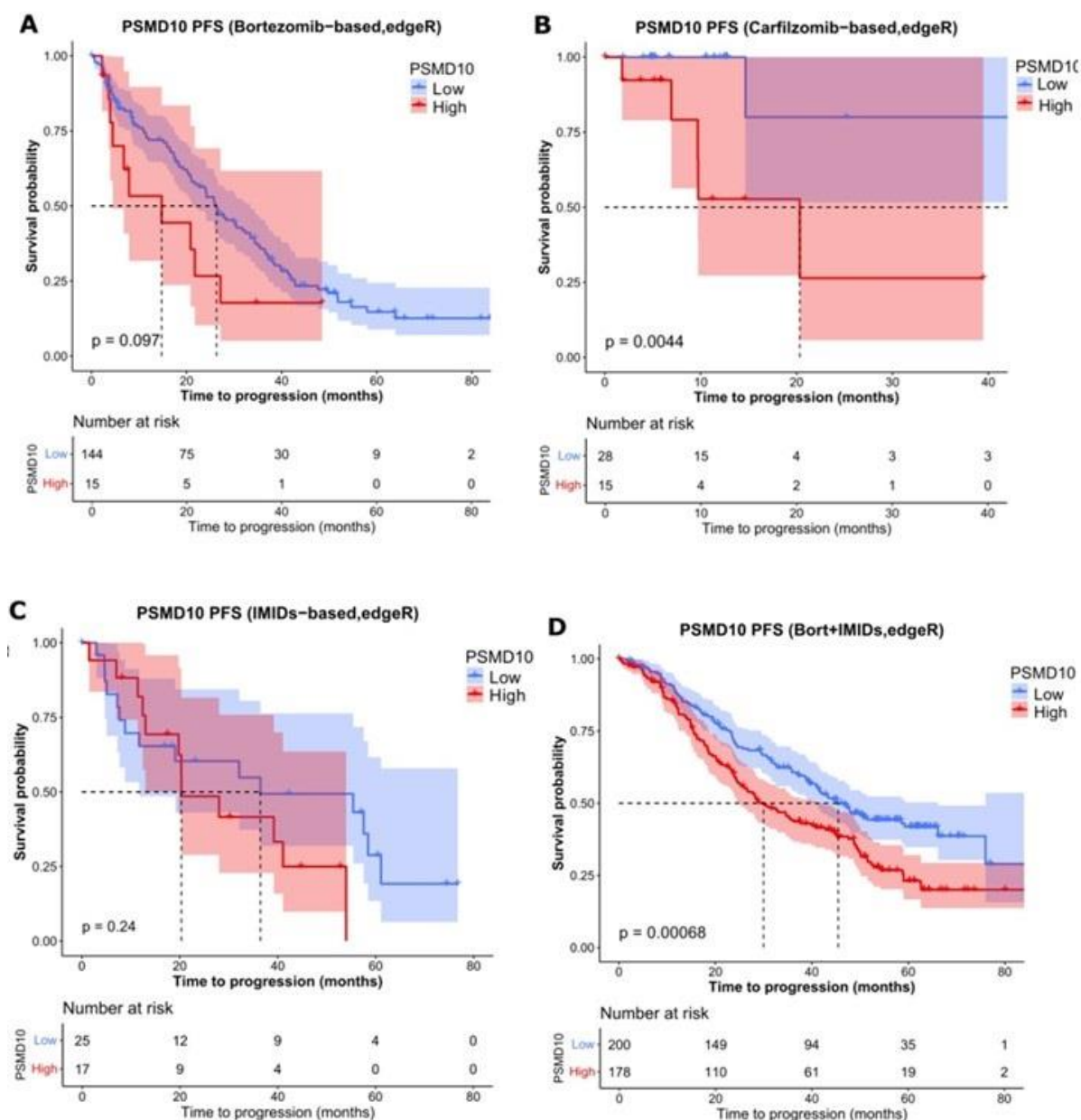


Rycina 18. Krzywe przeżywalności Kaplan- Meier przedstawiające wpływ poziomu *PSMD10* na czas wolny od wznowy, oznaczanego przy pomocy RNAseq w komórkach plazmatycznych *CD138+* pobranych od pacjentów z nowo zdiagnozowanym MM, biorących udział w badaniu Commpass. Istotność statystyczna oceniana testem Mantel-COX

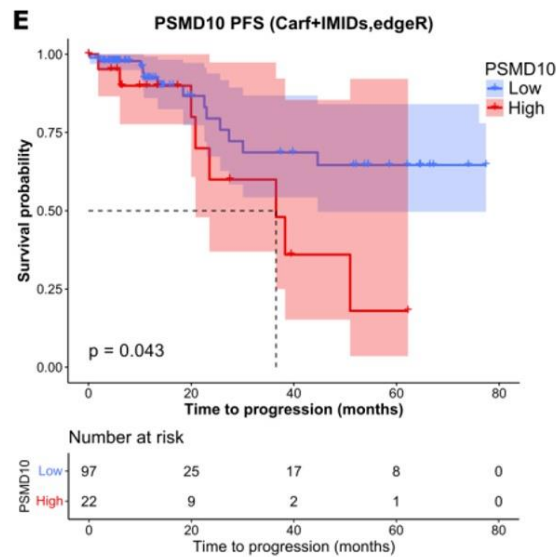


Rycina 19. Poziom *PSMD10* w poszczególnych stadiach choroby (ISS). Poziom istotności oceniany testem Kruskala-Wallisa

W celu lepszego zrozumienia roli *PSMD10* w odpowiedzi na leki, przeprowadzono bardziej szczegółowe analizy. Sprawdzone, czy wysoki poziom *PSMD10*, ma wpływ na czas wolny od wznowy u pacjentów, u których terapia była oparta na schematach z zastosowaniem leków z grup PI lub IMiD. Analogicznym analizom poddano próbki pobrane od pacjentów leczonych z wykorzystaniem terapii kombinatorycznych, łączących te dwie klasy leków (Rycina 20). Grupy pacjentów leczonych bortezomibem, karfilozmibem lub lenalidomidem obejmowały odpowiednio 159, 43 i 42 osoby, podczas gdy grupy pacjentów leczonych z wykorzystaniem terapii kombinatorycznych obejmowały 378 pacjentów w przypadku połączenia IMiD z bortezomibem oraz 119 w przypadku połączenia z karfilzomibem.



Rycina 20. Krzywe przeżywalności Kaplan- Meier przedstawiające PFS pacjentów z bazy CoMMpass w zależności od zastosowanego schematu leczenia A) Leczenie z zastosowaniem bortezomibu B) Leczenie z zastosowaniem karfilzomibu C) Leczenie z zastosowaniem leków z grupy immunomodulatorów D) Leczenie z zastosowaniem bortezomibu i leków z grupy immunomodulatorów



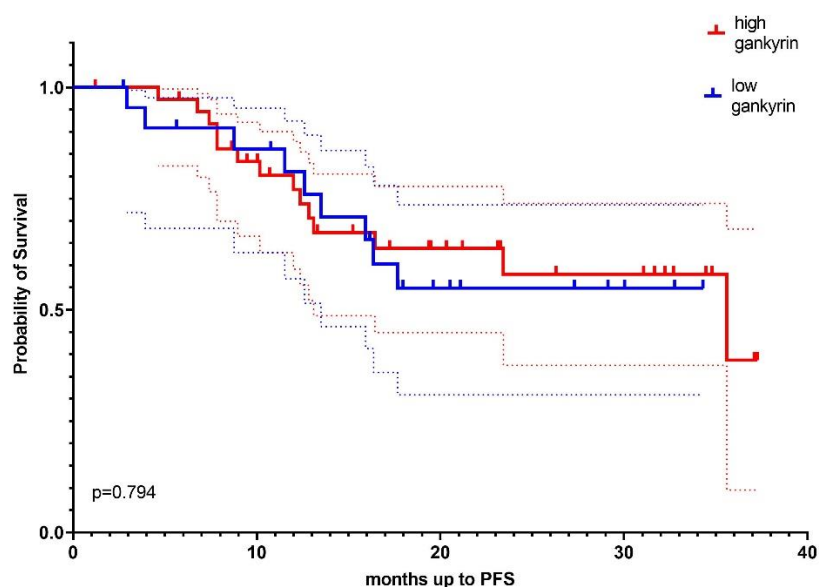
Rycina 20c.d. E) Leczenie z zastosowaniem karfilzomibu i leków z grupy immunomodulatorów. Istotność statystyczna oceniana testem Mantel-COX

Uzyskane wyniki, wskazują na związek poziomu ekspresji gankyriny z czasem wolnym od wznowy. Największe różnice pomiędzy poziomem ekspresji *PSMD10* a długością czasu wolnego od wznowy obserwowano w przypadku dwóch terapii. Zarówno w przypadku terapii opartej na leczeniu karfilzomibem, jak i terapii kombinatorycznej opartej na lekach z grupy IMiD i bortezomibie obserwujemy różnice istotnie statystycznie. Należy jednak zauważyć, że grupa pacjentów otrzymujących karfilzomib, charakteryzowała się małą liczebnością, co mogło wpłynąć na otrzymany wynik.

2.2. Ocena wpływu poziomu gankyriny na przeżycie pacjentów leczonych schematem bez wykorzystania inhibitorów proteasomu

Celem walidacji przedstawionych powyżej wyników, przeanalizowano poziom białka gankyrina (Wykres 4). Walidacji dokonano techniką CNIA (ang. *capillary nano-immuno assay*), stosując podejście wykorzystane przy pracy (Misiewicz-Krzeminska et al., 2020c). Ocenie poziomu gankyriny poddano próbki pobrane od pacjentów podczas diagnozy.

Wspomnianą analizę przeprowadzono na próbkach pobranych od pacjentów w ramach badania GEM-Claridex (NCT02575144). Otwarte, randomizowane badanie III fazy prowadzono na nieleczonych wcześniej i niekwalifikujących się do przeszczepu pacjentach. Po włączeniu do badania, pacjentów poddano leczeniu nieobejmującemu leków z grupy PI. Pacjenci otrzymywali lenalidomid i deksametazon z dodatkiem lub bez klarytromycyny.



Wykres 4. Krzywe przeżywalności Kaplan- Meier przedstawiające poziom białka gankyrina w próbkach pacjentów NDMM. . Istotność statystyczna oceniana testem Mantel-COX

Przeprowadzona analiza wykazała brak związku pomiędzy poziomem gankyriny, a czasem wolnym od wznowy, w przypadku pacjentów leczonych z zastosowaniem schematów leczenia nieobejmujących PI.

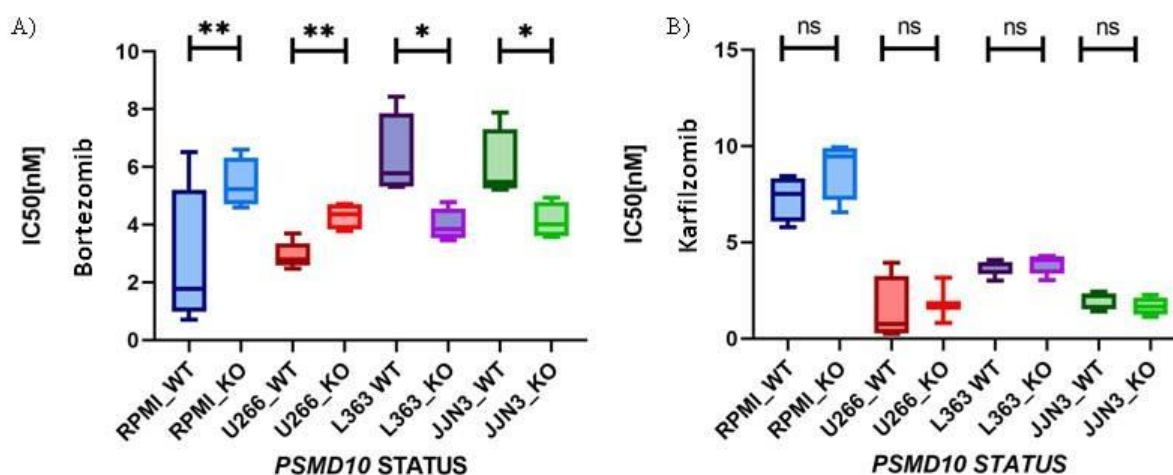
Przeprowadzone analizy ekspresji genów z sekwencjonowania RNA-seq, wykazały niekorzystny wpływ prognostyczny wysokich poziomów *PSMD10*, dla pacjentów leczonych z wykorzystaniem terapii opartej na PI, zarówno w obecności, jak i przy braku IMiDs. Wpływ ten nie był jednak obserwowany w przypadkach, w których terapia była oparta wyłącznie na

IMiDs, sugerując tym samym związek gankyriny z odpowiedzią na leki z grupy inhibitorów proteasomu. Zaobserwowane prawidłowości uzyskały dodatkowe potwierdzenie w przeprowadzonych następnie analizach poziomu białka. Wyniki uzyskane na drodze analiz próbek pacjentów pochodzących z dwóch niezależnych badań wskazują na związek gankyriny z odpowiedzią na leki z grupy PI.

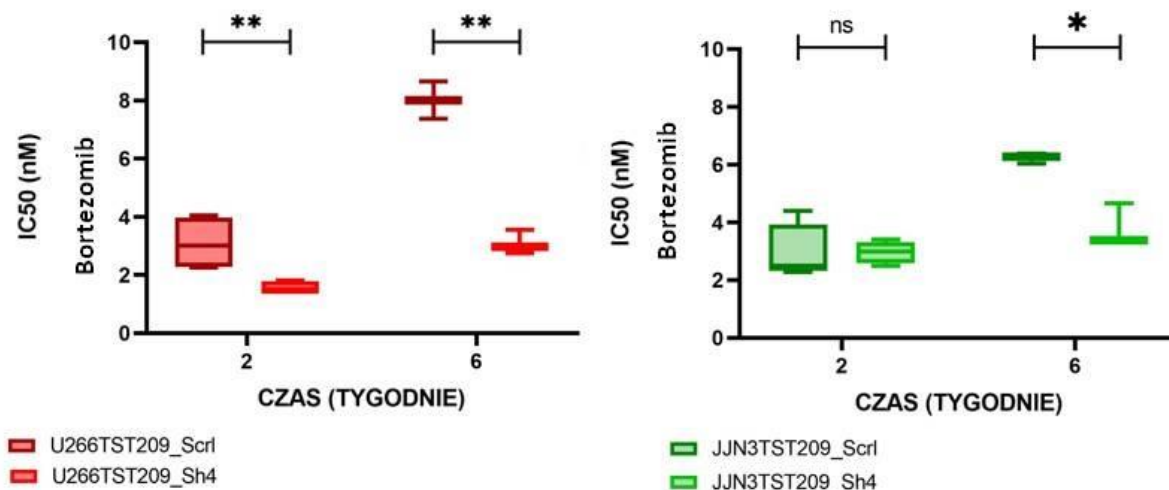
2.3. Porównanie aktywności leków przeciwszpczakowych na linie komórkowe szpiczaka o zmienionej ekspresji *PSMD10*

2.3.1 Ocena wpływu poziomu gankyriny na aktywność inhibitorów proteasomu

Komórki szpiczaka plazmocytoowego o różnym poziomie ekspresji *PSMD10*, poddano badaniom pod kątem ich oporności/podatności na cytotoksyczność wywołaną lekami przeciwszpczakowymi z grupy inhibitorów proteasomu. W tym celu komórki pozbawione ekspresji *PSMD10* oraz komórki z obniżoną ekspresją *PSMD10*, hodowano przez 48h w obecności 0-20nM bortezomibu lub karfilizomibu. Po tym czasie przy pomocy testu MTS sprawdzano ilość otrzymanego formazanu, która jest wprost proporcjonalna do liczby żywych komórek w hodowli. Następnie wyliczano wartości IC₅₀ (Rycina 21 i 22).

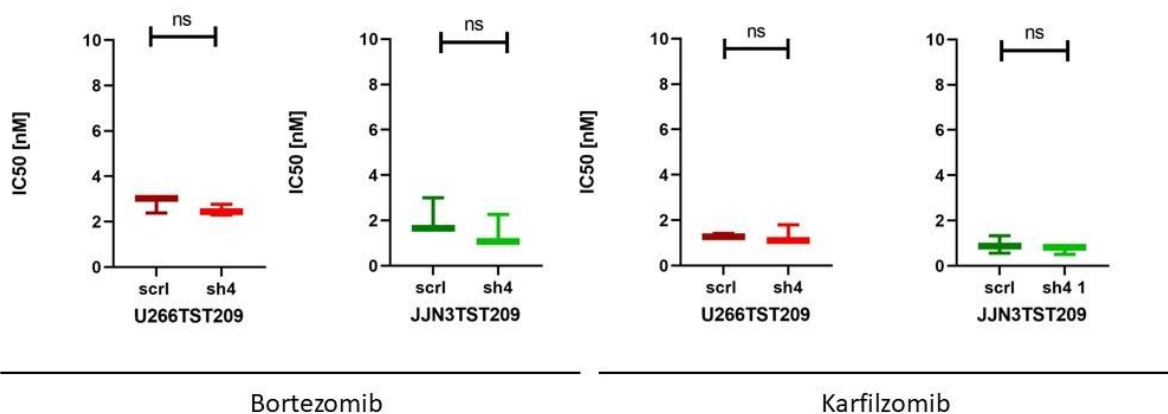


Rycina 21. Cytotoksyczność oceniana za pomocą testu MTS po 48 godzinach inkubacji z badanym lekiem, regresja nieliniowa do oceny IC₅₀, test t-Studenta do oceny istotności statystycznej (GraphPad 9.3) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ ($n = 30$; 3 powtórzenia biologiczne) A) Komórki pozbawione ekspresji *PSMD10* traktowane bortezomibem B) Komórki pozbawione ekspresji *PSMD10* traktowane karfilizomibem



Rycina 22. Cytotoksyczność oceniana za pomocą testu MTS po 48 godzinach inkubacji z badanym lekiem, regresja nieliniowa do oceny IC₅₀, test t-Studenta do oceny istotności statystycznej (GraphPad 9.3) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ ($n = 30$; 3 powtórzenia biologiczne). Długotrwałe wyciszenie ekspresji gankyriny za pomocą systemu Sleeping beauty po aktywacji doksycykliną 100ng/ml, komórki traktowane bortezomibem (3 powtórzenia biologiczne)

W obu badanych modelach, zaobserwowano istotne statystycznie różnice w odpowiedzi na bortezomib. Klony o wyłączonej ekspresji *PSMD10*, wszystkich badanych linii komórkowych wykazały zmiany wrażliwości w odpowiedzi na bortezomib, w porównaniu do klonów linii kontrolnych. Dodatkowo, linie komórkowe uległy wyraźnemu podziałowi na dwie grupy. Komórki *PSMD10_KO* linii komórkowych RPMI i U266, wykazywały zwiększoną oporność na bortezomib, podczas gdy komórki *PSMD10_KO* linii JJN3 i L363 charakteryzowały się zwiększoną wrażliwością na ten inhibitor proteasomu. Istotnie statystycznie zmiany w odpowiedzi na bortezomib zaobserwowano również po długoterminowym wyciszeniu gankyriny. Sześciotygodniowe obniżenie poziomu *PSMD10* spowodowało wzrost wrażliwości na bortezomib, w obu badanych liniach komórkowych. Żadnych zmian nie obserwowano z kolei, w odpowiedzi na drugi z inhibitorów proteasomu-karfilzomib. Model wyciszenia długoterminowego zastosowano po wcześniejszym przeprowadzeniu analogicznych testów na liniach komórkowych traktowanych doksycykliną przez 72h. W przypadku krótkoterminowego obniżenia poziomu gankyriny nie zaobserwowano żadnych zmian w odpowiedzi na dwa badane inhibitory proteasomu (Rycina 23).

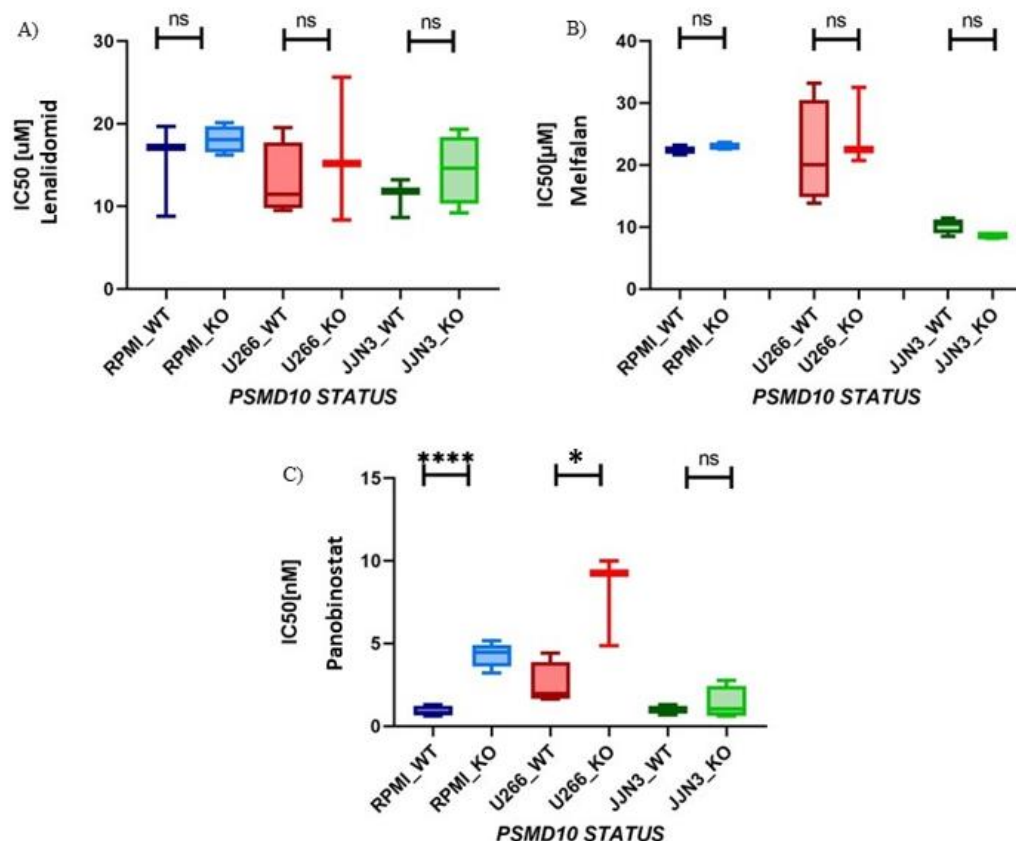


Rycina 23. Cytotoksyczność oceniana za pomocą testu MTS po 48 godzinach inkubacji z badanym lekiem, regresja nieliniowa do oceny IC50, test *t*-Studenta do oceny istotności statystycznej (GraphPad 9.3) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ C) Wyciszenie ekspresji gankyriny za pomocą systemu *Sleeping beauty* po 72h aktywacji doksycykliną 100ng/ml (3 powtórzenia biologiczne)

Uzyskane wyniki potwierdzają udział gankyriny w odpowiedzi na bortezomib, wskazując jednocześnie na zależność rodzaju obserwowanych zmian, wrażliwości na lek z rodzajem badanego modelu komórkowego. Dodatkowo otrzymane wyniki wskazują na adaptację komórek do zmian w poziomie gankyriny.

2.3.2. Ocena wpływu poziomu gankyriny na aktywność leków z pozostałych grup leczenia

Celem sprawdzenia czy obserwowane zmiany są charakterystyczne tylko dla bortezomibu, linie komórkowe pozbawione ekspresji *PSDM10* poddano analogicznym testom MTS z wykorzystaniem leków należących do innych grup leczenia (*Rycina 24*).

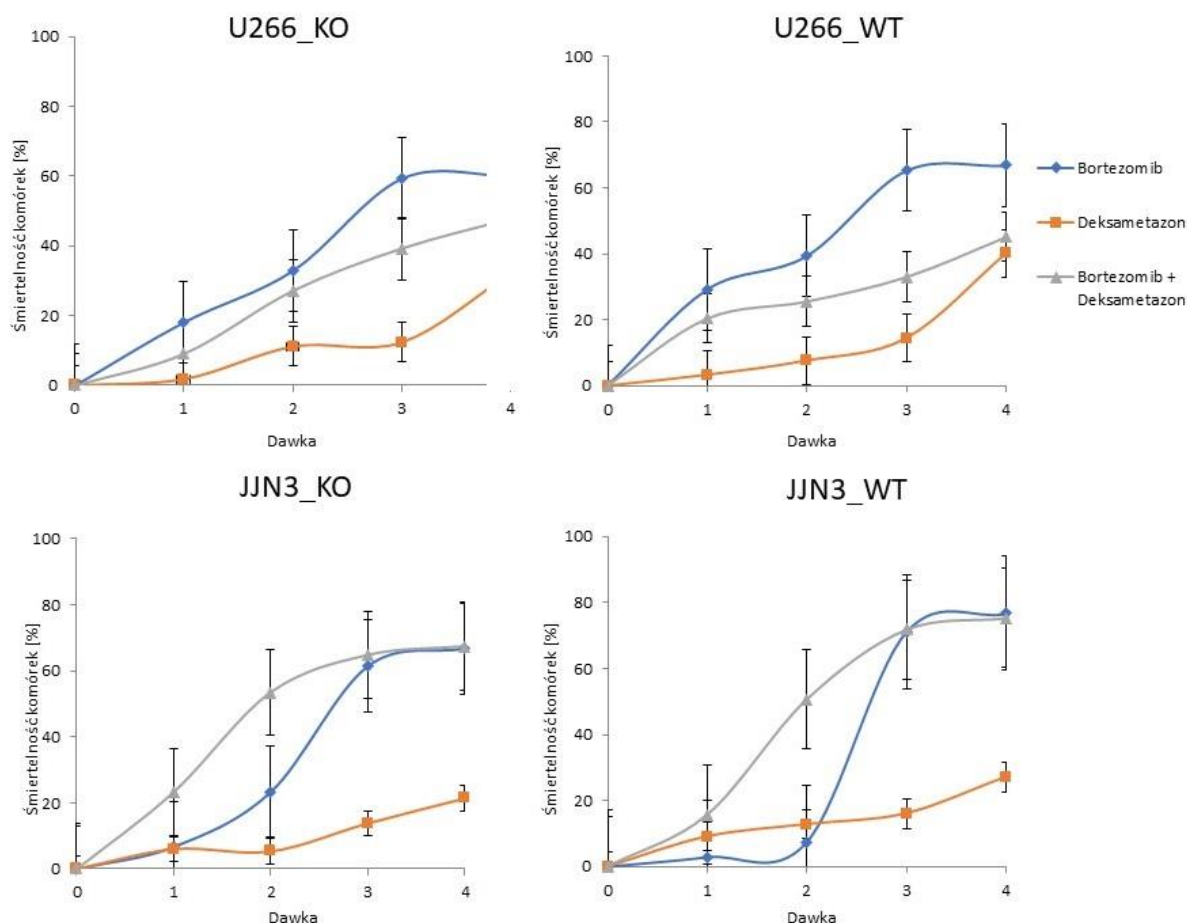


Rycina 24. Cytotoksyczność oceniana za pomocą testu MTS po 48 lub 72 godzinach, w zależności od leku. regresja nieliniowa do oceny IC50, test t-Studenta do oceny istotności statystycznej (GraphPad 9.3) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ ($n=23$; 3 powtórzenia biologiczne). Komórki pozbawione ekspresji *PSMD10* traktowane A) lenalidomidem 0-50 μM B) melfalanem 0-50 μM C) panobinostatem 0-20 nM

W przypadku odpowiedzi na leki z pozostałych grup leczenia, takie jak lenalidomid, malfalan i panobinostat zmiany wrażliwości zaobserwowano jedynie w przypadku ostatniego. Komórki *PSMD10_KO*, charakteryzowały się zwiększoną opornością na lek z grupy inhibitorów deacetylazy histonowej, w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Zachodzące, istotne statystycznie zmiany dotyczyły komórek linii RPMI i U266.

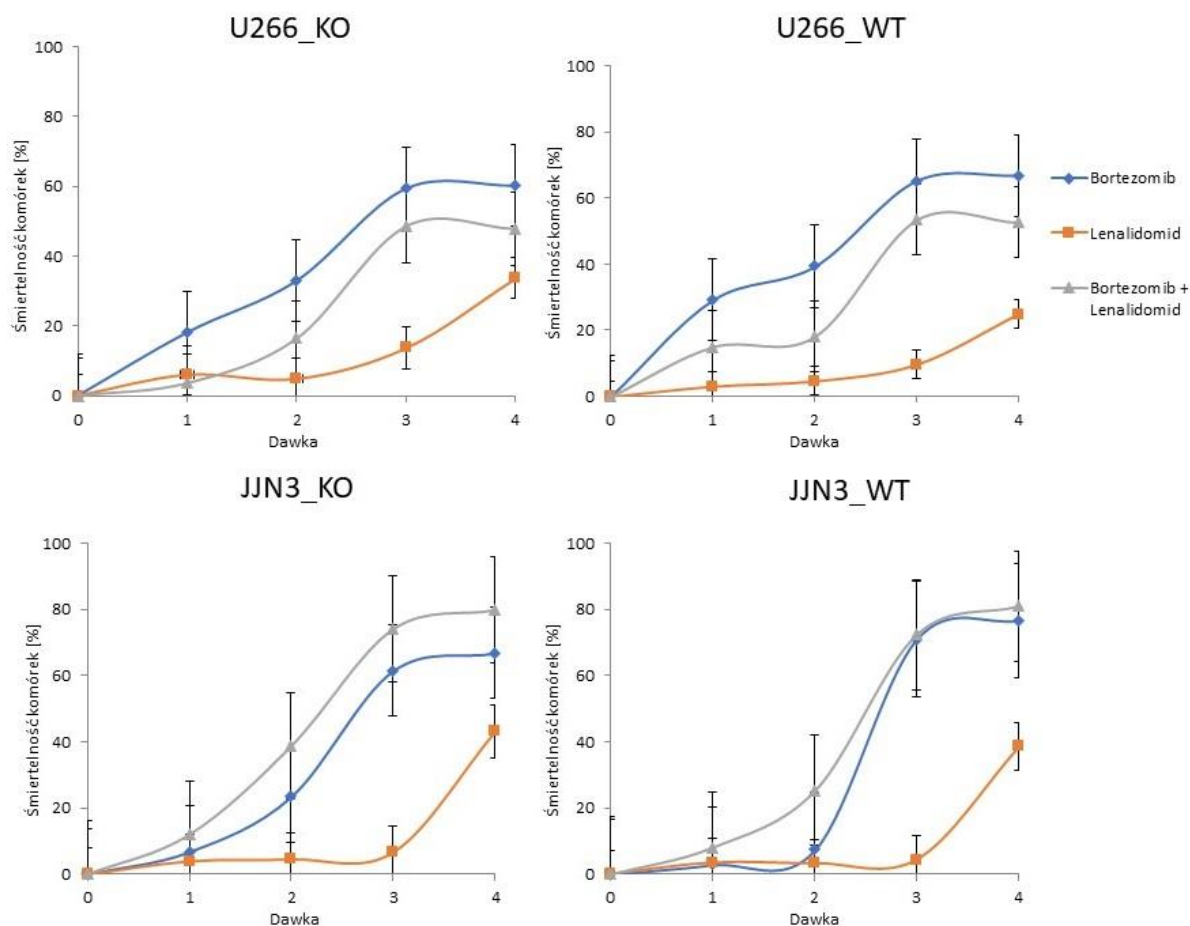
2.3.3 Ocena wpływu poziomu gankyriny na aktywność leków w kombinacjach

Największe różnice istotnie statystycznie, w przypadku analiz próbek pacjentów z NDMM obserwowano po stosowaniu terapii kombinatorycznych. Celem sprawdzenia czy analogiczne różnice będą widoczne w modelu komórkowym pozbawionym ekspresji *PSMD10*, komórki poddano traktowaniu bortezomibem w połączeniu z deksametazonem lub lenalidomidem (Rycina 25).



DAWKA	1	2	3	4	LINIA KOMÓRKOWA
Bortezomib [nM]	1	2	4	8	U266
Deksametazon [uM]	10	20	40	80	
Bortezomib [nM]	1,5	3	6	12	JJN3
Deksametazon [uM]	15	30	60	120	

Rycina 25. Synergizm leków oceniany za pomocą testu MTS. Wykresy przedstawiają śmiertelność komórek w zależności od dawki leku. Komórki traktowane bortezomibem i deksametazanem w stosunku 1:10



DAWKA	1	2	3	4	LINIA
LEK					KOMÓRKOWA
Bortezomib [nM]	1	2	4	8	U266
Lenalidomid [uM]	10	20	40	80	
Bortezomib [nM]	2	4	8	16	JJN3
Lenalidomid [uM]	20	40	80	160	

Rycina 26. Synergizm leków oceniany za pomocą testu MTS. Wykresy przedstawiają śmiertelność komórek w zależności od dawki leku. Komórki traktowane bortezomibem i lenalidomidem w stosunku 1:10

Uzyskane wyniki wskazują na zmiany wrażliwości komórek na traktowanie lekami w kombinacjach. Obserwowane zmiany są analogiczne do zmian obserwowanych w odpowiedzi komórek na bortezomib. Komórki U266_KO, charakteryzujące się zwiększoną opornością na bortezomib, wykazują jednocześnie zwiększoną oporność na połączenia bortezomibu zarówno z deksametazonem jak i lenalidomidem, przejawiającą się zmniejszoną śmiertelnością

komórek. Komórki JJN3_KO wykazują z kolei odwrotny efekt. Obserwowane zmiany potwierdzają związek gankyriny z odpowiedzią na bortezomib.

3. Regulacja ścieżek sygnałowych

Określenie poziomu ekspresji genów w różnych warunkach fizjologicznych stanowi podstawę zrozumienia procesów zachodzących w komórce. Poprzez prowadzenie badań porównawczych między typami komórek lub ich stanami fizjologicznymi, można znaleźć odpowiedź na wiele pytań: Co odpowiada za obserwowane przez nas zmiany? Jakie mechanizmy biologiczne uczestniczą w badanych procesach? Jakie geny pośrednio lub bezpośrednio wpływają na powstałe różnice? Dostarczenie precyzyjnych informacji na temat poziomów ekspresji genów jest możliwe dzięki analizie poziomów dziesiątek tysięcy transkryptów. Metodą pozwalającą na realizację wyżej wymienionych zadań, jest sekwencjonowanie RNA-seq, metoda charakteryzująca się dużą czułością i dokładnością. Omawiana metoda została wykorzystana do identyfikacji mechanizmów molekularnych zależnych od gankyriny. W tym celu RNA wyizolowane z komórek trzech badanych linii komórkowych, poddano sekwencjonowaniu, a następnie przeprowadzając analizę bioinformatyczną, określono zmiany transkrypcyjne zachodzące między komórkami *PSMD10_WT*, a *PSMD10_KO*.

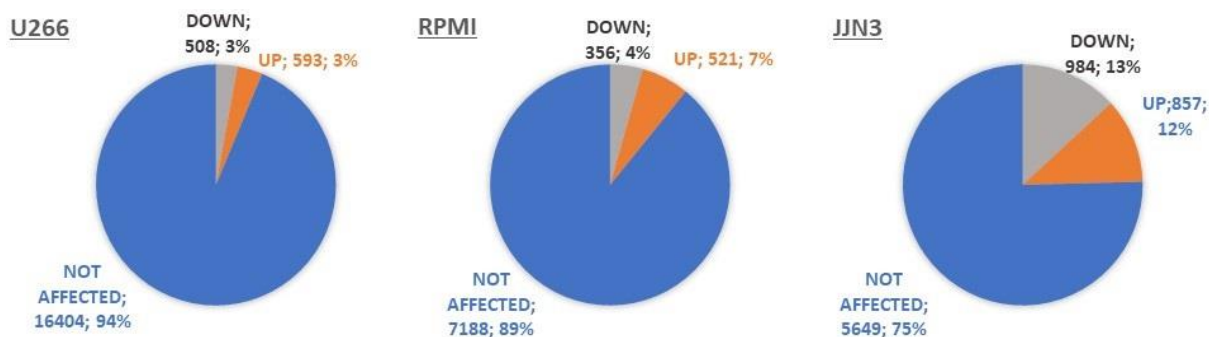
3.1. Ocena zmian profilów ekspresji genów wywołane wyłączeniem ekspresji

***PSMD10* w komórkach szpiczaka**

W pierwszej kolejności sprawdzono wywołane wyłączeniem ekspresji *PSMD10* zmiany ekspresji genów. Analizy przeprowadzono oddzielnie dla każdej z badanych linii komórkowych. Analizowano klony wyprowadzone z 3 linii komórkowych; kontrolne WT oraz bez ekspresji gankyriny KO. Minimalna ilość klonów zanalizowanych dla danego typu to 3 klony.

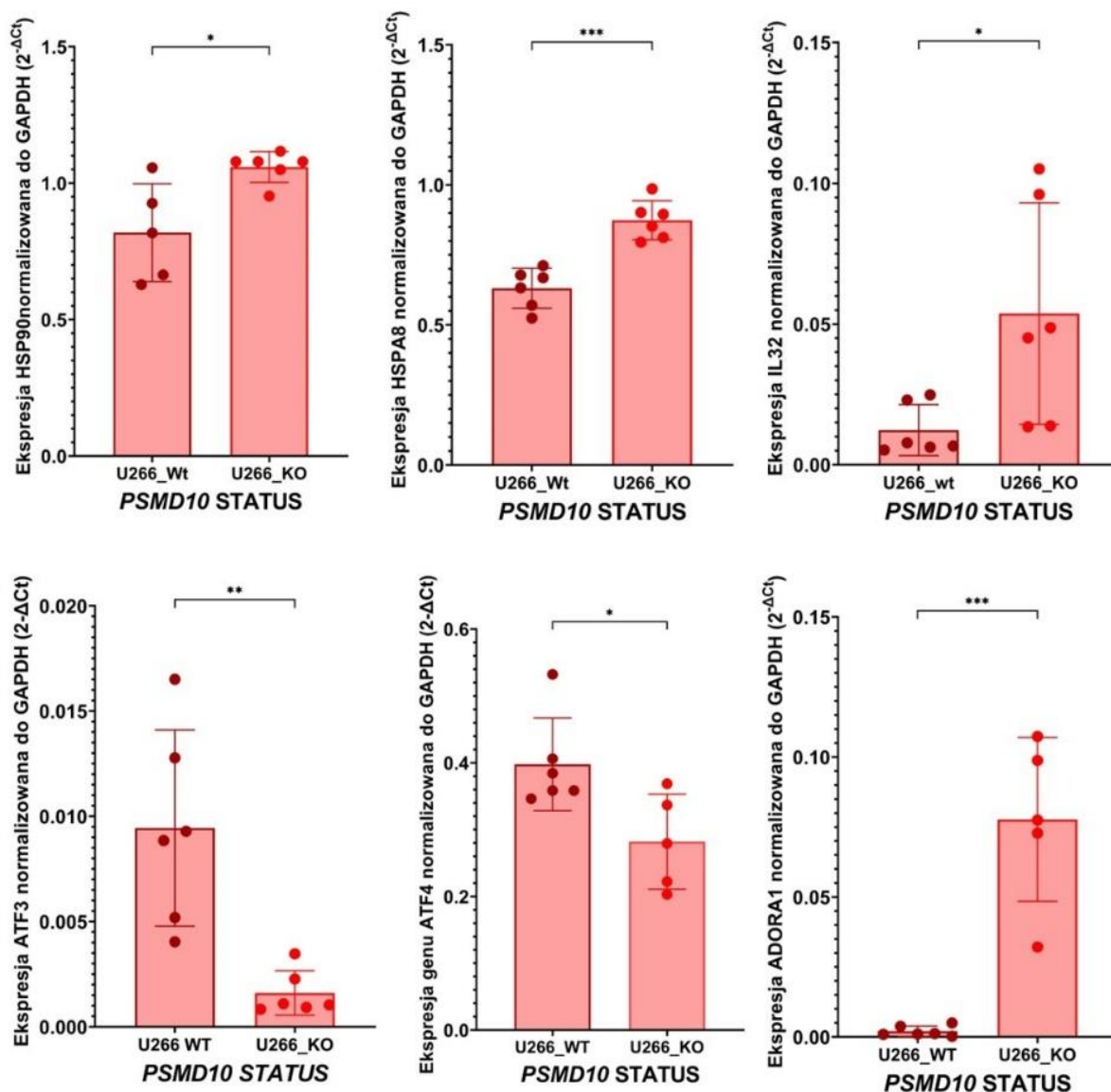
W każdej linii komórkowej zaobserwowano liczne zmiany ekspresji genów. Analizy wykazały istotne statystycznie różnice w ekspresji genów pomiędzy klonami WT i KO, przy czym zaobserwowano zarówno obniżenie jak i zwiększenie ekspresji genów. Ilość transkryptów, których ekspresja ulegała zmianie zależała od linii komórkowej. Najmniej zmian obserwowano w przypadku linii komórkowej RPMI, podczas gdy największe zmiany ekspresji,

obejmujące aż 25% genów odnotowano w linii JJN3. Balans pomiędzy wzmożoną a obniżoną ekspresją genów charakteryzował z kolei linię komórkową U266 (Rycina 27).



Rycina 27. Wykresy kołowe przedstawiające zmiany ekspresji genów wywołane wyłączeniem ekspresji PSMD10 (DOWN-geny o obniżonej ekspresji; UP-geny o zwiększonej ekspresji; NOT AFFECTED-geny o nieistotnie statystycznie zmienionej ekspresji)

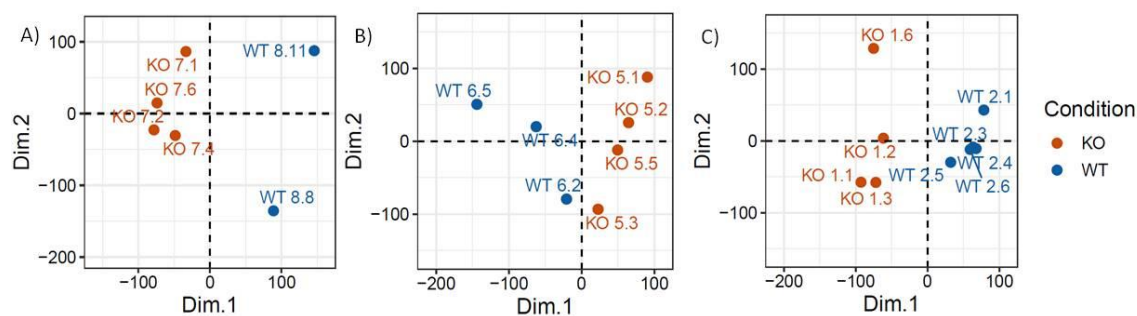
Celem potwierdzenia uzyskanych wyników sekwencjonowania masywnego RNAseq, przeprowadzono walidację ekspresji wybranych genów za pomocą reakcji qRT-PCR (Rycina 28). Sprawdzeniu poddano trzydzieści genów, wykazujących najbardziej istotne statystycznie zmiany poziomów ekspresji w poszczególnych liniach komórkowych. Poniżej przedstawiono przykładowe wyniki przeprowadzonej walidacji.



Rycina 28. Przykładowe wyniki walidacji technicznej. Poziom ekspresji genów mierzony metodą RT-PCR, normalizowany do GAPDH (2^{-ΔCt}). test t-Studenta do oceny istotności statystycznej (GraphPad 9.3) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (każdy klon w dwóch powtórzeniach technicznych, ilość klonów: U266_WT $n=3$, U266_KO $n=3$)

Uzyskane i potwierdzone wyniki zmian ekspresji poszczególnych genów pozwoliły na wykrycie genów, zależnych od gankiryny w sposób pośredni lub bezpośredni.

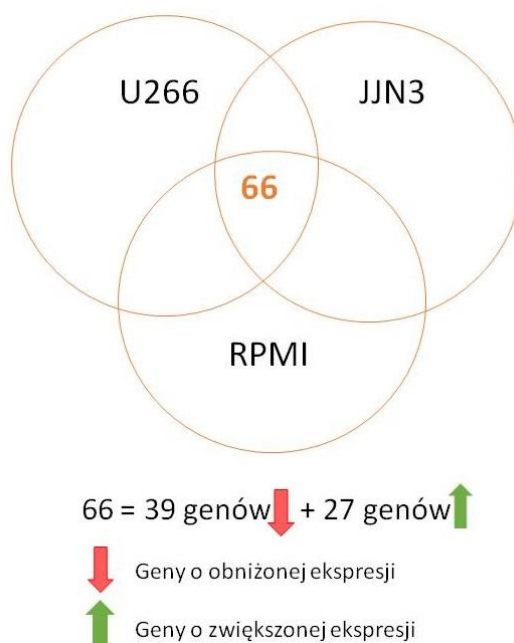
W kolejnym kroku przeprowadzono analizę głównych składowych (PCA) (Rycina 29), umożliwiającą odkrycie ewentualnych prawidłowości między badanymi klonami.



Rycina 29. Analiza głównych składowy PCA A) Klony linii komórkowej U266 B) Klony linii komórkowej RPMI C) Klony linii komórkowej JJN3

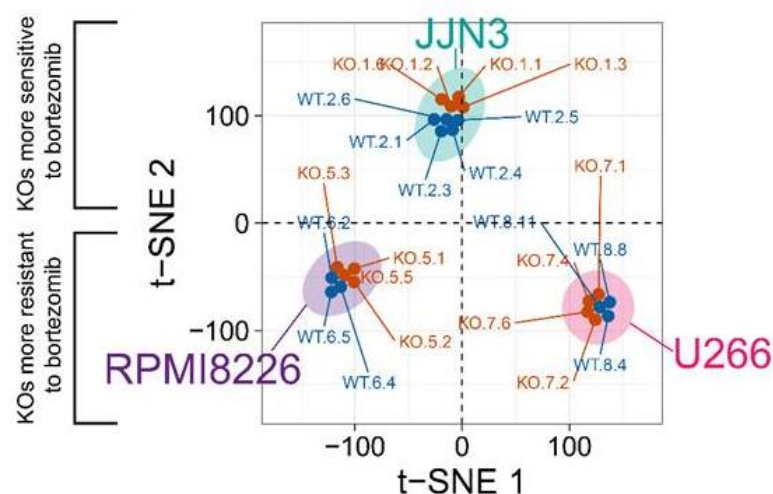
W każdej badanej linii komórkowej obserwowano wyraźny podział badanych klonów na dwie grupy. Klony kontrolne grupowały się razem podczas gdy klony o wyłączonej ekspresji *PSMD10* kumulowały się w odrębne skupiska.

Przeprowadzone analizy wykazały liczne zmiany w ekspresji genów. W trzech badanych liniach komórkowych wspólne zmiany ekspresji, istotnie statystycznie, wykazało 66 genów. Przeprowadzona analiza wyodrębniła 39 genów o obniżonej ekspresji i 27 genów o zwiększonej ekspresji, we wszystkich badanych liniach komórkowych (Rycina 30).



Rycina 30. Schemat przedstawiający zmiany ekspresji genów w odrębnie badanych liniach komórkowych.

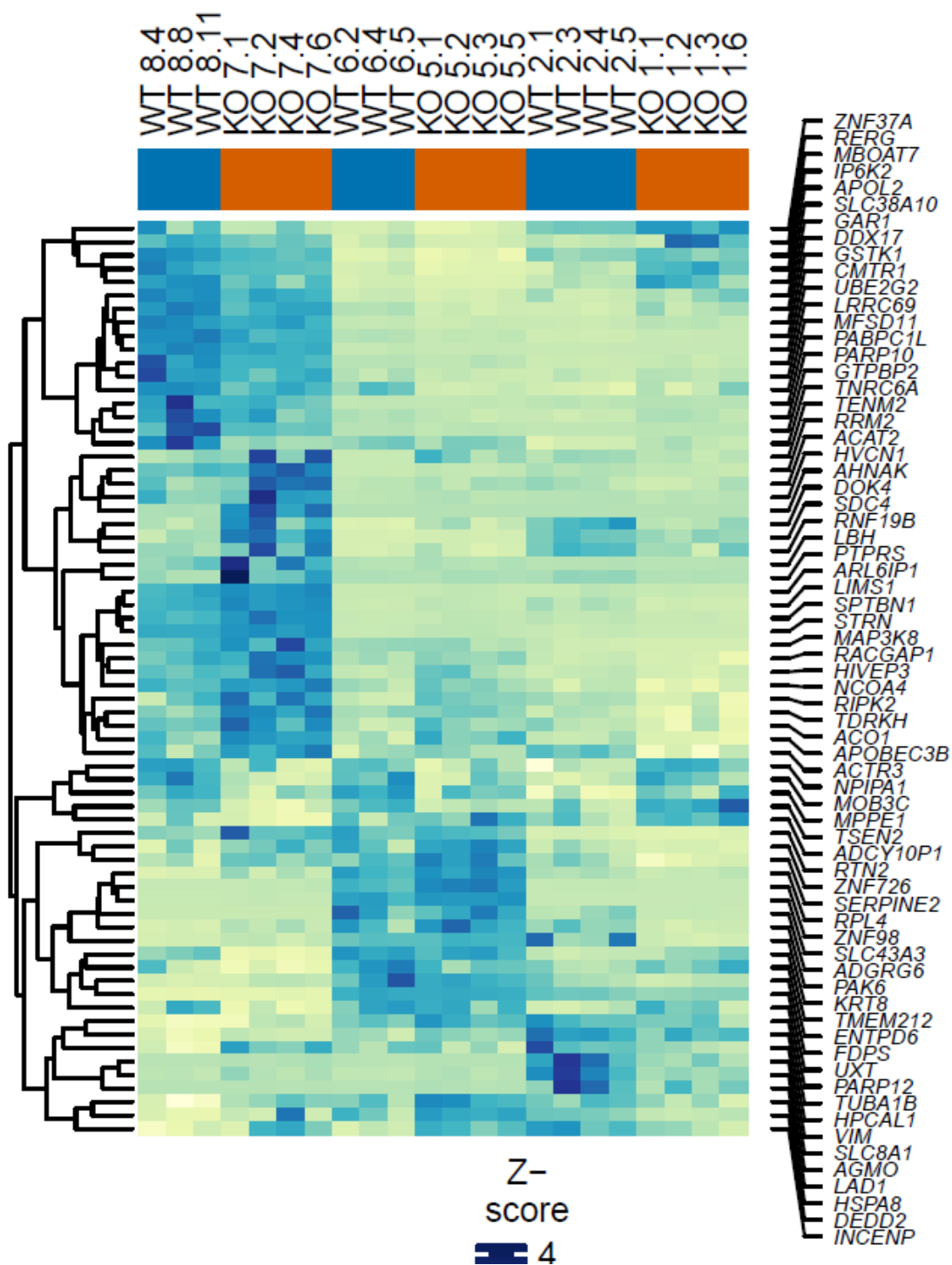
W celu wizualizacji przestrzennej i określenia podobieństwa między badanymi grupami zastosowano także drugą metodę redukcji wymiarów (t-SNE) (Rycina 31)



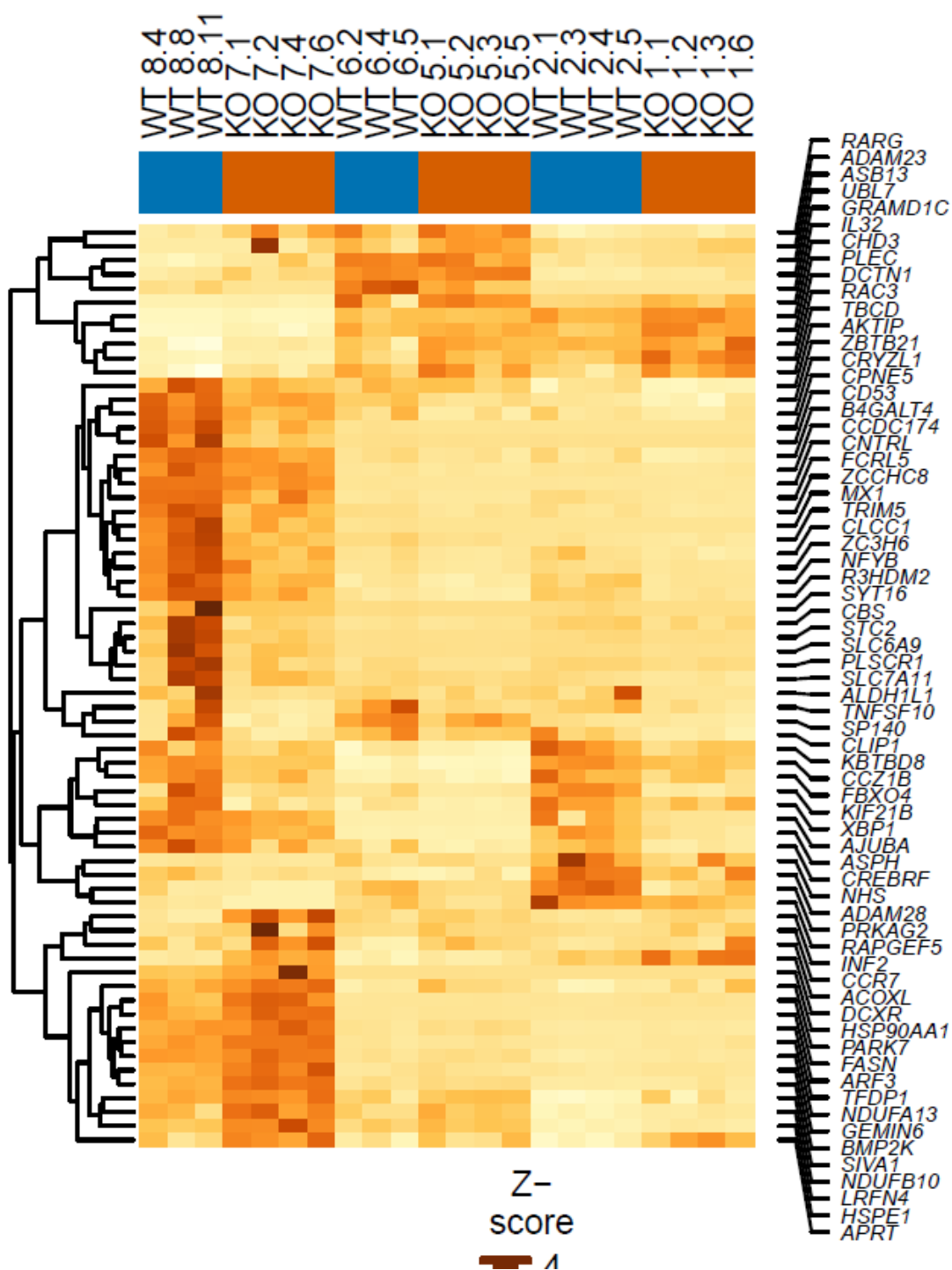
Rycina 31. Analiza wszystkich wyprowadzonych klonów z wykorzystaniem algorytmu redukcji wymiarowości t-SNE (t-distributed Stochastic Neighbor Embedding)

Analiza zbiorcza wszystkich trzech linii pokazuje wyraźny podział wyprowadzonych klonów na dwie grupy. Klony pozbawione gankyriny, charakteryzujące się zwiększoną aktywnością proteasomu, wykazują zwiększone podobieństwo do komórek kontrolnych linii JLN3.

Następnie sprawdzono zmiany ekspresji genów, występujące pomiędzy komórkami *PSMD10_WT*, a *PSMD10_KO*, we wszystkich trzech badanych liniach komórkowych (Rycina 32 i 33). Analizę przeprowadzono na dwa sposoby. W celu sprawdzenia za regulację jakich genów gankyrina odpowiada w sposób globalny, przeprowadzono analizę genów, których ekspresja ulega obniżeniu lub zwiększeniu we wszystkich badanych liniach komórkowych. Drugą analizę przeprowadzono ze względu na dotychczasowo obserwowany podział linii komórkowych na dwie grupy. Sprawdzeniu poddano geny, których ekspresja w badanych liniach jest odmienna, to znaczy ulega obniżeniu w jednej grupie podczas gdy w drugiej następuje jej wzrost.



Rycina 32. Mapa cieplna wskazujące zmiany w ekspresji genów, wywołane wyłączeniem ekspresji PSMD10. Geny o ekspresji zmienionej w odmienny sposób w badanych liniach komórkowych



Rycina 33. Mapy cieplne wskazujące zmiany w ekspresji genów, wywołane wyłączeniem ekspresji PSMD10. Geny o ekspresji zmienionej w tym samym kierunku w badanych liniach komórkowych

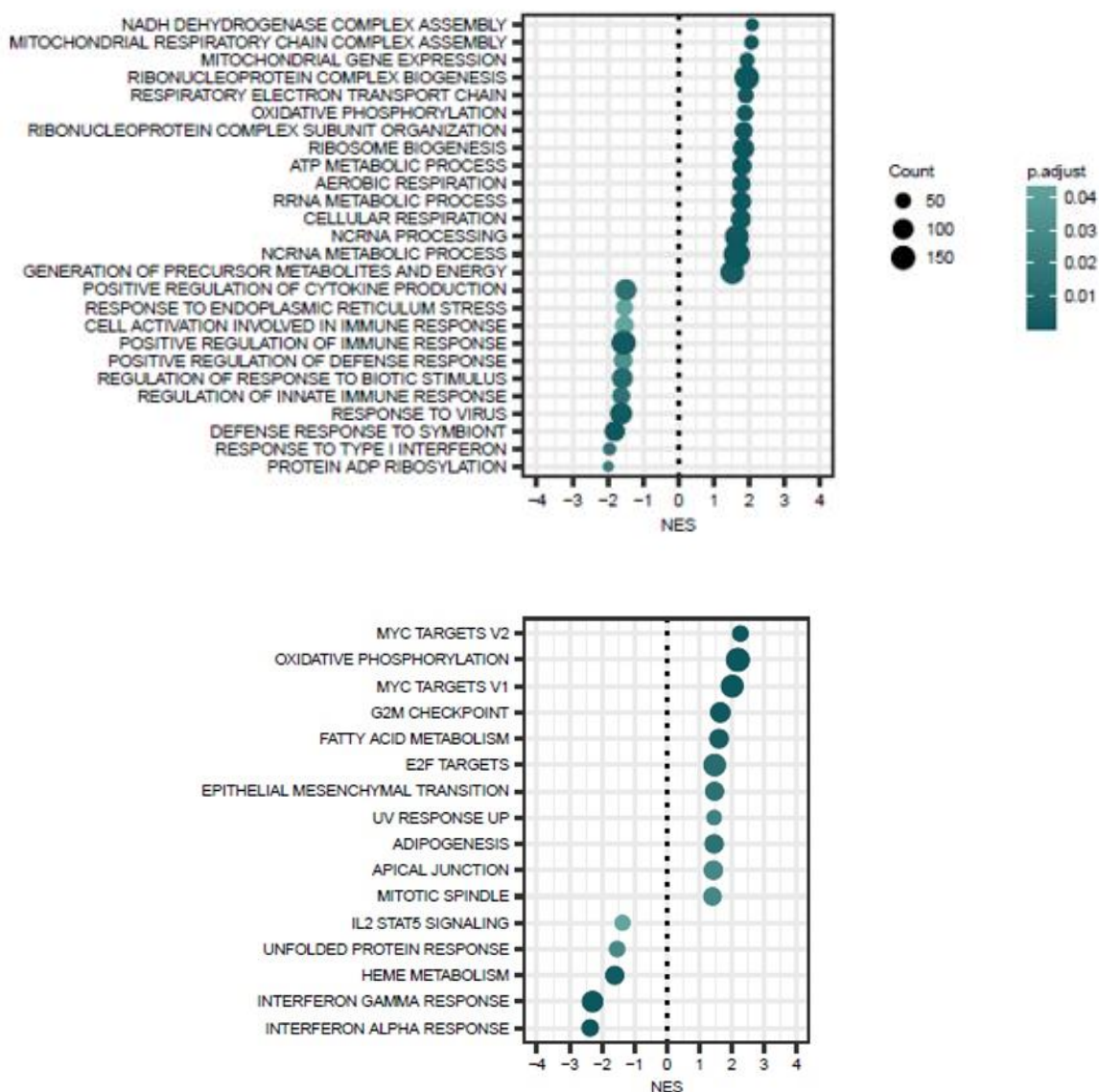
Zgodnie z przypuszczeniami, usunięcie gankyriny spowodowało dwoisty charakter zmian. Dotychczas obserwowany podział linii komórkowych na dwie grupy może wynikać z odmiennej regulacji ekspresji tych samych genów. Uzyskane wyniki wskazują liczne geny ulegające podwyższonej ekspresji w jednej linii, podczas gdy w pozostałych dwóch badanych liniach komórkowych ich ekspresja uległa obniżeniu.

Analizy wykazały szereg zmian w ekspresji genów zaangażowanych między innymi w biosyntezę glicyny i seryny. Dehydrogenaza 3-fosfoglicerynianowa (z ang. *3-phosphoglycerate dehydrogenase*, PHGDH) będąca pierwszym enzymem szlaku syntezy seryny oraz substratem do produkcji glicyny - pierwszej reakcji szlaku syntezy hemu, uległa obniżeniu we wszystkich badanych liniach komórkowych. Zmianie uległy również geny zaangażowane w regulację IRE-1/XBP-1 będącego reprezentantem najbardziej konserwatywnego szlaku odpowiedzi na stres ER. W tym przypadku obserwowane zmiany ponownie miały jednakowy charakter we wszystkich badanych liniach komórkowych przejawiający się obniżonym poziomem ekspresji genów XBP1 i IRE. W przypadku linii U266 obniżeniu uległy również zaangażowane w odpowiedź na stres ER czynniki transkrypcyjne ATF3 i ATF4.

Obserwowane zmiany potwierdzają zatem rolę gankyriny w pośredniej lub bezpośredniej regulacji ekspresji licznych genów.

3.2. Identyfikacja ścieżek i procesów biologicznych istotnie zmienionych po wyłączeniu ekspresji gankyriny w komórkach szpiczaka

Celem identyfikacji ścieżek i procesów biologicznych, w których regulację zaangażowana jest gankyrina przeprowadzono także analizy porównawcze GSEA (Rycina 34).



Rycina 34. Analiza porównawcza GSEA wykazująca zmiany w regulacji ścieżek sygnałowych powstałe na skutek wyłączenia ekspresji PSMD10

Zgodnie z hipotezą, dokonane analizy wykazały zmiany w wielu procesach biologicznych. Pozbawienie komórek gankyriny, doprowadziło do obniżenia genów z grupy odpowiedzi na niesfałdowane białka, czy odpowiedzi na stres siateczki śródplazmatycznej. Licznym zmianom uległy także geny kodujące białka zgrupowane jako procesy zaangażowane w pracę mitochondriów takie jak: fosforylacja oksydacyjna, metabolizm ATP, łańcuch transportu elektronów czy mitochondrialna ekspresja

VI Podsumowanie wyników

Przeprowadzone na uzyskanych w ramach niniejszej pracy modelach komórkowych badania wykazały wpływ gankyriny na kluczowe procesy, odgrywające istotną rolę w wielu aspektach biologii komórki. Zestawienie poszczególnych zmian wywołanych poprzez całkowite wyłączenie ekspresji *PSMD10* zostały przedstawione poniżej:

Tabela 18. Zestawienie zmian wywołanych w komórce poprzez całkowite wyłączenie ekspresji PSMD10 (PSMD10_KO) w stosunku do komórek kontrolnych (ns- brak istotności statystycznej)

	<u>Grupa 1</u>	<u>Grupa 2</u>
	RPMI_KO, U266_KO	JJN3_KO, L363_KO
Prolifercja	spadek	wzrost
Czas podwojenia populacji	wzrost	spadek
Synteza białek de novo	spadek	ns
Aktywność proteasomu	wzrost	ns
Poziom ekspresji podjednostek proteasmu	wzrost	ns
Wrażliwość na bortezomib	spadek	wzrost
Wrażliwość na karfilzomib	ns	ns
UPR	spadek	spadek
Odpowiedź na stres ER	spadek	spadek

Tabela 19. Zestawienie zmian wywołanych w komórce poprzez obniżenie poziomu ekspresji PSMD10 w stosunku do komórek kontrolnych

	U266TST209_SH4	JJN3TST209_SH4
Czas podwojenia populacji	ns	wzrost
Aktywność proteasomu	spadek	ns
Wrażliwość na bortezomib	wzrost	wzrost
Wrażliwość na karfilzomib	ns	ns

VII Dyskusja

W niniejszej pracy weryfikowano wcześniejsze badania dotyczące negatywnego wpływu wysokiego poziomu gankyriny na odpowiedź pacjentów z MM na leczenie z wykorzystaniem schematu VRD.

Pomimo, że w szpiczaku plazmocytowym poziom białka nie zawsze koreluje z poziomem ekspresji mRNA (Misiewicz-Krzeminska et al., 2018), dotychczas nie przeprowadzono badań takiej zależności w stosunku do *PSMD10*/gankyriny. Ze względu na brak dostępności do materiału biologicznego od wystarczająco dużej grupy pacjentów z MM, pozwalającego na oznaczenie w tej samej próbce zarówno poziomu ekspresji *PSMD10* jak i poziomu gankyriny, skorzystano z wyników ekspresji mRNA zebranych w ramach badania klinicznego CoMMpass. Uzyskane w ramach niniejszej pracy wyniki potwierdzają wcześniejsze obserwacje niekorzystnego wpływu wysokiego poziomu gankyriny na przeżycie pacjentów, zarówno wolne od wznowy jak i całkowite. Wskazuje to, że zarówno określanie poziomu ekspresji *PSMD10* jak i poziomu gankyriny jest bardzo dobrym potencjalnym biomarkerem niekorzystnego przeżycia. Stanowi to podstawę do opracowania potencjalnego testu diagnostycznego. Wysoki poziom gankyriny związany jest z niekorzystnym rokowaniem również u pacjentów z innymi nowotworami. Rolę gankyriny wykazano między innymi w hepatokarcynogenezie. W komórkach wątrobowych, cytoplazmatyczny, jądrowy oraz całkowity komórkowy poziom ekspresji gankyriny jest istotnie skorelowany z przerzutami wewnątrzwątrobowymi (Jing et al., 2014). Innym przykładem jest zaangażowanie gankyriny w rozwój nowotworu trzustki. Znacznie zwiększona ekspresja gankyriny powoduje wzmożoną proliferację komórek nowotworowych trzustki przyczyniając się do postępującej karcynogenezy (Meng et al., 2010). Gankyrina odgrywa istotną rolę również w rozwoju nowotworu piersi. W tym przypadku wysoka ekspresja tego białka wiąże się z przerzutami do węzłów chłonnych (Zhen et al., 2013).

Za potencjalnym wykorzystaniem gankyriny/*PSMD10* jako biomarkera w szpiczaku przemawia również fakt, że wpływ ten silnie zależy od rodzaju terapii. Dzięki przeprowadzonym analizom zaobserwowano, że poziom ekspresji *PSMD10* ma wpływ na długość czasu wolnego od wznowy w przypadku terapii kombinatorycznej opartej na lekach z grupy IMiD i bortezomibie.

Uzyskane wyniki pozwoliły na postawienie hipotezy, że gankyrina bierze udział w odpowiedzi na leczenie szpiczaka plazmocytoowego z wykorzystaniem leków przeciwszpiczakowych.

Aby zweryfikować postawioną hipotezę wyprowadzono dwa modele komórkowe. W wybranych liniach MM obniżono poziom ekspresji lub całkowicie wyłączono ekspresję *PSMD10* (*PSMD10_KO*). Przeprowadzone na uzyskanych modelach badania wykazały zależność między tempem proliferacji, a czasem podwojenia populacji we wszystkich badanych liniach komórkowych. Co bardziej interesujące, obserwowano wyraźny podział linii komórkowych na dwie grupy. Komórki RPMI_KO i U266_KO, o wysokim bazalnym poziomie gankyriny, charakteryzowały się obniżonym tempem proliferacji oraz przyspieszonym czasem podwojenia populacji w stosunku do komórek kontrolnych. Druga grupa ukazywała z kolei odwrotny efekt. Komórki L363_KO oraz JJN3_KO charakteryzowały się przyspieszoną proliferacją przy jednoczesnym obniżeniu czasu podwojenia populacji. Zmiany istotne statystycznie obserwowano również w przypadku komórek linii JJN3TST209_sh. Obniżenie poziomu gankyriny skutkowało w tym przypadku przyspieszonym czasem podwojenia populacji w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Obserwowane zmiany miały zatem odmienny charakter do zmian wywołanych całkowitym wyłączeniem ekspresji *PSMD10*.

Dotychczas dostępne dane literaturowe potwierdzają wpływ *PSMD10* na tempo namnażania komórek za pośrednictwem mikroRNA (miRNA) w wielu typach nowotworów. Poprzez regulację ekspresji genów miRNA mają istotny wpływ na ich występowanie i rozwój. Wykazano między innymi, że zwiększona regulacja miR-214 znacząco zmniejsza proliferację komórek i promowała apoptozę komórek oraz zatrzymanie cyklu komórkowego w liniach komórkowych raka brodawkowego tarczycy w warunkach in vitro. Ponadto wykazano, że miR-214 negatywnie reguluje ekspresję *PSMD10* w komórkach szpiczaka. (Misiewicz-Krzeminska et al., 2013). Wyłączenie ekspresji *PSMD10* zmniejszyło tworzenie klonów komórek raka brodawkowego tarczycy, migrację i inwazję (Liu et al., 2018)

Innym przykładem są komórki raka jelita grubego (z ang. *Colorectal cancer cells*, CRC) gdzie poprzez regulację poziomu *PSMD10* wpływało na działanie hsa-miR-1248. Stwierdzono, że Hsa-miR-1248 zmniejsza proliferację komórek CRC i przerzuty poprzez hamowanie *PSMD10* (Wang et al., 2022).

Związek pomiędzy gankyriną a stopniem namnażania komórek wykazano również w komórkach raka dróg żółciowych. W tym przypadku MALAT1 (ang. Metastasis Associated

Lung Adenocarcinoma Transcript 1) należący do long non-coding RNA (lncRNA, splicingowany długi niekodujący RNA) konkurencyjnie wiąże się z miR-188-5p w celu zwiększenia translacji mRNA i ekspresji białka PSMD10, ułatwiając w ten sposób inwazję i migrację komórek raka dróg żółciowych (Yin et al., 2023).

Komórki szpiczaka charakteryzują się wysoką aktywnością proteasomu. Owa nadaktywność związana jest z nieustającą produkcją ogromnych ilości białka. Aby uporać się z liczbą nieprawidłowych przeciwciał komórki wykorzystują UPS. Poprzez kompleks ligazy, cząsteczki ubikwityny znakują białko, które jest następnie kierowane do proteasomu i cięte na oligopeptydy (Nikesitch & Ling, 2016).

Zarówno ludzka gankyrina jak i drożdżowe białko Nas6, będące homologiem gankyriny, są zaangażowane w oddziaływanie z proteasomem. Nas6 w drożdżach pomaga regulować aktywność proteasomalną, z kolei gankyrina jest białkiem pomocniczym wymagany do złożenia proteasomu. Homologia pomiędzy Nas6 u drożdży i gankyriną u człowieka wynosi 30-40% w kluczowych regionach funkcjonalnych, sugerując silną ewolucyjną konserwację w celu utrzymania funkcji proteasomalnych (Padmanabhan et al., 2004; Nemec et al., 2019 J. Li & Guo, 2010). Założono zatem hipotezę, że gankyrina może regulować aktywność proteasomu w komórkach MM. Celem weryfikacji postawionego założenia sprawdzono poziom aktywności proteasomu w obu wyprowadzonych modelach komórkowych. Wyłączenie ekspresji *PSMD10* skutkowało ponownym podziałem badanych linii na dwie grupy. Komórki RPMI_KO i U266_KO charakteryzowały się wzrostem wszystkich trzech aktywności proteasomu w stosunku do komórek kontrolnych. Zmian nie obserwowano natomiast w przypadku komórek L363_KO oraz JJN3_KO. W przypadku komórek linii U266TST209 obniżenie poziomu gankyriny spowodowało obniżenie aktywności podjednostek proteasomu ponownie ukazując odmienny charakter do zmian wywołanych całkowitym wyłączeniem ekspresji *PSMD10*. Wzrost ekspresji wszystkich badanych podjednostek proteasomu- w przypadku linii U266, wskazał zależność aktywności proteasomu od poziomu ekspresji genów kodujących jego podjednostki. Opisywaną zależność potwierdził również fakt braku występowania analogicznych różnic w przypadku linii JJN3, gdzie zmian aktywności poszczególnych podjednostek proteasomu nie obserwowano.

Za aktywację transkrypcji genów docelowych, w tym tych kodujących podjednostki proteasomu może odpowiadać Nrfl. Zarówno Nrfl, jak i Nrf2 są członkami rodziny czynników transkrypcyjnych Cap'n'Collar posiadającymi domenę basic-leucine zipper (bZIP), która wiąże

elementy odpowiedzi antyoksydacyjnej (ARE). Co ciekawe, promotory kilku genów jednostek proteasomalnych zawierają elementy ARE, co zwiększa prawdopodobieństwo, że białka Nrf biorą udział w zwiększaniu aktywności proteasomów w warunkach stresowych. Dodatkowo wiadomo, że Nrf2 jest ściśle regulowany przez Keap1 oddziałujący z gankyriną (Wang & Cheng, 2017).

Inny możliwy mechanizm zależnej od gankyriny regulacji ekspresji podjednostek proteasomu oraz jego aktywności może być związany ze zmianami w aktywności podjednostki $\beta 5$ wykazującej aktywność chymotrypsynową. Rezultaty dotychczas opublikowanych badań naukowych wykazały, że nadekspresja podjednostki $\beta 5$ proteasomu w różnych liniach komórkowych prowadzi do wzrostu całkowitej aktywności proteasomu, poziomu ekspresji genów kodujących podjednostki proteasomu i jego wydajniejszego składania (Chondrogianni et al., 2005). Zgodnie z wynikami badań naszego zespołu, wyłączenie ekspresji gankyriny w modelu komórkowym prowadzi do zmian ekspresji podjednostki $\beta 5$ na poziomie białka (wyniki nieopublikowane), a także na poziomie mRNA i aktywności proteolitycznej, co wykazano w niniejszej pracy. Co więcej, pokazane zmiany ekspresji podjednostki $\beta 5$ zależne od gankyriny korelują ze zmianą aktywności całkowitej proteasomu. Nie można zatem wykluczyć, że gankyrina moduluje aktywność i składanie proteasomu poprzez regulację ekspresji podjednostki $\beta 5$.

Aktywność proteasomu jest w MM silnie skorelowana z odpowiedzią na inhibitory proteasomu (Gandolfi et al., 2017). Wykazano, że różnicowanie komórek plazmatycznych powoduje spadek ekspresji i aktywności proteasomu prowadząc do zwiększonej wrażliwości na PI. Opublikowane dane sugerują zatem, że wrażliwość niektórych komórek MM może wynikać ze zmniejszonej zdolności proteasomalnej lub zwiększonego obciążenia proteasomu (Bianchi et al., 2009).

Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy analizy potwierdziły związek *PSMD10* z odpowiedzią na bortezomib. Komórki z wyłączoną ekspresją *PSMD10* w liniach RPMI i U266 wykazywały zwiększoną oporność na lek w stosunku do komórek kontrolnych, podczas gdy w przypadku linii JJN3 i L363 komórki pozbawione gankyriny cechowała większa wrażliwość na jego działanie.

Wśród mechanizmów odpowiedzialnych za wysoki poziom gankyriny w komórkach zidentyfikowano obniżony poziom micro-RNA 214, charakterystyczny dla większości MM niezależnie od podłoża cytogenetycznego (Gutiérrez et al., 2010). Przytoczone wyniki

wskazują zatem na utrzymywanie się tej cechy w komórkach. Mając to na uwadze, celem symulacji długotrwałej zmiany w poziomie gankyriny, możliwej do zaobserwowania w komórkach pierwotnych, zastosowano długotrwałe obniżenie poziomu ekspresji *PSMD10*. Również w tym przypadku zaobserwowano zmiany istotne statystycznie w odpowiedzi na bortezomib. Tym razem powstałe zmiany miały jednak charakter odmienny w porównaniu do zmian wywołanych całkowitym wyłączeniem ekspresji *PSMD10*. Dwutygodniowe obniżenie poziomu gankyriny skutkowało wzrostem wrażliwości odpowiedzi na lek z grupy PI.

Obserwowana w ramach niniejszej pracy odmienność obserwacji pomiędzy modelami komórkowymi może wynikać ze sposobu edycji genów. Evers i współpracownicy przeprowadzili badania porównawcze pokazujące, że system CRISPR przewyższa technologie oparte na shRNA w przypadku identycznych zestawów genów. Było to spowodowane obecnością bardziej funkcjonalnych konstruktów a także pozornym brakiem niespecyficznych celów skutkujących mniejszym prawdopodobieństwem błędnie zinterpretowanych wyników oraz lepszą spójnością między liniami komórkowymi (Evers et al., 2016).

Wiele przypadków odmienności w zachowaniu komórek, obserwowanych po wyłączeniu i wyciszeniu ekspresji genów odnotowano w badaniach nad danio pręgowanym. Larwy z wyłączoną ekspresją genu *CHD2* charakteryzowały się zmniejszoną pigmentacją w stosunku do larw kontrolnych podczas gdy u danio pręgowanego z obniżonym poziomem ekspresji *CHD2* obserwowano odwrotny efekt. Co więcej, wskaźnik deformacji *CHD2_KD* był wyższy niż w przypadku mutantów *CHD2_KO* (T. Li et al., 2024).

Same różnice w odpowiedzi na bortezomib mogą być wywołane HIF-1 α -czynnikiem o potwierdzonym zaangażowaniu w odpowiedź na PI w MM. Udowodniono, że stabilne hamowanie HIF-1 α w komórkach MM uwrażliwia komórki na terapeutyczne działanie bortezomibu (Maiso et al., 2015b). Główny regulator transkrypcji odpowiedzi komórkowej na niedotlenienie promuje przeżycie komórek nowotworowych i prowadzi do chemiooporności poprzez modulację metabolizmu komórkowego, zwiększoną zdolność naprawy DNA, hamowanie apoptozy czy stymulację procesu, w którym wewnątrzkomórkowe struktury błonowe sekwestrują białka i składniki wewnątrzkomórkowe w celu ich degradacji i recyklingu zwanego autofagią (Xia et al., 2018). Również jako mechanizm ochronny obserwuje się indukcję procesu autofagii w komórkach MM traktowanych bortezomibem, a jej zahamowanie zaproponowano jako sposób na uwrażliwienie komórek na terapię tym związkiem (Vogl et al., 2014) (Chen et al., 2023). Idąc dalej, na przykładzie HCC wykazano pozytywną regulację procesu autofagii przez gankyrinę poprzez stymulację ekspresji i oddziaływania białko-białko

z ATG7, białkiem pełniącym kluczową rolę w koniugacji i elongacji błon autofagosomów (Luo et al., 2016). Przytoczone dane literaturowe mogą wskazywać na analogiczne interakcje w MM. Zgodnie z powyższym, obserwowane różnice w odpowiedzi komórek MM na działanie bortezomibu w zależności od ekspresji gankyriny mogą wynikać ze zmian w aktywacji procesu autofagii w tych komórkach.

Aby wykazać, na jakie procesy gankyrina wpływa w komórkach MM z obu grup, dokonano analizy danych uzyskanych na drodze sekwencjonowania RNA-seq. Wykazały one różnice w ekspresji genów we wszystkich trzech badanych liniach komórkowych.

Analizy GSEA wykazały zaangażowanie gankyriny w liczne procesy komórkowe, w tym odpowiedź na stres siateczki śródplazmatycznej oraz odpowiedź na niesfałdowane białka. Wspomniane szlaki są związane z wrażliwością na leki z grupy inhibitorów proteasomu. Usunięcie gankyriny spowodowało dwoisty charakter zmian. Liczne geny uległy podwyższonej ekspresji w jednej linii komórkowej podczas gdy w pozostałych dwóch badanych liniach komórkowych ich ekspresja uległa obniżeniu. Dotychczas obserwowany podział linii komórkowych na dwie grupy może zatem wynikać z odmiennej regulacji ekspresji tych samych genów. Wśród potencjalnych genów zaangażowanych w omawiane zmiany mogą znajdować się ATF3 i ATF4. Hamowanie proteasomu aktywuje stres ER, powodując zwiększoną ekspresję ATF4, a następnie regulację ATF3 (Obeng et al., 2006b). Dodatkowo niższa ekspresja ATF3 i ATF4 koreluje z krótszym przeżyciem wolnym od progresji u pacjentów z MM otrzymujących bortezomib w połączeniu z deksametazonem. Przeprowadzone w ramach dotychczas opublikowanych badań analizy wykazały, że ATF transaktywują geny kodujące proapoptotyczne czynniki transkrypcyjne. Wyciszenie ekspresji ATF3 lub ATF4 doprowadziło do oporności na leczenie bortezomibem (Narita et al., 2015). Uzyskane w ramach niniejszej pracy wyniki wyraźnie ukazują, że wyłączenie ekspresji gankyriny w linii komórkowej U266, o wysokim poziomie gankyriny doprowadziło do obniżenia poziomu ekspresji zarówno ATF3 jak i ATF4. Podobnych zmian nie zaobserwowano w linii JJN3.

Zaangażowanie gankyriny w aktywację stresu ER zostało wykazane w komórkach nowotworowych wątroby (HCC). Fu Yang i wsp. udowodnili, że gankyrina zwiększa aktywację szlaku UPR w celu promowania wzrostu guza i hamowania apoptozy w HCC (Yang et al., 2011). Ekspresja markerów stresu ER i białek związanych z apoptozą była znacząco tłumiona po obniżeniu ekspresji *PSMD10* (Xiao et al., 2021).

Kolejnym możliwym wyjaśnieniem obserwowanych w ramach niniejszej pracy zmian mogą być zmienione poziomy ekspresji IRE1 i ATF6 promujących transkrypcję genów docelowych UPR (Albornoz et al., 2019). IRE1 będące białkiem transmembranowym rezydującym w ER odpowiada za generowanie aktywnej formy czynnika transkrypcyjnego XBP1- XBP1s (spliced) (Yoshida et al., 2001). XBP1s zwiększa z kolei ekspresję genów UPR zaangażowanych w kontrolę jakości białek (Lee et al., 2003) w konsekwencji prowadząc do oporności na bortezomib (Leung-Hagesteijn et al., 2013)

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy potwierdzają udział *PSMD10* w kluczowych procesach życiowych komórki, jednocześnie wskazując zależność pomiędzy poziomem ekspresji gankyriny a stopniem zachodzących w komórce zmian. Obserwowane pomiędzy stosowanymi modelami komórkowymi różnice świadczą o istotności roli pełnionej przez gankyrinę. W ramach niniejszej pracy wykazano zaangażowanie gankyriny w funkcjonowanie komórki i jej niezbędną obecność. Na skutek całkowitego wyłączenia ekspresji *PSMD10* zachodzą nieodwracalne zmiany, wywołane prawdopodobnie przez przeprogramowanie komórki.

Inną interesującą kwestią obserwowana w ramach niniejszej pracy są różnice w odpowiedzi na dwa leki należące do grupy inhibitorów proteasomu. Zarówno w modelu komórkowym uzyskanym poprzez wyłączenie ekspresji gankyriny jak i w modelu komórkowym o obniżonym poziomie ekspresji *PSMD10* obserwujemy różnice jedynie w odpowiedzi na bortezomib. Żadnych różnic nie obserwowano w przypadku drugiego z PI-karfilzomibu.

Analizy danych pacjentów z bazy Compass ukazały istotny statystycznie związek wysokiego poziomu gankyriny z gorszym rokowaniem wśród pacjentów leczonych zarówno z wykorzystaniem bortezomibu jak i karfilzomibu. Należy jednak zauważyć, że grupa pacjentów otrzymujących terapię opartą na karfilzombie była znacznie mniej liczna co mogło wpłynąć na finalny efekt badania. Różnica w odpowiedzi na karfilzomib pomiędzy pacjentami a liniami komórkowymi może wynikać z czynników środowiskowych pochodzących z mikrośrodowiska szpiku. Komórki MM wykazują silną interakcję z mikrośrodowiskiem szpiku kostnego (z ang. *bone marrow environment*, BMME). BMME charakteryzuje się obecnością wielu typów komórek, takich jak osteoklasty i osteoblasty, komórki odpornościowe, mezenchymalne komórki zrębu i wiele innych. Wszystkie te składniki przyczyniają się do promowania proliferacji komórek plazmatycznych i przekazywania sygnałów do komórek nowotworowych, co skutkuje opornością na leczenie. Jednym z czynników przyczyniających się do oporności na

leki i progresji choroby jest uwalnianie egzosomów przez różne składniki BMME (Pandian et al., 2023). Wśród czynników pochodzących z BMME, które mogą wpływać na wrażliwość na PI w MM, znajdują się mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego (BM-MSC). BM-MSC produkują duże ilości rozpuszczalnych czynników, takich jak $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6, IL-8 i IGF-1. Stężenie tych cytokin jest zwiększone w MM w porównaniu do zdrowych dawców. Podobnie, MM odporne na bortezomib miały wyższą ilość IL-8 w porównaniu do wrażliwych MM (Iannozzi et al., 2022)

Brak zmian we wrażliwości na karfilzomib obserwowany w wyprowadzonych modelach komórkowych może znaleźć wytłumaczenie w odmiennym sposobie działania oraz budowie leku. Dostępne dane naukowe donoszą, że oprócz nieodwracalnego sposobu wiązania karfilzomibu, cząpeczka morfolinowa obecna na karfilzomibie, ale nie w bortezomibie znacząco zwiększa kotwiczenie do podjednostek $\beta 5$ i $\beta 6$ i poprawia siłę działania karfilzomibu. Barrio i wsp. wykazali utratę zdolności do hamowania aktywności podjednostki $\beta 5$ zależną od obecności mutacji PSMB5 w przypadku traktowania komórek MM bortezomibem. Odwrotny efekt zaobserwowano w przypadku karfilzomibu. Mutacja A27P w PSMB5 zapewniała bardzo niewielką ochronę przed hamowaniem przez karfilzomib, a ochronne działanie A20T może zostać przezwyciężone przy wyższych stężeniach leku (Barrio et al., 2019)

Prezentowane w ramach niniejszej pracy wyniki dostarczają istotnych informacji na temat potencjalnych sposobów wykorzystania gankyriny jako narzędzia do walki z MM. Poprzez długotrwałe obniżenie poziomu *PSMD10* w liniach komórkowych o wysokim wyjściowym poziomie gankyriny doprowadzono do zwiększenia ich wrażliwości na bortezomib. Wyniki uzyskane na omawianym modelu komórkowym mogą mieć przełożenie na pacjentów charakteryzujących się wysokim poziomem *PSMD10*. Wykazanie związku pomiędzy gankyriną a odpowiedzią na bortezomib może stanowić zatem nowy sposób kwalifikacji pacjentów z NDMM do sposobu leczenia. Dzięki zastosowaniu medycyny spersonalizowanej gankyrina może stać się czynnikiem prognostycznym i przyczynić się do polepszenia jakości i długości życia pacjentów ze zdiagnozowanym MM.

VIII Wnioski

Celem niniejszej pracy doktorskiej była ocena roli gankyriny w odpowiedzi na leczenie szpiczaka plazmocytoowego, z wykorzystaniem najczęściej stosowanych klas leków przeciwszpiczakowych. Dzięki wykonanym badaniom wyciągnięto następujące wnioski:

- Gankyrina wpływa na podstawowe procesy biologiczne komórek MM takie jak proliferacja i synteza białek *de novo*;
- Gankyrina reguluje aktywność proteasomu w komórkach szpiczaka;
- Gankyrina jest zaangażowana w odpowiedź komórek szpiczaka na bortezomib
- Zmiany w biologii komórki szpiczaka oraz ich odpowiedzi na bortezomib wywołane zmianą poziomu ekspresji *PSMD10* są uzależnione od wyjściowego poziomu gankyriny w komórkach;
- Różna wrażliwość komórek z niedoborem gankyriny na bortezomib wynika z aktywacji ścieżek sygnałowych związanych z UPR i odpowiedzią na stres ER.

IX Bibliografia

- Albornoz, N., Bustamante, H., Soza, A., & Burgos, P. (2019). Cellular Responses to Proteasome Inhibition: Molecular Mechanisms and Beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14). <https://doi.org/10.3390/ijms20143379>
- Aronson, J. K., & Ferner, R. E. (2017). Biomarkers-A General Review. *Current Protocols in Pharmacology*, 76, 9.23.1-9.23.17. <https://doi.org/10.1002/cpph.19>
- Bai, Y., & Su, X. (2021). Updates to the drug-resistant mechanism of proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*, 17(1), 29–35. <https://doi.org/10.1111/ajco.13459>
- Bard, J. A. M., Goodall, E. A., Greene, E. R., Jonsson, E., Dong, K. C., & Martin, A. (2018). Structure and Function of the 26S Proteasome. *Annual Review of Biochemistry*, 87(1), 697–724. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-011931>
- Barrio, S., Stühmer, T., Da-Viá, M., Barrio-Garcia, C., Lehnert, N., Besse, A., Cuenca, I., Garitano-Trojaola, A., Fink, S., Leich, E., Chatterjee, M., Driessen, C., Martinez-Lopez, J., Rosenwald, A., Beckmann, R., Bargou, R. C., Braggio, E., Stewart, A. K., Raab, M. S., ... Kortüm, K. M. (2019). Spectrum and functional validation of PSMB5 mutations in multiple myeloma. *Leukemia*, 33(2), 447–456. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0216-8>
- Bazzaro, M., Lee, M. K., Zoso, A., Stirling, W. L. H., Santillan, A., Shih, I.-M., & Roden, R. B. S. (2006). Ubiquitin-Proteasome System Stress Sensitizes Ovarian Cancer to Proteasome Inhibitor-Induced Apoptosis. *Cancer Research*, 66(7), 3754–3763. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2321>
- Bianchi, G., Oliva, L., Cascio, P., Pengo, N., Fontana, F., Cerruti, F., Orsi, A., Pasqualetto, E., Mezghrani, A., Calbi, V., Palladini, G., Giuliani, N., Anderson, K. C., Sitia, R., & Cenci, S. (2009). The proteasome load versus capacity balance determines apoptotic sensitivity of multiple myeloma cells to proteasome inhibition. *Blood*, 113(13), 3040–3049. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-08-172734>
- Bozic, B., Rutner, J., Zheng, C., Ruckser, R., Selimi, F., Racz, K., Köcher, M., Tatzreiter, G., & Sebesta, C. (2021). Advances in the Treatment of Relapsed and Refractory Multiple Myeloma in Patients with Renal Insufficiency: Novel Agents, Immunotherapies and Beyond. *Cancers*, 13(20), 5036. <https://doi.org/10.3390/cancers13205036>
- Bruzzese, A., Martino, E. A., Vigna, E., Iaccino, E., Mendicino, F., Lucia, E., Olivito, V., Filippelli, G., Neri, A., Morabito, F., & Gentile, M. (2023). Elotuzumab in multiple myeloma. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 23(1), 7–10. <https://doi.org/10.1080/14712598.2022.2145882>
- Budenholzer, L., Cheng, C. L., Li, Y., & Hochstrasser, M. (2017). Proteasome Structure and Assembly. *Journal of Molecular Biology*, 429(22), 3500–3524. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.05.027>
- Çetin, G., Klafack, S., Studencka-Turski, M., Krüger, E., & Ebstein, F. (2021). The Ubiquitin-Proteasome System in Immune Cells. *Biomolecules*, 11(1), 60. <https://doi.org/10.3390/biom11010060>
- Chapman, M. A., Lawrence, M. S., Keats, J. J., Cibulskis, K., Sougnez, C., Schinzel, A. C., Harview, C. L., Brunet, J.-P., Ahmann, G. J., Adli, M., Anderson, K. C., Ardlie, K. G., Auclair, D., Baker, A., Bergsagel, P. L., Bernstein, B. E., Drier, Y., Fonseca, R., Gabriel, S. B., ... Golub, T. R. (2011). Initial

- genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*, 471(7339), 467–472.
<https://doi.org/10.1038/nature09837>
- Chen, J., Cao, W., Huang, X., Chen, Q., Ye, S., Qu, J., Liu, Y., Guo, X., Yao, S., Zhang, E., He, J., Li, A., Yang, L., & Cai, Z. (2023). TRIM21 enhances bortezomib sensitivity in multiple myeloma by halting prosurvival autophagy. *Blood Advances*, 7(19), 5752–5770.
<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022008241>
- Chesi, M., & Bergsagel, P. L. (2013). Molecular pathogenesis of multiple myeloma: basic and clinical updates. *International Journal of Hematology*, 97(3), 313–323. <https://doi.org/10.1007/s12185-013-1291-2>
- Chondrogianni, N., Tzavelas, C., Pemberton, A. J., Nezis, I. P., Rivett, A. J., & Gonos, E. S. (2005). Overexpression of Proteasome $\beta 5$ Assembled Subunit Increases the Amount of Proteasome and Confers Ameliorated Response to Oxidative Stress and Higher Survival Rates. *Journal of Biological Chemistry*, 280(12), 11840–11850. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413007200>
- Cohen, A. D., Parekh, S., Santomasso, B. D., Gállego Pérez-Larraya, J., van de Donk, N. W. C. J., Arnulf, B., Mateos, M.-V., Lendvai, N., Jackson, C. C., De Braganca, K. C., Schecter, J. M., Marquez, L., Lee, E., Cornax, I., Zudaire, E., Li, C., Olyslager, Y., Madduri, D., Varsos, H., ... Jagannath, S. (2022). Incidence and management of CAR-T neurotoxicity in patients with multiple myeloma treated with ciltacabtagene autoleucel in CARTITUDE studies. *Blood Cancer Journal*, 12(2), 32.
<https://doi.org/10.1038/s41408-022-00629-1>
- Collins, G. A., & Goldberg, A. L. (2017). The Logic of the 26S Proteasome. *Cell*, 169(5), 792–806.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.023>
- Crawford, L. J., Walker, B., & Irvine, A. E. (2011). Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 5(2), 101–110. <https://doi.org/10.1007/s12079-011-0121-7>
- Curran, M. P., & McKeage, K. (2009). Bortezomib. *Drugs*, 69(7), 859–888.
<https://doi.org/10.2165/00003495-200969070-00006>
- Dick, F. A., Goodrich, D. W., Sage, J., & Dyson, N. J. (2018). Non-canonical functions of the RB protein in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 18(7), 442–451. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0008-5>
- El Yaagoubi, O. M., Oularbi, L., Bouyahya, A., Samaki, H., El Antri, S., & Aboudkhil, S. (2021). The role of the ubiquitin-proteasome pathway in skin cancer development: 26S proteasome-activated NF- κ B signal transduction. *Cancer Biology & Therapy*, 22(10–12), 479–492.
<https://doi.org/10.1080/15384047.2021.1978785>
- Evers, B., Jastrzebski, K., Heijmans, J. P. M., Grønrum, W., Beijersbergen, R. L., & Bernards, R. (2016). CRISPR knockout screening outperforms shRNA and CRISPRi in identifying essential genes. *Nature Biotechnology*, 34(6), 631–633. <https://doi.org/10.1038/nbt.3536>
- Fabris, S., Ronchetti, D., Agnelli, L., Baldini, L., Morabito, F., Bicciato, S., Basso, D., Todoerti, K., Lombardi, L., Lambertenghi-Deliliers, G., & Neri, A. (2007). Transcriptional features of multiple myeloma patients with chromosome 1q gain. *Leukemia*, 21(5), 1113–1116.
<https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404616>
- Gandolfi, S., Laubach, J. P., Hideshima, T., Chauhan, D., Anderson, K. C., & Richardson, P. G. (2017). The proteasome and proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Cancer Metastasis Reviews*, 36(4), 561–584. <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9707-8>

- Gourzones-Dmitriev, C., Kassambara, A., Sahota, S., Rème, T., Moreaux, J., Bourquard, P., Hose, D., Pasero, P., Constantinou, A., & Klein, B. (2013). DNA repair pathways in human multiple myeloma. *Cell Cycle*, 12(17), 2760–2773. <https://doi.org/10.4161/cc.25951>
- Gutiérrez, N. C., Sarasquete, M. E., Misiewicz-Krzeminska, I., Delgado, M., De Las Rivas, J., Ticona, F. V., Fermián, E., Martín-Jiménez, P., Chillón, C., Risueño, A., Hernández, J. M., García-Sanz, R., González, M., & San Miguel, J. F. (2010). Deregulation of microRNA expression in the different genetic subtypes of multiple myeloma and correlation with gene expression profiling. *Leukemia*, 24(3), 629–637. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.274>
- Herrero, A., Rojas, E., Misiewicz-Krzeminska, I., Krzeminski, P., & Gutiérrez, N. (2016). Molecular Mechanisms of p53 Deregulation in Cancer: An Overview in Multiple Myeloma. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 2003. <https://doi.org/10.3390/ijms17122003>
- Hideshima, T., Mitsiades, C., Akiyama, M., Hayashi, T., Chauhan, D., Richardson, P., Schlossman, R., Podar, K., Munshi, N. C., Mitsiades, N., & Anderson, K. C. (2003). Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. *Blood*, 101(4), 1530–1534. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-08-2543>
- Hong, T., Hogger, A. C., Wang, D., Pan, Q., Gansel, J., Engleitner, T., Öllinger, R., Gschwend, J. E., Rad, R., & Nawroth, R. (2024). CDK4/6 inhibition initiates cell cycle arrest by nuclear translocation of RB and induces a multistep molecular response. *Cell Death Discovery*, 10(1), 453. <https://doi.org/10.1038/s41420-024-02218-6>
- Iannozzi, N. T., Marchica, V., Toscani, D., Burroughs García, J., Giuliani, N., & Storti, P. (2022). Molecular Features of the Mesenchymal and Osteoblastic Cells in Multiple Myeloma. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24). <https://doi.org/10.3390/ijms232415448>
- Jing, H., Zhang, G., Meng, L., Meng, Q., Mo, H., & Tai, Y. (2014). Gradually elevated expression of Gankyrin during human hepatocarcinogenesis and its clinicopathological significance. *Scientific Reports*, 4, 5503. <https://doi.org/10.1038/srep05503>
- Kanabar, D., & Muth, A. (2020). Exploring gankyrin's role in cancer development and its potential as a therapeutic target. *Future Medicinal Chemistry*, 12(18), 1603–1606. <https://doi.org/10.4155/fmc-2020-0200>
- Kashyap, D., Varshney, N., Parmar, H. S., & Jha, H. C. (2022a). Gankyrin: At the crossroads of cancer diagnosis, disease prognosis, and development of efficient cancer therapeutics. *Advances in Cancer Biology - Metastasis*, 4, 100023. <https://doi.org/10.1016/j.adcanc.2021.100023>
- Khalesi, N., Korani, S., Korani, M., Johnston, T. P., & Sahebkar, A. (2021). Bortezomib: a proteasome inhibitor for the treatment of autoimmune diseases. *Inflammopharmacology*, 29(5), 1291–1306. <https://doi.org/10.1007/s10787-021-00863-2>
- Kuhn, D. J., Chen, Q., Voorhees, P. M., Strader, J. S., Shenk, K. D., Sun, C. M., Demo, S. D., Bennett, M. K., van Leeuwen, F. W. B., Chanan-Khan, A. A., & Orlowski, R. Z. (2007). Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. *Blood*, 110(9), 3281–3290. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-065888>
- Lai, X., Huang, C., Nie, X., Chen, Q., Tang, Y., Fu, X., Lin, Y., Nie, C., Xu, X., Wang, X., Chen, R., & Chen, Z. (2021). Bortezomib Inhibits Multiple Myeloma Cells by Transactivating ATF3 to Trigger miR-135a-5p- Dependent Apoptosis. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.720261>

- Landgren, O., & Nadeem, O. (2023). Bispecific Monoclonal Antibodies in Multiple Myeloma: Data from ASH 2022: A Podcast. *Advances in Therapy*, 40(8), 3291–3303. <https://doi.org/10.1007/s12325-023-02551-9>
- Lee, A.-H., Iwakoshi, N. N., & Glimcher, L. H. (2003). XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Molecular and Cellular Biology*, 23(21), 7448–7459. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.21.7448-7459.2003>
- Lei, M., Zhang, Y.-L., Huang, F.-Y., Chen, H.-Y., Chen, M.-H., Wu, R.-H., Dai, S.-Z., He, G.-S., Tan, G.-H., & Zheng, W.-P. (2023). Gankyrin inhibits ferroptosis through the p53/SLC7A11/GPX4 axis in triple-negative breast cancer cells. *Scientific Reports*, 13(1), 21916. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-49136-8>
- Leung-Hagesteijn, C., Erdmann, N., Cheung, G., Keats, J. J., Stewart, A. K., Reece, D. E., Chung, K. C., & Tiedemann, R. E. (2013). Xbp1s-Negative Tumor B Cells and Pre-Plasmablasts Mediate Therapeutic Proteasome Inhibitor Resistance in Multiple Myeloma. *Cancer Cell*, 24(3), 289–304. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.009>
- Li, H., Zhang, J., Zhen, C., Yang, B., & Feng, L. (2018). Gankyrin as a potential target for tumor therapy: evidence and perspectives. *American Journal of Translational Research*, 10(7), 1949–1960.
- Li, J., & Guo, Y. (2010). Gankyrin Oncoprotein: Structure, Function, and Involvement in Cancer. *Current Chemical Biology*, 4(1), 13–19. <https://doi.org/10.2174/2212796811004010013>
- Li, T., Li, W., Li, F., Lin, J., Zhang, Y., Zhang, Q., Sun, Y., Chen, X., Zhou, S., & Li, Q. (2024). Effects of two chd2-knockout strains on the morphology and behavior in zebrafish. *Development Genes and Evolution*, 234(2), 173–180. <https://doi.org/10.1007/s00427-024-00721-5>
- Liu, F., Lou, K., Zhao, X., Zhang, J., Chen, W., Qian, Y., Zhao, Y., Zhu, Y., & Zhang, Y. (2018). miR-214 regulates papillary thyroid carcinoma cell proliferation and metastasis by targeting PSMD10. *International Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3902>
- Lo, C. S., Cheng, W., & Klein, L. E. (1981). Effect of triiodothyronine on (Na⁺⁺K⁺)-adenosine triphosphatase and (Na⁺⁺Mg²⁺)-dependent phosphorylated intermediate in rat salivary glands. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 392(2), 134–138. <https://doi.org/10.1007/BF00581261>
- Lozano, G., & Zambetti, G. P. (2005). Gankyrin: An intriguing name for a novel regulator of p53 and RB. *Cancer Cell*, 8(1), 3–4. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.06.014>
- Luo, T., Fu, J., Xu, A., Su, B., Ren, Y., Li, N., Zhu, J., Zhao, X., Dai, R., Cao, J., Wang, B., Qin, W., Jiang, J., Li, J., Wu, M., Feng, G., Chen, Y., & Wang, H. (2016). PSMD10/gankyrin induces autophagy to promote tumor progression through cytoplasmic interaction with ATG7 and nuclear transactivation of ATG7 expression. *Autophagy*, 12(8), 1355–1371. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1034405>
- Mahindra, A., Hideshima, T., & Anderson, K. C. (2010). Multiple myeloma: biology of the disease. *Blood Reviews*, 24, S5–S11. [https://doi.org/10.1016/S0268-960X\(10\)70003-5](https://doi.org/10.1016/S0268-960X(10)70003-5)
- Maiso, P., Huynh, D., Moschetta, M., Sacco, A., Aljawai, Y., Mishima, Y., Asara, J. M., Roccaro, A. M., Kimmelman, A. C., & Ghobrial, I. M. (2015a). Metabolic signature identifies novel targets for drug resistance in multiple myeloma. *Cancer Research*, 75(10), 2071–2082. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3400>

- Mayeux, R. (2004). Biomarkers: potential uses and limitations. *NeuroRx : The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 1(2), 182–188.
<https://doi.org/10.1602/neurorx.1.2.182>
- Meng, Y., He, L., Guo, X., Tang, S., Zhao, X., Du, R., Jin, J., Bi, Q., Li, H., Nie, Y., Liu, J., & Fan, D. (2010). Gankyrin promotes the proliferation of human pancreatic cancer. *Cancer Letters*, 297(1), 9–17.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.04.019>
- Misiewicz-Krzeminska, I., Corchete, L. A., Rojas, E. A., Martínez-López, J., García-Sanz, R., Oriol, A., Bladé, J., Lahuerta, J.-J., Miguel, J. S., Mateos, M.-V., & Gutiérrez, N. C. (2018). A novel nano-immunoassay method for quantification of proteins from CD138-purified myeloma cells: biological and clinical utility. *Haematologica*, 103(5), 880–889.
<https://doi.org/10.3324/haematol.2017.181628>
- Misiewicz-Krzeminska, I., de Ramón, C., Corchete, L. A., Krzeminski, P., Rojas, E. A., Isidro, I., García-Sanz, R., Martínez-López, J., Oriol, A., Bladé, J., Lahuerta, J.-J., San Miguel, J., Rosiñol, L., Mateos, M.-V., & Gutiérrez, N. C. (2020a). Quantitative expression of Ikaros, IRF4, and PSMD10 proteins predicts survival in VRD-treated patients with multiple myeloma. *Blood Advances*, 4(23), 6023–6033. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002711>
- Misiewicz-Krzeminska, I., Sarasquete, M. E., Quwaider, D., Krzeminski, P., Ticona, F. V., Paíno, T., Delgado, M., Aires, A., Ocio, E. M., García-Sanz, R., San Miguel, J. F., & Gutiérrez, N. C. (2013). Restoration of microRNA-214 expression reduces growth of myeloma cells through positive regulation of P53 and inhibition of DNA replication. *Haematologica*, 98(4), 640–648.
<https://doi.org/10.3324/haematol.2012.070011>
- Moreau, P., Kumar, S. K., San Miguel, J., Davies, F., Zamagni, E., Bahlis, N., Ludwig, H., Mikhael, J., Terpos, E., Schjesvold, F., Martin, T., Yong, K., Durie, B. G. M., Facon, T., Jurczyszyn, A., Sidana, S., Raje, N., van de Donk, N., Lonial, S., ... Richardson, P. G. (2021). Treatment of relapsed and refractory multiple myeloma: recommendations from the International Myeloma Working Group. *The Lancet Oncology*, 22(3), e105–e118. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30756-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30756-7)
- Murata, S., Takahama, Y., Kasahara, M., & Tanaka, K. (2018a). The immunoproteasome and thymoproteasome: functions, evolution and human disease. *Nature Immunology*, 19(9), 923–931. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0186-z>
- Narita, T., Ri, M., Masaki, A., Mori, F., Ito, A., Kusumoto, S., Ishida, T., Komatsu, H., & Iida, S. (2015). Lower expression of activating transcription factors 3 and 4 correlates with shorter progression-free survival in multiple myeloma patients receiving bortezomib plus dexamethasone therapy. *Blood Cancer Journal*, 5(12), e373–e373. <https://doi.org/10.1038/bcj.2015.98>
- Nemec, A. A., Peterson, A. K., Warnock, J. L., Reed, R. G., & Tomko, R. J. (2019). An Allosteric Interaction Network Promotes Conformation State-Dependent Eviction of the Nas6 Assembly Chaperone from Nascent 26S Proteasomes. *Cell Reports*, 26(2), 483–495.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.042>
- Nikesitch, N., Lee, J. M., Ling, S., & Roberts, T. L. (2018). Endoplasmic reticulum stress in the development of multiple myeloma and drug resistance. *Clinical & Translational Immunology*, 7(1), e1007. <https://doi.org/10.1002/cti2.1007>

- Nikesitch, N., & Ling, S. C. W. (2016). Molecular mechanisms in multiple myeloma drug resistance. *Journal of Clinical Pathology*, 69(2), 97–101. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2015-203414>
- Obeng, E. A., Carlson, L. M., Gutman, D. M., Harrington, W. J., Lee, K. P., & Boise, L. H. (2006a). Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood*, 107(12), 4907–4916. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3531>
- Offidani, M., Corvatta, L., Morè, S., Nappi, D., Martinelli, G., Olivieri, A., & Cerchione, C. (2021). Daratumumab for the Management of Newly Diagnosed and Relapsed/Refractory Multiple Myeloma: Current and Emerging Treatments. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.624661>
- Osmulski, P. A., Hochstrasser, M., & Gaczynska, M. (2009). A Tetrahedral Transition State at the Active Sites of the 20S Proteasome Is Coupled to Opening of the α -Ring Channel. *Structure*, 17(8), 1137–1147. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.06.011>
- Padmanabhan, B., Adachi, N., Kataoka, K., & Horikoshi, M. (2004). Crystal structure of the homolog of the oncoprotein gankyrin, an interactor of Rb and CDK4/6. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(2), 1546–1552. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310266200>
- Pandian, S. R. K., Vijayakumar, K. K., Kunjiappan, S., Babkiewicz, E., & Maszczyk, P. (2023). Emerging role of exosomes in hematological malignancies. *Clinical and Experimental Medicine*, 23(4), 1123–1136. <https://doi.org/10.1007/s10238-022-00850-z>
- Pelon, M., Krzeminski, P., Tracz-Gaszewska, Z., & Misiewicz-Krzeminska, I. (2024). Factors determining the sensitivity to proteasome inhibitors of multiple myeloma cells. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1351565. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1351565>
- Potts, B. C., Albitar, M. X., Anderson, K. C., Baritaki, S., Berkers, C., Bonavida, B., Chandra, J., Chauhan, D., Cusack, J. C., Fenical, W., Ghobrial, I. M., Groll, M., Jensen, P. R., Lam, K. S., Lloyd, G. K., McBride, W., McConkey, D. J., Miller, C. P., Neuteboom, S. T. C., ... Palladino, M. A. (2011). Marizomib, a proteasome inhibitor for all seasons: preclinical profile and a framework for clinical trials. *Current Cancer Drug Targets*, 11(3), 254–284. <https://doi.org/10.2174/156800911794519716>
- Pu, J., Liu, T., Wang, X., Sharma, A., Schmidt-Wolf, I. G. H., Jiang, L., & Hou, J. (2024). Exploring the role of histone deacetylase and histone deacetylase inhibitors in the context of multiple myeloma: mechanisms, therapeutic implications, and future perspectives. *Experimental Hematology & Oncology*, 13(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s40164-024-00507-5>
- Quach, H., Ritchie, D., Stewart, A. K., Neeson, P., Harrison, S., Smyth, M. J., & Prince, H. M. (2010). Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDS) in multiple myeloma. *Leukemia*, 24(1), 22–32. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.236>
- Rajkumar, S. V. (2022). Multiple myeloma: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management. *American Journal of Hematology*, 97(8), 1086–1107. <https://doi.org/10.1002/ajh.26590>
- Rajkumar, S. V. (2024a). Multiple myeloma: 2024 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American Journal of Hematology*, 99(9), 1802–1824. <https://doi.org/10.1002/ajh.27422>

- Shoulders, M. D., Ryno, L. M., Genereux, J. C., Moresco, J. J., Tu, P. G., Wu, C., Yates, J. R., Su, A. I., Kelly, J. W., & Wiseman, R. L. (2013). Stress-independent activation of XBP1s and/or ATF6 reveals three functionally diverse ER proteostasis environments. *Cell Reports*, 3(4), 1279–1292. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.03.024>
- Silberstein, J., Tuchman, S., & Grant, S. J. (2022). What Is Multiple Myeloma? *JAMA*, 327(5), 497. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.25306>
- Strzelec, M., Detka, J., Mieszczak, P., Sobocińska, M. K., & Majka, M. (2023). Immunomodulation—a general review of the current state-of-the-art and new therapeutic strategies for targeting the immune system. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1127704>
- Vogl, D. T., Stadtmauer, E. A., Tan, K.-S., Heitjan, D. F., Davis, L. E., Pontiggia, L., Rangwala, R., Piao, S., Chang, Y. C., Scott, E. C., Paul, T. M., Nichols, C. W., Porter, D. L., Kaplan, J., Mallon, G., Bradner, J. E., & Amaravadi, R. K. (2014). Combined autophagy and proteasome inhibition. *Autophagy*, 10(8), 1380–1390. <https://doi.org/10.4161/auto.29264>
- Wang, C., & Cheng, L. (2017). Gankyrin as a potential therapeutic target for cancer. *Investigational New Drugs*, 35(5), 655–661. <https://doi.org/10.1007/s10637-017-0474-8>
- Wang, C., Wang, B., Liang, W., Zhou, C., Lin, W., Meng, Z., Wu, W., Wu, M., Liao, Y., Li, X., Zhao, J., & He, Y. (2022). Hsa-miR-1248 suppressed the proliferation, invasion and migration of colorectal cancer cells via inhibiting PSMD10. *BMC Cancer*, 22(1), 922. <https://doi.org/10.1186/s12885-022-10028-1>
- Wu, X., Xia, J., Zhang, J., Zhu, Y., Wu, Y., Guo, J., Chen, S., Lei, Q., Meng, B., Kuang, C., Feng, X., He, Y., Shen, Y., Li, X., Qiu, L., Li, G., & Zhou, W. (2020). Phosphoglycerate dehydrogenase promotes proliferation and bortezomib resistance through increasing reduced glutathione synthesis in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 190(1), 52–66. <https://doi.org/10.1111/bjh.16503>
- Xia, Y., Jiang, L., & Zhong, T. (2018). The role of HIF-1 α in chemo-/radioresistant tumors. *OncoTargets and Therapy*, Volume 11, 3003–3011. <https://doi.org/10.2147/OTT.S158206>
- Xiao, K., Ma, S., Xu, L., Ding, N., Zhang, H., Xie, L., Xu, L., Jiao, Y., Zhang, H., & Jiang, Y. (2021). Interaction between PSMD10 and GRP78 accelerates endoplasmic reticulum stress-mediated hepatic apoptosis induced by homocysteine. *Gut Pathogens*, 13(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s13099-021-00455-z>
- Xiong, S., Chng, W.-J., & Zhou, J. (2021a). Crosstalk between endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a dynamic duo in multiple myeloma. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 78(8), 3883–3906. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03756-3>
- Yadav, U., & Gonsalves, W. I. (2024). The molecular biology of multiple myeloma. In *Molecular Hematology* (pp. 137–144). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781394180486.ch10>
- Yang, F., Zhang, L., Wang, F., Wang, Y., Huo, X., Yin, Y., Wang, Y., Zhang, L., & Sun, S. (2011). Modulation of the unfolded protein response is the core of microRNA-122-involved sensitivity to chemotherapy in hepatocellular carcinoma. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 13(7), 590–600. <https://doi.org/10.1593/neo.11422>
- Yin, Z., Wang, J., Li, T., Ma, L., Kang, J., & Liu, G. (2023). miR-188-5p and Host MALAT1 Regulate RBE Cell Migration, Invasion, and Apoptosis via Up-regulating PSMD10 in Cholangiocarcinoma.

Applied Biochemistry and Biotechnology, 195(1), 655–671. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-04136-8>

- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., & Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, 107(7), 881–891. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00611-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00611-0)
- Zaal, E. A., Wu, W., Jansen, G., Zweegman, S., Cloos, J., & Berkers, C. R. (2017). Bortezomib resistance in multiple myeloma is associated with increased serine synthesis. *Cancer & Metabolism*, 5(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s40170-017-0169-9>
- Zhen, C., Chen, L., Zhao, Q., Liang, B., Gu, Y.-X., Bai, Z.-F., Wang, K., Xu, X., Han, Q., Fang, D., Wang, S., Zhou, T., Xia, Q., Gong, W.-L., Wang, N., Li, H.-Y., Jin, B.-F., & Man, J. (2013). Gankyrin promotes breast cancer cell metastasis by regulating Rac1 activity. *Oncogene*, 32(29), 3452–3460. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.356>
- Ziogas, D. C., Terpos, E., Kastritis, E., & Dimopoulos, M. A. (2017). An overview of the role of carfilzomib in the treatment of multiple myeloma. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 18(17), 1883–1897. <https://doi.org/10.1080/14656566.2017.1404575>

X Wykaz ilustracji i tabel

TABELE:

Tabela 1. Stosowane w pracy odczynniki.

Tabela 2 . Stosowane w pracy enzymy.

Tabela 3 . Stosowane w pracy bufory.

Tabela 4 . Stosowane w pracy zestawy odczynników.

Tabela 5 . Stosowane w pracy wzorce wielkości.

Tabela 6 . Charakterystyka stosowanych w pracy przeciwciał.

Tabela 7 . Charakterystyka stosowanych w pracy TaqMan.

Tabela 8. Charakterystyka stosowanych w pracy oligonukleotydów.

Tabela 9 . Skład pożywek mikrobiologicznych.

Tabela 10. Składniki dodatkowe pożywki RPMI-1640.

Tabela 11. Charakterystyka linii komórkowych szpiczaka plazmocytozy, wykorzystanych w niniejszej pracy.

Tabela 12. Składniki reakcji PCR.

Tabela 13. Warunki reakcji PCR.

Tabela 14. Warunki reakcji PCR do sekwencjonowania.

Tabela 15. Warunki reakcji syntezy cDNA.

Tabela 16. Charakterystyka wyprowadzonych klonów pod względem stopnia edycji poziomu ekspresji PSMD10 oceniana przy użyciu programu SYNTHGO ICE. Klony kontrolne WT wykazały edycję 0%.

Tabela 17 .Charakterystyka pacjentów uczestniczących w badaniu Compass.

Tabela 18. Zestawienie zmian wywołanych w komórce poprzez całkowite wyłączenie lub obniżenie poziomu ekspresji PSMD10 w stosunku do komórek kontrolnych

Tabela 19. Zestawienie zmian wywołanych w komórce poprzez obniżenie poziomu ekspresji PSMD10 w stosunku do komórek kontrolnych

RYCINY:

Rycina 1. Schemat działania leków z grupy inhibitorów proteasomu.

Rycina 2. Czynniki determinujące wrażliwość na PI w MM.

Rycina 3. Schemat przedstawiający edycję genetyczną przy użyciu bezplazmidowego systemu Gene Knockout kit_V2 (Synthego) multi-gRNA przeciw PSMD10 + białko Cas9-2NLS.

Rycina 4 . Poziom białka gankyrina w klonach wyprowadzonych metodą CRISPR-Cas9. Białko gankyrina normalizowane do GAPDH - capillary nanoimmunoassay JESS™ (ProteinSimple, USA).

Rycina 5. Przykładowa analiza stopnia edycji ekspresji PSMD10 uzyskanych klonów. Analizę sekwencji wszystkich klonów przeprowadzono przy użyciu programu SYNTHIGO ICE.

Rycina 6. Schemat przedstawiający wyprowadzenie modeli o obniżonej ekspresji gankyriny za pomocą systemu Sleeping beauty.

Rycina 7. Rozdział elektroforetyczny DNA przedstawiający strawiony plazmid TST30-sh. Próbkę oznaczoną jako SH1,SH2 i SH4 zawierają wstawkę.

Rycina 8. Rozdział elektroforetyczny DNA przedstawiający strawiony plazmid TST201-sh. Próbkę oznaczoną jako SH1,SH2 i SH4 zawierają wstawkę.

Rycina 9. Poziom białka gankyrina w liniach komórkowych wyprowadzonych przy użyciu metody Sleeping Beauty. A)48h aktywacja doksocykliną B)72h aktywacja doksocykliną. Białko gankyrina normalizowane do GAPDH - capillary nanoimmunoassay JESS™ (ProteinSimple, USA).

Rycina 10. Poziom białka gankyrina w liniach komórkowych wyprowadzonych przy użyciu metody Sleeping Beauty. Wyciszenia dwutygodniowe, dwutygodniowa aktywacja doksocykliną 50ng/ml. Białko gankyrina normalizowane do GAPDH - capillary nanoimmunoassay JESS™ (ProteinSimple, USA).

*Rycina 11. Wpływ wyłączenia ekspresji gankyriny na proliferację komórek szpiczaka. Proliferacja mierzona przy pomocy oceny ekspresji białka Ki-67. Test t-Studenta do oceny istotności statystycznej (GraphPad 9.3) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (każdy klon w trzech powtórzeniach biologicznych, uśredniona ilość klonów RPMI_WT $n=3$, RPMI_KO $n=3$, U266_WT $n=3$, U266_KO $n=2$, L363_WT $n=2$, L363_KO $n=3$, JJN3_WT $n=2$, JJN3_KO $n=3$)*

Rycina 12. Wpływ wyłączenia ekspresji gankyriny na czas podwojenia populacji mierzony przy pomocy liczenia żywych komórek z wykorzystaniem barwienia błękitem trypanu. Test t-Studenta do oceny istotności statystycznej (GraphPad 9.3) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (każdy klon w trzech powtórzeniach biologicznych, uśredniona ilość klonów RPMI_WT $n=3$, RPMI_KO $n=3$, U266_WT $n=3$, U266_KO $n=2$, L363_WT $n=2$, L363_KO $n=3$, JJN3_WT $n=2$, JJN3_KO $n=3$)

Rycina 13. Przykładowy poziom syntezy białka, klonów wyprowadzonych metoda CRISPR-Cas9 w linii U266 (A) i JJN3 (B). Porównanie średniego poziomu syntezy białek de novo poprzez porównanie intensywności fluorescencji pików (C). test t-Studenta do oceny istotności statystycznej (GraphPad 9.3) * $p < 0,05$ ($n=12$; 3 powtórzenia biologiczne)) linia komórkowa U266, linia komórkowa JJN3, komórki kontrolne.

Rycina 14. Aktywność proteasomu w liniach komórkowych pozbawionych ekspresji PSMD10 A) całkowita aktywność proteasomu B) CH-L- aktywność chymotrypsynowa C) C-L- aktywność kaspazowa D) T- aktywność trypsynowa; test t-Studenta do oceny istotności statystycznej (GraphPad 9.3) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (każdy klon w minimum trzech powtórzeniach biologicznych, ilość klonów RPMI_WT $n=2$, RPMI_KO $n=2$, U266_WT $n=2$, U266_KO $n=3$, L363_WT $n=2$, L363_KO $n=2$, JJN3_WT $n=2$, JJN3_KO $n=2$)

Rycina 15. Aktywność proteasomu w liniach komórkowych o długotrwałym obniżonym poziomie PSMD10 (wyciszenie 2-tygodniowe) A) całkowita aktywność proteasomu B) CH-L- aktywność chymotrypsynowa C) C-L- aktywność kaspazowa D) T- aktywność trypsynowa; test t-Studenta do oceny istotności statystycznej (GraphPad 9.3) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (3 powtórzenia biologiczne)

Rycina 16. Poziom ekspresji podjednostek proteasomu w klonach linii komórkowej U266 wyprowadzonych metodą CRISPR-Cas9 sprawdzony za pomocą RT-PCR, normalizowany do PGK1 ($2^{-\Delta Ct}$). test t-Studenta do oceny istotności statystycznej (GraphPad 9.3) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ ($n=12$; 3 powtórzenia biologiczne)

Rycina 17. Poziom ekspresji podjednostek proteasomu w klonach JJN3 wyprowadzonych metodą CRISPR-Cas9 sprawdzony za pomocą RT-PCR, normalizowany do PGK1 ($2^{-\Delta Ct}$). test t-Studenta do oceny istotności statystycznej (GraphPad 9.3) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ ($n=12$; 3 powtórzenia biologiczne)

Rycina 18. Krzywe przeżywalności Kaplan- Meier przedstawiające wpływ poziomu PSMD10 na czas wolny od wznowy, oznaczanego przy pomocy RNAseq w komórkach plazmatycznych CD138+ pobranych od pacjentów z nowo zdiagnozowanym MM, biorących udział w badaniu Commpass. Istotność statystyczna oceniana testem Mantel-COX

Rycina 19. Poziom PSMD10 w poszczególnych stadiach choroby (ISS). Poziom istotności oceniany testem Kruskala-Wallisa

Rycina 20. Krzywe przeżywalności Kaplan- Meier przedstawiające PFS pacjentów z bazy CoMMpass w zależności od zastosowanego schematu leczenia A) Leczenie z zastosowaniem bortezomibu B) Leczenie z zastosowaniem karfilzomibu C) Leczenie z zastosowaniem leków z grupy immunomodulatorów D) Leczenie z zastosowaniem bortezomibu i leków z grupy immunomodulatorów E) Leczenie z zastosowaniem karfilzomibu i leków z grupy immunomodulatorów. . Istotność statystyczna oceniana testem Mantel-COX

*Rycina 21. Cytotoksyczność oceniana za pomocą testu MTS po 48 godzinach inkubacji z badanym lekiem, regresja nieliniowa do oceny IC50, test t-Studenta do oceny istotności statystycznej (GraphPad 9.3) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ ($n=30$; 3 powtórzenia biologiczne) A) Komórki pozbawione ekspresji PSMD10 traktowane bortezomibem B) Komórki pozbawione ekspresji PSMD10 traktowane karfilzomibem*

*Rycina 22. Cytotoksyczność oceniana za pomocą testu MTS po 48 godzinach inkubacji z badanym lekiem, regresja nieliniowa do oceny IC50, test t-Studenta do oceny istotności statystycznej (GraphPad 9.3) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ ($n=30$; 3 powtórzenia biologiczne). Długotrwałe wyciszenie ekspresji gankyriny za pomocą systemu Sleeping beauty po aktywacji doksycykliną 100ng/ml, komórki traktowane bortezomibem (3 powtórzenia biologiczne)*

*Rycina 23. Cytotoksyczność oceniana za pomocą testu MTS po 48 godzinach inkubacji z badanym lekiem, regresja nieliniowa do oceny IC50, test t-Studenta do oceny istotności statystycznej (GraphPad 9.3) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ C) Wyciszenie ekspresji gankyriny za pomocą systemu Sleeping beauty po 72h aktywacji doksycykliną 100ng/ml (3 powtórzenia biologiczne)*

*Rycina 24. Cytotoksyczność oceniana za pomocą testu MTS po 48 lub 72 godzinach, w zależności od leku. regresja nieliniowa do oceny IC50, test t-Studenta do oceny istotności statystycznej (GraphPad 9.3) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ ($n=23$; 3*

powtórzenia biologiczne). Komórki pozbawione ekspresji PSMD10 traktowane A) lenalidomidem 0-50 μ M B) melfalanem 0-50 μ M C) panobinostatem 0-20nM

Rycina 25. Synergizm leków oceniany za pomocą testu MTS. Wykresy przedstawiają śmiertelność komórek w zależności od dawki leku. Komórki traktowane bortezomibem i deksametazanem w stosunku 1:10

Rycina 26. Synergizm leków oceniany za pomocą testu MTS. Wykresy przedstawiają śmiertelność komórek w zależności od dawki leku. Komórki traktowane bortezomibem i lenalidomidem w stosunku 1:10

Rycina 27. Wykresy kołowe przedstawiające zmiany ekspresji genów wywołane wyłączeniem ekspresji PSMD10 (DOWN-geny o obniżonej ekspresji; UP-geny o zwiększonej ekspresji; NOT AFFECTED-geny o nieistotnie statystycznie zmienionej ekspresji)

Rycina 28. Przykładowe wyniki walidacji technicznej. Poziom ekspresji genów mierzony metodą RT-PCR, normalizowany do GAPDH (2- Δ Ct). test t-Studenta do oceny istotności statystycznej (GraphPad 9.3) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (każdy klon w dwóch powtórzeniach technicznych, ilość klonów: U266_WT $n=3$, U266_KO $n=3$)

Rycina 29. Analiza głównych składowy PCA A) Klony linii komórkowej U266 B) Klony linii komórkowej RPMI C) Klony linii komórkowej JJN3

Rycina 30. Schemat przedstawiający zmiany ekspresji genów w odrębie badanych linii komórkowych.

Rycina 31. Analiza wszystkich wyprowadzonych klonów z wykorzystaniem algorytmu redukcji wymiarowości t-SNE (t-distributed Stochastic Neighbor Embedding)

Rycina 32. Mapa cieplna wskazujące zmiany w ekspresji genów, wywołane wyłączeniem ekspresji PSMD10. Geny o ekspresji zmienionej w odmienny sposób w badanych liniach komórkowych

Rycina 33. Mapy cieplne wskazujące zmiany w ekspresji genów, wywołane wyłączeniem ekspresji PSMD10. Geny o ekspresji zmienionej w tym samym kierunku w badanych liniach komórkowych

Rycina 34. Analiza porównawcza GSEA wykazująca zmiany w regulacji ścieżek sygnałowych powstałe na skutek wyłączenia ekspresji PSMD10

WYKRESY:

Wykres 1. Poziom białka gankyrina w liniach komórkowych szpiczaka plazmocytoowego. Białko gankyrina normalizowane do GAPDH i białka całkowitego- nanoimmunoelktroforeza kapilarna JESS™ (ProteinSimple, USA). Linia przerywana wskazuje poziom gankyriny u pacjentów, który pozwala na zróżnicowane rokowanie.

*Wykres 2. Czas podwojenia populacji komórek o obniżonym poziomie ekspresji gankyriny, wyprowadzonych metodą Sleeping beauty. test t-Studenta do oceny istotności statystycznej (GraphPad 9.3) * $p < 0,05$ (trzy powtórzenia biologiczne).*

Wykres 3. Ekspresja PSMD10 w komórkach plazmatycznych CD138+

Wykres 4. Krzywe przeżywalności Kaplan- Meier przedstawiające poziom białka gankyrina w próbkach pacjentów NDMM. Istotność statystyczna oceniana testem Mantel-COX.