

LIMFOBLASTOIDNE CELIČNE LINIJE KOT MODEL *IN VITRO* ZA PREDKLINIČNO VREDNOTENJE ZDRAVILNIH UČINKOVIN

LYMPHOBLASTOID CELL LINES AS AN *IN VITRO* MODEL FOR PRECLINICAL DRUG EVALUATION

AVTORJI / AUTHORS:

znani. sod. dr. Maša Kandušer, univ. dipl. biol.
asist. dr. Tijana Markovič, mag. farm.
prof. dr. Irena Mlinarič-Raščan, mag. farm.

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: masa.kanduser@ffa.uni-lj.si



POVZETEK

Personalizirana medicina temelji na prilagajanju zdravljenja genotipu in fenotipu posameznika z namenom povečanja učinkovitosti terapije in zmanjšanja tveganja za neželene učinke. Pomembno vlogo pri njenem uveljavljanju imajo ustrezni predklinični modeli *in vitro*, ki omogočajo sistematično proučevanje interindividualnih razlik v odzivu na zdravilne učinkovine. Med pogosto uporabljenimi modeli so limfoblastoidne celične linije, pridobljene s transdukcijo človeških limfocitov B z virusom Epstein-Barr. Limfoblastoidne celične linije ohranjajo genetske značilnosti darovalca in predstavljajo uporaben model *in vitro* v genomskih, farmakogenomskih ter farmakoloških raziskavah. V članku so predstavljeni postopki priprave limfoblastoidnih celičnih linij, molekularni mehanizmi njihove imortalizacije ter njihova uporaba v predkliničnih študijah in personalizirani medicini. Obravnavane so tudi prednosti in omejitve uporabe limfoblastoidnih celičnih linij v predkliničnih študijah, zlasti vpliv transdukcije z virusom Epstein-Barr na celično fiziologijo, odzivnost na zdravila ter interpretacijo eksperimentalnih rezultatov. Limfoblastoidne celične linije predstavljajo pomemben podporni model *in vitro*, predvsem v zgodnjih fazah predkliničnih študij in kot dopolnilo naprednejšim celičnim sistemom v sodobni biomedicini.

KLJUČNE BESEDE:

celični modeli *in vitro*, limfoblastoidne celične linije, predklinične študije, personalizirana medicina

ABSTRACT

Personalised medicine involves tailoring treatment to an individual's genotype and phenotype, to increase therapeutic efficacy and reduce the risk of adverse effects. Its successful implementation depends on appropriate *in vitro* preclinical models that allow systematic investigation of interindividual differences in drug response. Among commonly used models are lymphoblastoid cell lines, generated by transforming of human B lymphocytes with Epstein-Barr virus. Lymphoblastoid cell lines retain the genetic characteristics of the donor and serve as a useful *in vitro* model in genomic, pharmacogenomic, and pharmacological research. This article presents

methods for establishing of lymphoblastoid cell lines, the molecular mechanisms underlying their immortalisation, and their use in preclinical research and personalised medicine. The advantages and limitations of this model are also discussed, particularly the impact of Epstein–Barr virus transformation on cellular physiology and drug responsiveness. Lymphoblastoid cell lines are an important supportive *in vitro* model, especially in early research stages and as a complement to more advanced cellular systems.

KEY WORDS:

in vitro cell models, lymphoblastoid cell lines, personalized medicine, preclinical studies

1 UVOD

Personalizirana medicina je sodoben pristop, ki z uporabo genetskih, molekularnih in kliničnih podatkov omogoča izbiro najučinkovitejšega in za posameznika najvarnejšega zdravljenja. Sekvenciranje človeškega genoma je omogočilo vpogled v genetsko variabilnost med posamezniki v določeni populaciji in pospešilo razvoj personaliziranega zdravljenja (1). Sodobni terapevtski pristopi vse pogostejše temeljijo na prilagajanju zdravljenja molekularnim in genomskim značilnostim bolnika ter upoštevajo njegove okoljske, vedenjske in demografske dejavnike (2, 3).

Z uporabo sekvenciranja genoma in uporabe naprednejših metod drugih "omik" pridobimo obsežne podatke. Za interpretacijo in obdelavo pridobljenih podatkov se uporabljajo napredna računalniška orodja, ki temeljijo na strojnem in globokem učenju in ki s pomočjo algoritmov nevronske mreže analizirajo podatke o funkcijskem vplivu, pogostosti in klinični pomembnosti posameznih sprememb. Takšni bioinformatični pristopi omogočajo pridobitev ključnih informacij iz velike količine podatkov, pomembnih za razumevanje bolezni in podporo pri izbiri najustreznejšega zdravljenja za posameznega bolnika. Za širšo uporabo personalizirane medicine v kliničnem okolju je ključno interdisciplinarno sodelovanje. Razvoj novih algoritmov in orodij umetne inteligence olajša interpretacijo kompleksnih podatkov, pri čemer je pomembno hkrati nasloviti etična vprašanja in zagotoviti ustrezno varovanje osebnih podatkov bolnikov (1, 4, 5).

V predkliničnih študijah se vrednoti učinkovitost in varnost zdravilnih učinkovin na celičnih modelih *in vitro* ter na živalskih modelih *in vivo* (6). Na področju personalizirane medicine so pomembni celični modeli, ki omogočajo proučevanje interindividualnih razlik v odzivu na zdravilno učinkovino, kar lahko prispeva k hitrejšemu uveljavljanju personaliziranega zdravljenja v kliničnem okolju (7). Med najboljše celične modele sodijo inducirane pluripotentne matične celice (angl. *induced pluripotent stem cells*; iPSCs), ki jih pridobivamo iz različnih tkiv z reprogramiranjem somatskih celic (8, 9). Kljub prednostim uporabe celičnih modelov iPSC je uspešnost transdukcije primarnih somatskih celic v iPSC nizka, postopek priprave pa dolgotrajen in ekonomsko zahteven, zato so v predkliničnih študijah nepogrešljivi enostavnejši in ekonomsko učinkovitejši celični modeli, med katere sodijo tudi LCL (3, 10–12). Poleg imortaliziranih celičnih linij se v sodobnih raziskavah in razvoju zdravil uporabljajo tudi primarne celice, naprednejši tridimenzionalni (3D) modeli ter kompleksni organi na čipu (13–16).

2 PRIPRAVA LIMFOBLASTOIDNIH CELIČNIH LINIJ

Celice LCL predstavljajo pomemben model *in vitro* v predkliničnem preskušanju zdravilnih učinkovin. Nastanejo z okužbo človeških limfocitov B z virusom Epstein-Barr (EBV), kar sproži njihovo nesmrtnost in omogoči proliferacijo v celični kulturi. Kljub transdukciji LCL ohranijo genetske značilnosti izvirnega darovalca. Relativno enostavno

KLJUČNI POUDARKI

- Limfoblastoidne celične linije (LCL) so pridobljene s transformacijo limfocitov B z virusom Epstein-Barr.
- LCL ohranjajo genetske značilnosti darovalca in so primeren model za analizo mehanizmov bolezni, identifikacijo biomarkerjev in proučevanje individualnih razlik v odzivu na zdravila.
- So cenovno dostopen, stabilen in neomejen vir celic, uporaben v farmakogenomiki, genomiki in raziskavah personalizirane medicine.
- Obsežne biobanke LCL (npr. HapMap, CEPH) omogočajo povezovanje genotipa s celičnim fenotipom ter napovedovanje odziva na zdravilne učinkovine



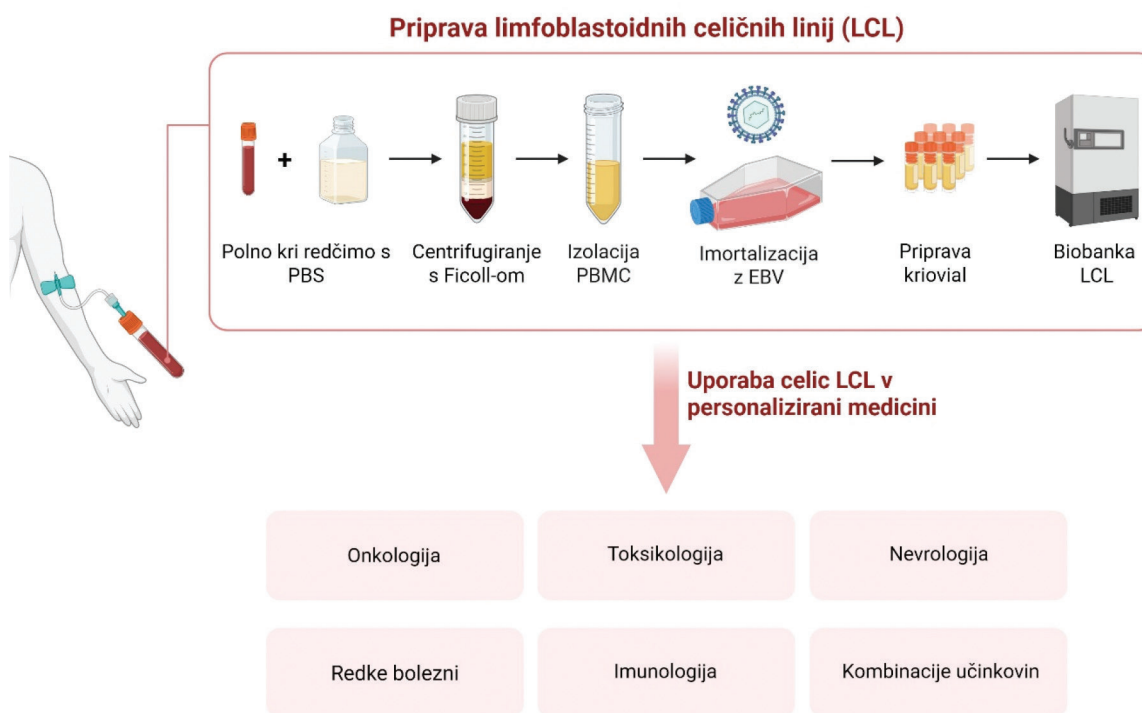
vzdrževanje LCL omogoča široko uporabo pri raziskavah odzivnosti LCL na zdravilne učinkovine ter vrednotenju genetske variabilnosti v človeški populaciji (slika 1).

2.1 BIOLOGIJA VIRUSA EPSTEIN-BARR

EBV je 150–200 nm velik DNA-virus iz družine herpesvirusov (*Herpesviridae*), poddružine gamaherpesvirusov (*Gammapherpesvirinae*) in rodu limfokriptovirusov. EBV je humani herpesvirus tipa 4 in je eden izmed osmih znanih človeških herpesvirusov, patogenih za človeka. Okuži predvsem limfocite B in epitelijske celice ter vzpostavi doživljenjsko latentno okužbo (17, 18). Večina človeške populacije se z EBV okuži že v otroštvu, pri čemer okužba ostane v latentni obliki, zato večina posameznikov ne razvije simptomov in okužbe ne zazna (18). Pri mladostnikih in odraslih lahko okužba z EBV povzroči infekcijsko mononukleozo. Onkološke raziskave so pokazale, da so z okužbo z EBV povezana

nekatera rakava obolenja kot so Burkittov limfom, Hodgkinova bolezen, karcinom nosnega žrela in rak želodca (19). Okužba z EBV se prenaša s slino, virus nato vstopi v telo skozi žrelo in v predelu mandljev pride v stik z limfociti B. V večini primerov se takoj po vstopu virusa v gostiteljske celice okuženi limfociti B aktivirajo. Limfociti B se nato diferencirajo v spominske limfocite B v katerih se EBV ohranja kot latentna okužba. V primeru reaktivacije virusa, se mirujoči okuženi spominski limfociti B diferencirajo v plazmatke. V teh celicah se virus razmnoži in v litičnem ciklu sprosti virusne delce, ki okužijo epitelijske celice. V okuženih epitelijskih celicah se litični cikel ponovi in sprostijo se virusni delci, ki ponovno okužijo limfocite B. Opisana reaktivacija virusa v gostiteljskem organizmu lahko povzroči nastanek rakavih obolenj (20).

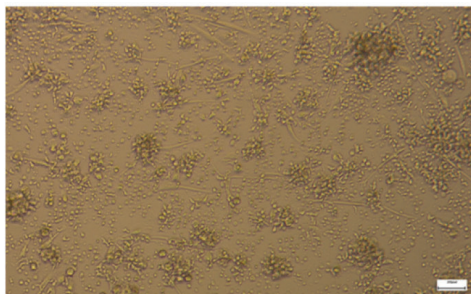
Nesmrtne celične linije lahko nastanejo s spontano transformacijo celic v tumorjih (21) ali pa jih vzpostavimo *in vitro* z uporabo specifičnih laboratorijskih postopkov. LCL vzpo-



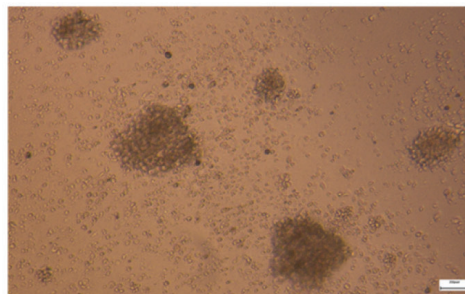
Slika 1: Shematski prikaz priprave limfoblastoidnih celičnih linij iz vzorca periferne krvi ter njihove uporabe v personalizirani medicini (PBMC – mononuklearne celice periferne krvi, EBV – virus Epstein Barr). Povzeto po (17, 18). Ustvarjeno s programom BioRender (<https://BioRender.com/e7deuvv>).

Figure 1: Schematic presentation of lymphoblastoid cell lines generation from peripheral blood samples and their application in personalized medicine (LCLs – lymphoblastoid cell lines, PBMCs – peripheral blood mononuclear cells, EBV – Epstein-Barr virus). Adapted from (17, 18). Created in BioRender (<https://BioRender.com/e7deuvv>).

Proces transformacije limfoblastoidnih celičnih linij (LCL)



Nastanek skupkov v celični kulturi
14 dni po okužbi z EBV



Značilna morfologija LCL 21 dni po
okužbi z EBV

Slika 2: Morfološke značilnosti celične kulture v procesu priprave limfoblastoidne celične linije (limfoblastoidne celične linije - LCL, virus Epstein Barr - EBV). Slike so zajete z invertnim mikroskopom Zeiss pri povečavi objektiva 10×. Slike so last avtorjev in so bile pridobljene v okviru raziskave COVID-19 (številka odločbe 0120-496/2022/6).

Figure 2: Morphological characteristics of cell cultures during the establishment of lymphoblastoid cell lines (lymphoblastoid cell lines - LCLs, Epstein-Barr virus - EBV). Images were acquired using a Zeiss inverted microscope with 10× objective magnification. The images are the property of the authors and were obtained within the framework of the COVID-19 study (Nr. 0120-496/2022/6).

stavimo tako, da iz vzorca periferne krvi izoliramo mononuklearne celice periferne krvi (angl. *peripheral blood mononuclear cells*; PBMC), ki jih v pogojih *in vitro* okužimo z EBV (12, 13). Za uspešno transdukcijo je pomembno, da iz PBMC odstranimo limfocite T, ki bi lahko prepoznali in uničili z EBV transducirane limfocite B, zato gojišču dodamo ciklosporin A ali drug ustrezen imunosupresiv.

2.2 PROCES TRANSFORMACIJE LIMFOBLASTOIDNIH CELIČNIH LINIJ

Pomembno je, da primarne limfocite B izpostavimo dovolj visokim koncentracijam EBV. Za pripravo kužnih delcev EBV se lahko uporabijo celične linije Burkittovega limfoma, Akata in P3HR1 ali celična linija opičjega izvora B95-8 (14). Celične linije za pripravo kužnih delcev gojimo pod stresnimi pogoji, kot so stradanje ali nižje temperature, s čimer sprožimo aktivacijo virusa, vstop v litični cikel in sproščanje virusnih delcev. Te nato prefiltriramo in uporabimo za transdukcijo limfocitov B (12, 13).

Že v prvih 24 urah po izpostavitvi virusu se začne postopek imortalizacije. Z EBV okuženi limfociti B so podvrženi hitrim in obsežnim spremembam v genski transkripciji, ki jim sledijo spremembe v celičnem metabolizmu, morfologiji in celičnem ciklu (17). V celični kulturi opazimo morfološke spremembe celic, ki se v zadnji fazi transdukcije združujejo

v skupke, značilne za LCL. Prvi majhni celični skupki postanejo vidni v obdobju 14 dni po okužbi z EBV, njihova velikost in prepoznavnost pa s časom naraščata. Transdukcija limfocitov B z EBV običajno poteka v obdobju 3 do 6 tednov (3, 18, 22). Če se z EBV okuženi limfociti B do osmega tedna ne povežejo v značilne celične skupke, se proces transdukcije šteje za neuspešen (21). Slika 2 prikazuje značilne celične skupke, ki nastanejo v procesu transdukcije LCL iz vzorcev periferne krvi darovalcev z dokumentirano anamnezo covid-19.

Transdukcija primarnih limfocitov B v LCL z EBV sproži kompleksno aktivacijo celičnih signalnih poti, ki omogočajo neomejeno proliferacijo, izogibanje apoptozi in imunskemu odzivu. Transdukcija limfocitov B v LCL je selektiven proces, za katerega je potreben receptor CD21, ki se izraža na površini mirujočih limfocitov B. Glikoprotein gp350 na površini virusne ovojnice se veže na receptor CD21 limfocitov B in omogoči vstop virusa v celico (8, 11, 12). Nekaj dni po okužbi se v gostiteljski celici izrazijo geni za virusne jedrne antigene (angl. *EBV nuclear antigen*; EBNA) in virusne membranske proteine latentne okužbe (angl. *latent membrane protein*; LMP). Proteini EBNA in LMP omogočajo preživetje, proliferacijo in vzdrževanje latence. Transformacija limfocitov B v LCL temelji na usklajenem delovanju latentnih proteinov EBV. EBNA2 in EBNA-LP sprožita transkripcijski program latence III z aktivacijo proliferacijskih poti, vključno z regu-

lacijo MYC, ter spodbujata izražanje ključnih onkoproteinov LMP1 in LMP2A. Ključni transdukcijski dejavnik je LMP1, ki s konstitutivno aktivacijo jedrnega dejavnika κB (NF- κB), c-Jun N-končne kinaze (JNK) in MAP-kinaze, spodbuja preživetje celic in odpornost proti apoptozi. LMP2A posnema signalizacijo B-celičnega receptorja in ohranja latentno okužbo. V transduciranih celicah LCL se s tem poveča število celičnih delitev in zmanjša indukcija apoptoze (16, 17). Modulacija omenjenih signalnih poti vodi v stabilen proliferativni fenotip, značilen za LCL ter ob hkratnem učinkovitem izmikanju imunskemu odzivu predstavlja temelj za imortalizacijo LCL in patogenezo okužbe z EBV (17, 18, 23–26).

3 UPORABA LCL KOT MODELA *IN VITRO*

Za proučevanje molekularnih mehanizmov patofiziologije in delovanja učinkovin v predkliničnih fazah razvoja raziskovalci pogosto uporabljajo LCL. LCL predstavljajo relevanten model za proučevanje onkogenega potenciala EBV (27), saj je transdukcija limfocitov B v pogojih *in vitro* podobna procesu onkogeneze *in vivo* (17). Ker LCL ohranjajo stabilen genetski zapis posameznika, so primeren model za genomske, transkriptomске in farmakogenomske raziskave. To je privedlo do vzpostavitve več obsežnih biobank, ki vključujejo celične linije dobro okarakteriziranih kohort ter omogočajo primerjavo podatkov o genotipu in fenotipu med populacijami (27).

Ena najpomembnejših biobank LCL je HapMap (angl. *Cell Repository of the Coriell Institute for Medical Research HapMap*), ki je nastala v okviru mednarodnega projekta HapMap z namenom popisa najpogostejših genetskih različic v človeškem genomu. Biobanka Centra za proučevanje genetskih polimorfizmov pri človeku (fr. *Fondation Jean Dausset – Centre d'Étude du Polymorphisme Humain*, CEPH) vključuje približno 2.200 LCL. Nacionalna korejska biobanka (angl. *National Biobank of Korea*) hrani LCL azijske populacije, izraelska biobanka NLGIP (angl. *National Laboratory for the Genetics of Israeli Populations*) pa vsebuje več kot 2.000 LCL posameznikov iz različnih etničnih skupin srednjega Vzhoda (3, 10, 12, 22).

Obsežne biobanke LCL omogočajo raziskave populacijske genetike, prispevajo k razumevanju mehanizmov nastanka in razvoja bolezni, omogočajo proučevanje medosebnih razlik v odzivu na zdravilne učinkovine ter

podpirajo razvoj novih diagnostičnih postopkov v okviru personalizirane medicine (3, 21, 27–29). Njihova prednost v farmakogenomskih raziskavah je predvsem dostop do celic kontroliranega porekla z različnimi genotipi, vrednotenje celičnih odzivov na zdravilno učinkovino ter povezovalje eksperimentalnih rezultatov z obstoječimi genetskimi podatkovnimi bazami različnih populacijskih kohort, kot je HapMap (1, 3, 21).

LCL so izjemno pomembno orodje *in vitro* saj predstavljajo praktično neomejen vir celic in omogočajo vpogled v genetske dejavnike, ki vplivajo na učinkovitost in varnost zdravil. Kot model so jih uporabili pri identifikaciji gena *CHL1* kot označevalca za odziv posameznikov na paroksetin (30). Uporabili so ga tudi za proučevanje občutljivosti na 6-merkaptopurin in vloge encima tiopurin S-metiltransferaze (31). LCL omogočajo identifikacijo genetskih različic posameznika, povezanih s farmakološkimi fenotipi (32). V translacijskih raziskavah LCL uporabljajo tudi za validacijo kliničnih ugotovitev ter proučevanje kombinacij zdravil, zlasti na področju onkologije, kjer omogočajo analizo molekularnih mehanizmov sinergističnega delovanja zdravilnih učinkovin in dodatno razširjajo uporabnost tega modela v farmakogenetskih raziskavah (10, 31).

Raziskovalci uporabljajo LCL kot eksperimentalni model v predkliničnih študijah za povezovanje genotipa, transkripcijskega profila in celičnega odziva na zdravilne učinkovine. Tak pristop uporabljajo v onkologiji za analizo regulacije ekspresije genov družine SLC (angl. *solute carrier*). Ugotovili so, da različice genov *SLC* pomembno vplivajo na občutljivost celic na paklitaksel. S pomočjo LCL so vrednotili citotoksičnost protitumornih učinkovin, kot so karboplatin, gemcitabin, citarabin, arabinozid, tamoksifen in 5-fluorouracil, ter proučevali odziv celic z mutacijami genov *BRCA1* in *BRCA2* na radioterapijo, kar je prispevalo k boljšemu razumevanju interindividualnih razlik v odzivu na zdravljenje (10, 27, 32–35).

Uporabnost modela LCL potrjuje tudi študija, ki je proučevala genetsko pogojene razlike med posamezniki v odzivu na 29 protitumornih zdravilnih učinkovin v LCL 520 darovalcev (36). Ugotovili so, da lahko z uporabo LCL identificiramo genetske biološke označevalce občutljivosti in odpornosti na protitumorne učinkovine. V študiji so identificirali povezavo med občutljivostjo na temozolomid, DNA-alkilirajočo protitumorno učinkovino, in genetsko različico v genu *MGMT*, ki zapisuje metilgvanin metiltransferazo (MGMT). Ta povezava odraža dobro uveljavljeno vlogo encima MGMT pri popravljanju alkilacijskih poškodb DNA, ki jih povzroča temozolomid, in je skladna s kliničnimi opažanji (37).

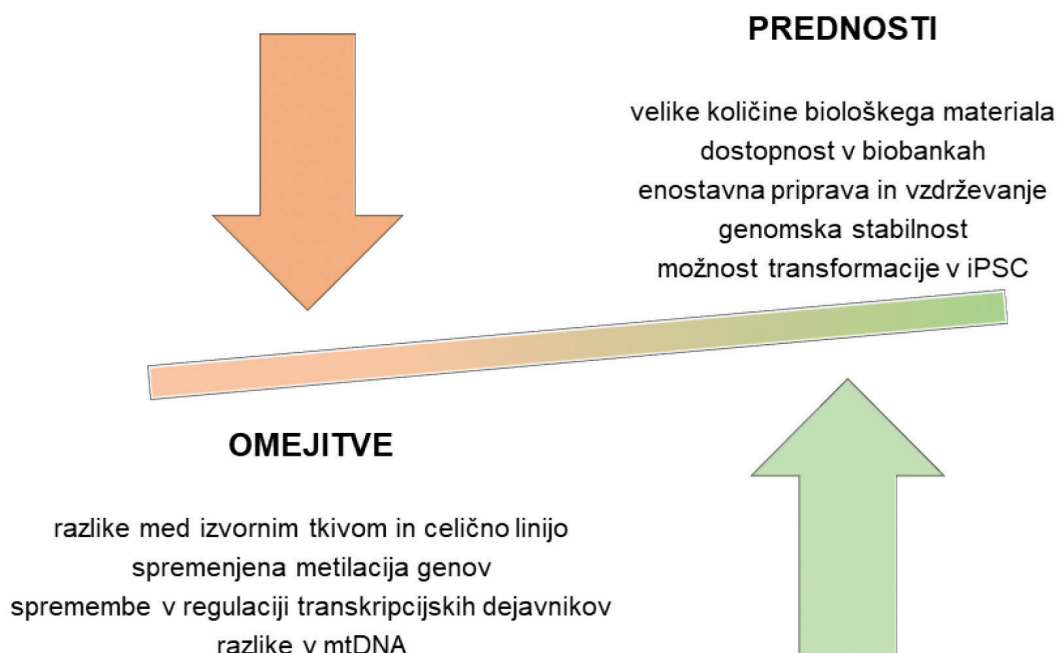
Uporabnost LCL sega tudi na področje raziskav srčno-žilnih bolezni, kjer so pri preučevanju statinov pokazali, da razlike med posamezniki v odzivu niso povezane z aktivnostjo encima HMG-CoA reduktaze, temveč predvsem s polimorfizmi v genu za receptor za lipoproteine nizke gostote (27, 38). LCL predstavljajo dragocen model tudi pri raziskavah nevroloških in nevrodegenerativnih bolezni, kjer omogočajo proučevanje epigenetskih sprememb, kot je hipermetilacija DNA, značilna za razvoj Alzheimerjeve bolezni in različnih oblik demence (39). Pri nevropsihiatričnih motnjah, zaznamovanih s heterogenostjo, oteženim diagnosticiranjem ter zapletenimi interakcijami med genetskimi lokusi in vplivi okolja, LCL omogočajo neposredno analizo celičnih mehanizmov bolezni in služijo kot izhodni material za reprogramiranje v iPSC (40–41). Z reprogramiranjem LCL v iPSC so proučevali tudi vpliv genetskih polimorfizmov v genih *FUS* in *ANXA11* na mehanizme bolezni amiotrofične lateralne skleroze (ALS), ki prizadene možgane in hrbtenjačo (42).

Pri redkih boleznih LCL omogočajo vpogled v molekularne mehanizme patogeneze in analizo genetskih polimorfizmov, značilnih za posamezno bolezen, kot so polimorfizmi v ge-

nih *TREM2* in *DAP12* pri bolezni Nasu–Hakola (43), v genu *MeCP2* pri Rettovem sindromu (44) ter v genu *LAMP-2* pri Danonovi bolezni (45).

LCL so omogočili neposredno proučevanje vloge EBV pri multipli sklerozi. Nedavne raziskave spontano nastalih LCL bolnikov z aktivno multiplo sklerozo so identificirale značilne spremembe v izražanju virusnih in gostiteljskih genov ter povečano vnetno aktivnost (22, 46, 47). Zaviralci EBNA1 so selektivno zavirali proliferacijo EBV-pozitivnih LCL bolnikov z multiplo sklerozo, kar bi lahko prispevalo k razvoju novih tarčnih terapevtskih pristopov (4).

Celice LCL izkazujejo potencial tudi v toksikoloških študijah (48, 49). Predstavljajo zanesljiv testni sistem *in vitro* za vrednotenje imunomodulatornih lastnosti spojin ter omogočajo vpogled v interindividualno variabilnost odziva na določeno spojino (50, 51). LCL imajo pomembno vlogo tudi pri ocenjevanju genotoksičnosti spojin, pri čemer je celična linija TK6 uveljavljena kot zanesljiv model za proučevanje poškodb DNA, mutagenosti in celičnih odzivov na genotoksične zdravilne učinkovine *in vitro*. LCL TK6 in MCL-5 so uporabili tudi v integriranem pristopu *in vitro*, ki omogoča zanesljivejšo razlikovanje med



Slika 3: Shematski prikaz prednosti in omejitev uporabe limfoblastoidnih celičnih linij v predkliničnih študijah (limfoblastoidne celične linije – LCL, inducirane pluripotentne matične celice – iPSC, mitohondrijska DNA – mtDNA). Povzeto po (52–56).

Figure 3: Schematic presentation of the advantages and limitations of lymphoblastoid cell lines utilization in preclinical studies (lymphoblastoid cell lines – LCLs, induced pluripotent stem cells – iPSC, mitochondrial DNA – mtDNA). Adapted by (52–56).

genotoksičnimi in negenotoksičnimi karcinogeni ter nekarcinogeni (48).

4 PREDNOSTI IN OMEJITVE LIMFOBLASTOIDNIH CELIČNIH LINIJ

Tako kot vsi celični modeli imajo tudi LCL svoje prednosti in pomanjkljivosti (slika 3). Prednosti LCL so relativno enostavna vzpostavitev iz periferne krvi darovalcev ali iz krio-prezerviranih PBMC ter visoka uspešnost transdukcije. LCL rastejo v suspenziji in so preproste za vzdrževanje. Predstavljajo neomejen vir celic, DNA, RNA in proteinov darovalcev ter so primerne za dolgoročno shranjevanje v obsežnih biobankah, kar omogoča nadaljnje raziskave (52). Poleg prednosti ima uporaba LCL v predkliničnih študijah tudi določene omejitve. Postopek transdukcije privede do sprememb v celičnem ciklu, regulaciji transkripcijskih dejavnikov, sprememb metilacije določenih genov in mitohondrijske DNA (52–54). LCL niso primeren celični model za proučevanje fiziološkega delovanja limfocitov B, saj ne zajamejo vseh podskupin limfocitov B (54). Prav tako LCL niso primeren celični model za proučevanje presnove zdravih učinkovin zaradi odsotnosti ali nizkega izražanja encimov družine CYP450. Med pomembne omejitve sodijo tudi variabilnost v hitrosti rasti celic, število kopij EBV v celici ter bazalne ravni ATP; ti dejavniki lahko vplivajo na odziv na zdravilne učinkovine in dodatno otežijo interpretacijo rezultatov. Nedavne raziskave so pokazale, da moramo biti pozorni pri interpretaciji rezultatov analiz mitohondrijske DNA, izolirane iz LCL (55). Primerjalne raziskave metilacije DNA med vzorci krvi in LCL so ugotovile, da LCL niso primerni za proučevanje metilacije genov (56). Izkazalo se je tudi, da se transkripcijski dejavniki in nekatere regulatorne poti med LCL in polno krvjo razlikujejo, zato je pri interpretaciji podatkov, pridobljenih na celičnih linijah LCL, potrebna previdnost (52).

5 SKLEP

LCL so uveljavljen in metodološko dostopen model *in vitro*, ki pomembno prispeva k razumevanju genetsko pogojenih razlik v odzivu na zdravilne učinkovine ter podpira temeljna

načela personalizirane medicine. Njihove ključne prednosti so relativno preprosta vzpostavitev iz periferne krvi, visoka uspešnost transdukcije, enostavno vzdrževanje ter ohranjanje genetskih značilnosti darovalca. V povezavi z obsežnimi biobankami LCL omogočajo sistematične farmakogenomske, genomske in transkriptomске raziskave ter povezovanje genotipa s celičnim fenotipom in odzivom na zdravilne učinkovine.

Kljub široki uporabnosti imajo LCL pomembne omejitve, povezane predvsem z vplivom transdukcije z EBV na celični cikel, regulacijo transkripcije, epigenetske vzorce in presnovne poti. Zaradi odsotnosti ali nizkega izražanja encimov družine CYP450 LCL niso primeren model za proučevanje presnove zdravih učinkovin, dodatno pa interpretacijo rezultatov otežujejo variabilnost rasti, število kopij EBV in spremembe v mitohondrijski DNA. Zato je uporaba LCL najprimernejša kot del komplementarnega nabora celičnih modelov.

V prihodnosti bo vloga LCL v personalizirani medicini predvsem v integraciji farmakogenomskih podatkov z drugimi pristopi "omik", razvoju napovednih modelov na osnovi umetne inteligence ter pri identificiranju in funkcijski validaciji bioloških označevalcev učinkovitosti in toksičnosti zdravih učinkovin. Kot povezava med temeljnimi raziskavami in klinično prakso bodo LCL tudi v prihodnje pomemben podporni model *in vitro* pri razvoju varnejših in učinkovitejših terapevtskih pristopov, prilagojenih posamezniku.

6 LITERATURA

1. Brlek P, Bulić L, Bračić M, Projić P, Škaro V, Shah N, et al. Implementing Whole Genome Sequencing (WGS) in Clinical Practice: Advantages, Challenges, and Future Perspectives. *Cells*. 2024 Mar 13;13(6):504.
2. Manzari MT, Shamay Y, Kiguchi H, Rosen N, Scaltriti M, Heller DA. Targeted drug delivery strategies for precision medicines. *Nat Rev Mater*. 2021 Feb 2;6(4):351–70.
3. Gurwitz D. Human lymphoblastoid cell lines: a valuable tool for personalized medicine research. *The Biochemist*. 2016 Feb 1;38(1):6–9.
4. Johnson KB, Wei W, Weeraratne D, Frisse ME, Misulis K, Rhee K, et al. Precision Medicine, AI, and the Future of Personalized Health Care. *Clinical Translational Sci*. 2021 Jan;14(1):86–93.
5. Primorac D, Bach-Rojecky L, Vadunec D, Juginić A, Žunić K, Matišić V, et al. Pharmacogenomics at the center of precision medicine: challenges and perspective in an era of Big Data. *Pharmacogenomics*. 2020 Jan 1;21(2):141–56.
6. Singh N, Vayer P, Tanwar S, Poyet JL, Tsaioun K, Villoutreix BO. Drug discovery and development: introduction to the general public and patient groups. *Front Drug Discov*. 2023 May 24;3:1201419.

7. Yin X, Li Q, Shu Y, Wang H, Thomas B, Maxwell JT, et al. Exploiting urine-derived induced pluripotent stem cells for advancing precision medicine in cell therapy, disease modeling, and drug testing. *J Biomed Sci.* 2024 May 9;31(1):47.
8. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell.* 2007 Nov;131(5):861–72.
9. Rotman Primec J, Krajšek Z, Urbančič D NZ. Inducirane pluripotentne matične celice pri odkrivanju in vrednotenju zdravilnih učinkovin. *Farm Vestn.* 2025 maj;39(1): 39–48.
10. Jeon JP. Human Lymphoblastoid Cell Lines in Pharmacogenomics. In: *Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine* [Internet]. Elsevier; 2014 [cited 2021 May 6]. p. 89–110. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123868824000062>
11. Kuang YL, Theusch E, M Krauss R, W Medina M. Identifying genetic modulators of statin response using subject-derived lymphoblastoid cell lines. *Pharmacogenomics* [Internet]. 2021 May [cited 2024 Dec 5];22(7). Available from: <https://www.webofscience.com/wos/woscc/summary/21250a4d-779d-47e7-8c00-62e0af3f1783-0132409796/relevance/1>
12. Gurwitz D, Steeg R. Enriching iPSC research diversity: Harnessing human biobank collections for improved ethnic representation. *Drug Development Research.* 2024 Aug;85(5):e22227.
13. Voloshin N, Tyurin-Kuzmin P, Karagyaur M, Akopyan Z, Kulebyakin K. Practical Use of Immortalized Cells in Medicine: Current Advances and Future Perspectives. *IJMS.* 2023 Aug 12;24(16):12716.
14. Ding T, Du Y, Yang B, Tian W, Li J, Xie J. Comprehensive review of macrophage models: primary cells and immortalized lines across species. *Front Immunol.* 2025;16:1640935.
15. Ingber DE. Human organs-on-chips for disease modelling, drug development and personalized medicine. *Nat Rev Genet.* 2022 Aug;23(8):467–91.
16. Zhai J, Liu Y, Ji W, Huang X, Wang P, Li Y, et al. Drug screening on digital microfluidics for cancer precision medicine. *Nat Commun.* 2024 May 22;15(1):4363.
17. Mrozek-Gorska P, Buschle A, Pich D, Schwarzmayer T, Fechtner R, Scialdone A, et al. Epstein–Barr virus reprograms human B lymphocytes immediately in the prelatent phase of infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019 Aug 6;116(32):16046–55.
18. Miller G. Immortalization of Human Lymphocytes by Epstein-Barr Virus. *Yale J. Biol. Med.* 1982 May-Aug; 55(3-4): 305–3106.
19. Okugawa K, Itoh T, Kawashima I, Takesako K, Mazda O, Nukaya I, et al. Recognition of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma cells by cytotoxic T lymphocytes induced in vitro with autologous lymphoblastoid cell line and LMP2-derived, HLA-A24-restricted 9-mer peptide. *Oncol Rep.* 2004 Oct;12(4):725–31.
20. Bu GL, Xie C, Kang YF, Zeng MS, Sun C. How EBV Infects: The Tropism and Underlying Molecular Mechanism for Viral Infection. *Viruses.* 2022 Oct 27;14(11):2372.
21. Adeniran AA, Giovannoni G, Baker D, James LK. Epstein–Barr virus and spontaneous lymphoblastoid cell lines: establishment, molecular characteristics, immune modulation, and therapeutic insight. *Clin Exp Immunol.* 2025 Jan 1;219(1):uxaf061.
22. Nam HY, Shim SM, Han BG, Jeon JP. Human lymphoblastoid cell lines: a goldmine for the biobankomics era. *Pharmacogenomics.* 2011 June;12(6):907–17.
23. Adeniran AA, Giovannoni G, Baker D, James LK. Epstein–Barr virus and spontaneous lymphoblastoid cell lines: establishment, molecular characteristics, immune modulation, and therapeutic insight. *Clin Exp Immunol.* 2025 Jan 1;219(1):uxaf061.
24. Ikeda M, Hayes CK, Schaller SJ, Longnecker R. Latent membrane proteins from EBV differentially target cellular pathways to accelerate MYC-induced lymphomagenesis. *Blood Adv.* 2022 July 22;6(14):4283–96.
25. Dheekollu J, Wiedmer A, Ayyanathan K, Deakynne JS, Messick TE, Lieberman PM. Cell-cycle-dependent EBNA1-DNA crosslinking promotes replication termination at oriP and viral episome maintenance. *Cell.* 2021 Feb 4;184(3):643–654.e13.
26. Matsuura K, Jigami T, Taniue K, Morishita Y, Adachi S, Senda T, et al. Identification of a link between Wnt/ β -catenin signalling and the cell fusion pathway. *Nature Communications.* 2011 Nov 22;2:548.
27. Kapp U, Yeh WC, Patterson B, Elia AJ, Kägi D, Ho A, et al. Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J Exp Med.* 1999 June 21;189(12):1939–45.
28. Wheeler HE, and Dolan ME. Lymphoblastoid Cell Lines in Pharmacogenomic Discovery and Clinical Translation. *Pharmacogenomics.* 2012 Jan 1;13(1):55–70.
29. Stark AL, and Dolan ME. Lymphoblastoid Cell Lines in Pharmacogenomics: How Applicable are They to Clinical Outcomes? *Pharmacogenomics.* 2013 Apr 1;14(5):447–50.
30. Morag A, Pasmanik-Chor M, Oron-Karni V, Rehavi M, Stingl JC, Gurwitz D. Genome-wide expression profiling of human lymphoblastoid cell lines identifies CHL1 as a putative SSRI antidepressant response biomarker. *Pharmacogenomics.* 2011; 12(2):171–184.
31. Urbančič D, Šmid A, Alenka, Stocco G, Gabriele, Decorti G, Giuliana, Mlinarič-Rašcan J, Irena, and Karas Kuželčki N. Novel motif of variable number of tandem repeats in TPMT promoter region and evolutionary association of variable number of tandem repeats with TPMT*3 alleles. *Pharmacogenomics.* 2018 Nov 1;19(17):1311–22.
32. Green AJ, Anchang B, Akhtari FS, Reif DM, Motsinger-Reif A. Extending the lymphoblastoid cell line model for drug combination pharmacogenomics. *Pharmacogenomics.* 2021 June;22(9):543–51.
33. Ozgyin L, Horvath A, Hevessy Z, Balint BL. Extensive epigenetic and transcriptomic variability between genetically identical human B-lymphoblastoid cells with implications in pharmacogenomics research. *Sci Rep.* 2019 Mar 20;9(1):4889.
34. Morrison G, Lenkala D, LaCroix B, Ziliak D, Abramson V, Morrow PK, et al. Utility of patient-derived lymphoblastoid cell lines as an ex vivo capecitabine sensitivity prediction model for breast cancer patients. *Oncotarget.* 2016 June 21;7(25):38359–66.
35. Lovelock PK, Wong EM, Sprung CN, Marsh A, Hobson K, French JD, et al. Prediction of BRCA1 and BRCA2 mutation status using post-irradiation assays of lymphoblastoid cell lines is compromised by inter-cell-line phenotypic variability. *Breast Cancer Res Treat.* 2007 Sept;104(3):257–66.
36. Brown CC, Havener TM, Medina MW, Jack JR, Krauss RM, McLeod HL, Motsinger-Reif AA. Genome-wide association and pharmacological profiling of 29 anticancer agents using lymphoblastoid cell lines. *Pharmacogenomics.* 2014 Feb;15(2):137–46.
37. Brown CC, Havener TM, Medina MW, Auman JT, Mangravite LM, Krauss RM, et al. A genome-wide association analysis of temozolomide response using lymphoblastoid cell lines shows a clinically relevant association with MGMT. *Pharmacogenetics and Genomics.* 2012 Nov;22(11):796.

38. Zheng E, Madura P, Grandos J, Broncel M, Pawlos A, Woźniak E, et al. When the same treatment has different response: The role of pharmacogenomics in statin therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2024 Jan 1;170:115966.
39. Ramos-Campoy O, Llado A, Bosch B, Ferrer M, Perez-Millan A, Vergara M, et al. Differential Gene Expression in Sporadic and Genetic Forms of Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia in Brain Tissue and Lymphoblastoid Cell Lines. *Mol Neurobiol*. 2022 Oct;59(10):6411–28.
40. Fujimori K, Tezuka T, Ishiura H, Mitsui J, Doi K, Yoshimura J, et al. Modeling neurological diseases with induced pluripotent cells reprogrammed from immortalized lymphoblastoid cell lines. *Mol Brain*. 2016 Oct 3;9:88.
41. Fries GR, Colpo GD, Monroy-Jaramillo N, Zhao J, Zhao Z, Arnold JG, et al. Distinct lithium-induced gene expression effects in lymphoblastoid cell lines from patients with bipolar disorder. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2017 Nov;27(11):1110–9.
42. Hedges EC, Topp S, Shaw CE, Nishimura AL. Generation of six induced pluripotent stem cell lines from patients with amyotrophic lateral sclerosis with associated genetic mutations in either FUS or ANXA11. *Stem Cell Res*. 2021 Apr;52:102246.
43. De Palma A, Agresta AM, Viglio S, Rossi R, D'Amato M, Di Silvestre D, et al. A Shotgun Proteomic Platform for a Global Mapping of Lymphoblastoid Cells to Gain Insight into Nasu-Hakola Disease. *Int J Mol Sci*. 2021 Sept;22(18):9959.
44. Battisti C, Formichi P, Tripodi SA, Meloni I, Mangiavacchi P, Zappella M, et al. Lymphoblastoid cell lines of Rett syndrome patients exposed to oxidative-stress-induced apoptosis. *Brain Dev*. 2004 Sept;26(6):384–8.
45. Sanchez-Lanzas R, Alvarez-Castelao B, Bermejo T, Ayuso T, Tunon T, Castano JG. Protein degradation in a LAMP-2-deficient B-lymphoblastoid cell line from a patient with Danon disease. *Biochim Biophys Acta-Mol Basis Dis*. 2016 Aug;1862(8):1423–32.
46. Soldan SS, Su C, Monaco MC, Yoon L, Kannan T, Zankharia U, et al. Multiple sclerosis patient-derived spontaneous B cells have distinct EBV and host gene expression profiles in active disease. *Nat Microbiol*. 2024 June;9(6):1540–54.
47. Monaco MCG, Soldan SS, Su C, Clauze A, Cooper JF, Patel RJ, et al. EBNA1 Inhibitors Block Proliferation of Spontaneous Lymphoblastoid Cell Lines From Patients With Multiple Sclerosis and Healthy Controls. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2023 Aug 10;10(5):e200149.
48. Chapman KE, Shah UK, Fletcher JF, Johnson GE, Doak SH, Jenkins GJS. An integrated in vitro carcinogenicity test that distinguishes between genotoxic carcinogens, non-genotoxic carcinogens, and non-carcinogens. *Mutagenesis*. 2024 Mar 12;39(2):69–77.
49. Bolt AM, Douglas RM, Klimecki WT. Arsenite exposure in human lymphoblastoid cell lines induces autophagy and coordinated induction of lysosomal genes. *Toxicol Lett*. 2010 Nov 30;199(2):153–9.
50. Marković T, Gobec M, Gurwitz D, Mlinarič-Raščan I. Characterization of human lymphoblastoid cell lines as a novel in vitro test system to predict the immunotoxicity of xenobiotics. *Toxicol Lett*. 2015 Feb 17;233(1):8–15.
51. Klopčič I, Marković T, Mlinarič-Raščan I, Dolenc MS. Endocrine disrupting activities and immunomodulatory effects in lymphoblastoid cell lines of diclofenac, 4-hydroxydiclofenac and paracetamol. *Toxicol Lett*. 2018 Sept 15;294:95–104.
52. Lopes-Ramos CM, Paulson JN, Chen CY, Kuijjer ML, Fagny M, Platig J, et al. Regulatory network changes between cell lines and their tissues of origin. *BMC Genomics*. 2017 Dec;18(1):723.
53. Joesch-Cohen LM, Glusman G. Differences between the genomes of lymphoblastoid cell lines and blood-derived samples. *Adv Genomics Genet*. 2017;7:1–9.
54. MacKinnon C, McLean R, Pritchard AL. Lymphoblastoid cell lines do not recapitulate physiological circulating B cell subtypes. *Curr Res Immunol*. 2024 June 8;5:100079.
55. Liu C, Fetterman JL, Sun X, Yan K, Liu P, Luo Y, et al. Comparison of mitochondrial DNA sequences from whole blood and lymphoblastoid cell lines. *Sci Rep*. 2022 Feb 2;12(1):1801.
56. Brennan EP, Ehrich M, Brazil DP, Crean JK, Murphy M, Sadlier DM, et al. Comparative analysis of DNA methylation profiles in peripheral blood leukocytes versus lymphoblastoid cell lines. *Epigenetics*. 2009 Apr 30;4(3):159–64.