

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JACQUELINE KAJTNA

MAGISTRSKO DELO

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JACQUELINE KAJTNA

**ANALIZA IZRAŽANJA GENOV PODENOT PROTEASOMA IN
IMUNOPROTEASOMA V CELICAH MIŠJEGA MODELA SISTEMSKEGA
LUPUSA ERITEMATOZUSA**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

**ANALYSIS OF GENE EXPRESSION OF THE PROTEASOME AND
IMMUNOPROTEASOME SUBUNITS IN A MURINE MODEL OF
SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS**

UNIFORM MASTER'S STUDY PROGRAMME PHARMACY

Ljubljana, 2017

Magistrsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za klinično biokemijo pod mentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič-Raščan, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Alenke Šmid, mag. farm. Vzorce mišjih celic, ki smo jih uporabili pri eksperimentih, smo pridobili v okviru sodelovanja z dr. Tejo Čelhar iz inštituta Singapore Immunology Network.

Zahvala

Najprej bi se rada zahvalila mentorici prof. dr. Ireni Mlinarič-Raščan, mag. farm., ki mi je omogočila izdelavo magistrske naloge na želenem področju ter mi pomagala s številnimi strokovnimi nasveti. Prav tako se zahvaljujem somentorici asist. dr. Alenki Šmid, mag. farm. za pomoč pri eksperimentalnem delu, dostopnost in nasvete.

Za neomajno podporo se zahvaljujem tudi svojim domačim in fantu Ivanu. Zahvala tudi mojim puncam za družbo v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelala samostojno pod vodstvom mentorice prof. dr. Irene Mlinarič-Raščan, mag. farm. in somentorice asist. dr. Alenke Šmid, mag. farm.

Ljubljana, 2017

Jacqueline Kajtna

Komisija za zagovor

Predsednik: prof. dr. Danijel Kikelj, mag. farm.

Mentorica: prof. dr. Irena Mlinarič-Raščan, mag. farm.

Somentorica: asist. dr. Alenka Šmid, mag. farm.

Članica: asist. dr. Meta Kokalj Ladan, mag. farm., univ. dipl. fiz.

KAZALO VSEBINE

KAZALO SLIK.....	III
KAZALO TABEL	IV
POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1 UVOD.....	1
1.1 Lupus	1
1.1.1 Klinični znaki	1
1.1.2 Klasifikacija.....	2
1.1.3 Diagnoza.....	2
1.1.4 Vzroki za nastanek lupusa	4
1.1.5 Imunske osnove	5
1.1.6 Terapija.....	7
1.2 Mišji model lupusa.....	7
1.2.1 B6. <i>Sle1</i> Tg7	8
1.3 Proteasom in imunoproteasom.....	8
1.3.1 Struktura	9
1.3.2 Udeleženos proteasoma in imunoproteasoma v imunskem sistemu	11
1.4 Zaviralci imunoproteasoma	13
2 NAMEN DELA	15
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 Materiali.....	16
3.1.1 Kemikalije	16
3.1.2 Pufri	16
3.1.3 Kompleti	17

3.1.4	Laboratorijska oprema	17
3.2	Metode dela.....	18
3.2.1	Vzorci	18
3.2.2	Izolacija RNA	18
3.2.3	Določanje koncentracije RNA.....	19
3.2.4	Reverzna transkripcija	19
3.2.5	Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času	21
3.2.5.1	Priprava standardov	23
3.2.5.2	Učinkovitost pomnoževanja in pogoji za qPCR	24
3.2.5.3	qPCR vzorcev.....	26
3.2.5.4	Referenčni geni in normalizacija.....	26
3.2.6	Agarozna gelska elektroforeza	27
3.3	Statistična analiza rezultatov	28
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	29
4.1	Karakterizacija celic.....	29
4.2	Živost dendritičnih celic po inkubaciji z zaviralci	30
4.3	Optimizacija metode qPCR.....	31
4.3.1	Optimizacija koncentracije začetnikov in njihove temperature prileganja ...	31
4.3.2	Izbor referenčnih genov in normalizacija.....	34
4.4	Analiza izražanja genov podenot proteasoma in imunoproteasoma.....	35
4.4.1	Izražanje genov v dendritičnih celicah	35
4.4.2	Vpliv zaviralcev podenote $\beta 5i$ na izražanje genov v dendritičnih celicah	36
4.4.3	Izražanje genov v različnih tipih celic.....	41
5	SKLEP.....	45
6	LITERATURA	47

KAZALO SLIK

Slika 1: Pojav avtoprotiteles pred diagnozo.	3
Slika 2: Poenostavljen prikaz procesov, ki prispevajo k patogenezi lupusa.	6
Slika 3: Potek pripenjanja molekule ubikvitina (Ub) na tarčni protein.	9
Slika 4: Struktura 30S proteasoma.	10
Slika 5: Sestava 20S katalitičnega jedra imunoproteasoma in timoproteasoma z označenimi proteolitičnimi podenotami $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ in $\beta 5t$	11
Slika 6: Signalna pot NF- κ B.	12
Slika 7: Prikaz naraščanja fluorescence v odvisnosti od števila ciklov pri qPCR.	23
Slika 8: Rezultati pretočne citometrije pri določanju fenotipa dendritičnih celic po sedmih dneh gojenja <i>in vitro</i>	29
Slika 9: Rezultati ločevanja preučevanih celic s pretočnim citometrom.	30
Slika 10: Prikaz živosti dendritičnih celic skupine z lupusom in kontrolne skupine, po 24-urni izpostavljenosti spojinam 37, 75 in PR-975 ter neizpostavljenih celic.	31
Slika 11: Talilna krivulja standardov po qPCR z oligonukleotidnim začetnikom mBeta1.	32
Slika 12: Relativna genska ekspresija podenot proteasoma in imunoproteasoma pri miših z lupusom in kontrolnih miših v dendritičnih celicah.	36
Slika 13: Izražanje genov za podenote proteasoma in imunoproteasoma v dendritičnih celicah miši po inkubaciji s spojino 37.	37
Slika 14: Izražanje genov za podenote proteasoma in imunoproteasoma v dendritičnih celicah miši po inkubaciji s spojino 75.	39
Slika 15: Izražanje genov za podenote proteasoma in imunoproteasoma v dendritičnih celicah miši po inkubaciji s spojino PR-957.	40
Slika 16: Izražanje genov za podenote proteasoma in imunoproteasoma pri miših z lupusom in kontrolnih miših v limfocitih T , limfocitih B, monocitih in granulocitih.	43

KAZALO TABEL

Tabela I: Oznake, strukture in molekulske mase molekul, ki smo jih uporabili pri eksperimentu.....	14
Tabela II: Priprava osnovne zmesi za reverzno transkripcijo.....	20
Tabela III: Program za prepis RNA v cDNA.	20
Tabela IV: Sestava osnovnih zmesi za qPCR.....	21
Tabela V: Koncentracije uporabljenih standardov.	23
Tabela VI: Prikaz sekvence in temperature tališča (T_m) začetnikov za izražanje genov za podenote proteasoma in imunoproteasoma.	24
Tabela VII: Program za analizo izražanja genov <i>Srp72</i> , <i>GAPDH</i> , <i>ACTB</i> , <i>Mrl46</i> , <i>HPRT</i> , <i>PSMB9</i> in <i>PSMB10</i> v SYBR za vse vzorce in program za analizo izražanja gena <i>PSMB8</i> v SYBR v limfocitih T, limfocitih B, monocitih in granulocitih.	25
Tabela VIII: Program za analizo izražanja gena <i>PSMB8</i> v Evagreen v dendritičnih celicah.	25
Tabela IX: Program za analizo izražanja genov <i>PSMB6</i> in <i>PSMB7</i> v Evagreen.	25
Tabela X: Program za analizo izražanja gena <i>PSMB5</i> v Evagreen.	25
Tabela XI: Sestava reakcijske zmesi za qPCR s koncentracijo začetnikov 400nM z uporabo SYBR® Select Master Mix in FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix.....	26
Tabela XII: Prikaz sekvence in temperature tališča (T_m) začetnikov za izražanje referenčnih genov.	27
Tabela XIII: Optimizirani pogoji za izražanje posameznih genov s qPCR v dendritičnih celicah.....	33
Tabela XIV: Optimizirani pogoji za izražanje posameznih genov s qPCR v limfocitih T, limfocitih B, monocitih in granulocitih.	33
Tabela XV: Prikaz učinkovitosti in napake za vsak začetnik pri qPCR v dendritičnih celicah.....	34
Tabela XVI: Prikaz učinkovitosti in napake za vsak začetnik pri qPCR v limfocitih T, limfocitih B, monocitih in granulocitih.	34
Tabela XVII: Vrednosti indeksa stabilnosti za izražanje referenčnih genov.	35

POVZETEK

Lupus je kronična avtoimunska bolezen, kjer imunski sistem prepozna lastne jedrne antigene, v končni fazi pa zaradi nalaganja imunskih kompleksov pride do vnetja in poškodb tkiv in organov. Zdravljenje lupusa je zaenkrat omejeno na lajšanje simptomov. Ker konvencionalna terapija pri več kot 50 % pacientov s sistemskim lupus eritematozus ne uspe nadzirati bolezni, poteka dandanes razvoj novih terapevtskih možnosti, kot so zaviralci proteasoma in imunoproteasoma. Namen eksperimentalnega dela je bil, doprinesi k boljšemu razumevanju izražanja genov za podenote proteasoma in imunoproteasoma po inkubaciji z zaviralci imunoproteasoma in ugotoviti vpletenost različnih celic imunskega sistema pri patogenezi lupusa. Predhodne raziskave so odkrile ugodne učinke selektivne inhibicije $\beta 5i$ podenote na zdravljenje lupusa z ireverzibilnim zaviralcem PR-957 in vodile v razvoj novih zaviralcev na osnovi psoralena, med katerimi sta tudi reverzibilni zaviralec **37** in ireverzibilni zaviralec **75**. Prvi cilj v magistrskem delu je bil preveriti vpliv teh treh zaviralcev na izražanje genov, ki kodirajo podenote proteasoma $\beta 1$, $\beta 2$ in $\beta 5$ ter podenote imunoproteasoma $\beta 1i$, $\beta 2i$ in $\beta 5i$ v dendritičnih celicah mišjega modela lupusa po izpostavljenosti zaviralcem *in vitro*. V dendritičnih celicah je po 24-urni inkubaciji s selektivnima zaviralcema **37** in **75** prišlo do nižjega izražanja podenote $\beta 5i$ pri miših z lupusom in s trendom tudi pri miših iz kontrolne skupine. Hkrati smo opazili trend kompenzacije ekspresije podenote $\beta 5$ kot posledica inhibicije podenote $\beta 5i$ v kontrolni skupini in pri miših z lupusom, vendar so miši z lupusom sposobne manjše kompenzacije. Drugi cilj magistrskega dela je bil ovrednotiti izražanje zgoraj omenjenih podenot proteasoma in imunoproteasoma v različnih tipih imunskih celic mišjega modela lupusa. Celice, ki jih smo jih ovrednotili, so bile monociti, granulociti, limfociti T in limfociti B. Potrdili smo različno izražanje genov za podenote proteasoma in imunoproteasoma pri mišjem modelu lupusa v preučevanih celicah. Izražanje genov za podenote proteasoma je tako pri miših z lupusom kot pri kontrolni skupini najvišje v granulocitih v primerjavi z monociti ter limfociti T in B. Pri miših z lupusom se v granulocitih kaže trend nižjega izražanja v primerjavi s kontrolno skupino pri vseh opazovanih podenotah proteasoma. Nasprotno pa smo v dendritičnih celicah miši z lupusom opazili trend višjega izražanja proteasomskih podenot.

Ključne besede: lupus, proteasom, imunoproteasom, selektivni inhibitorji, analiza izražanja genov

ABSTRACT

Lupus is a chronic autoimmune disease in which the body's immune system primary targets self nuclear antigens and is related to immune complexes deposits within the tissues and organs causing inflammation and injury. Treatment of lupus is mostly limited to relief of symptoms. Since conventional therapy shows suboptimal control in 50 % of patients, today's research is targeted towards discovering new therapeutic approaches such as the proteasome and immunoproteasome inhibitors. In this master's thesis the aim was to develop a better understanding of the gene expression of the proteasome and immunoproteasome subunits after incubation with inhibitors and also to determine the involvement of different cells in the pathogenesis of lupus. Previous research has identified the compound PR-957 as a potent selective inhibitor of the $\beta 5i$ subunit and more recent studies have suggested the psoralene derivatives reversible inhibitor **37** and irreversible inhibitor **75**. In this thesis we have evaluated the effects of these three inhibitors on the gene expression of the $\beta 1$, $\beta 2$ and $\beta 5$ subunits of the proteasome as well as the $\beta 1i$, $\beta 2i$ and $\beta 5i$ subunits of the immunoproteasome in a murine model of lupus. The gene expression studies of the different inhibitors were limited to dendritic cells that were incubated *in vitro*. Our results show that a 24-hour exposure of dendritic cells to the inhibitors **37** and **75** led to a decrease in expression of the $\beta 5i$ subunit. A trend of decrease in gene expression was also noticed in the control group. We also observed a trend of a compensatory mechanism in the upregulation of the $\beta 5$ subunit in both control and lupus groups as a consequence of the inhibition of the $\beta 5i$ subunit. The lupus prone mice showed a reduced ability in compensating gene expression in comparison with the control group. Additionally, we studied the gene expression of the aforementioned subunits in different kinds of immune cells of the murine lupus model including T and B lymphocytes, monocytes and granulocytes. The relative expression differed among cells and was highest for the proteasome subunits in granulocytes for both lupus and control groups. A trend of lower expression of the $\beta 1$, $\beta 2$ and $\beta 5$ subunits in granulocytes was noticed for lupus prone mice compared to the control group. Contrarily, in dendritic cells the expression of these subunits was higher in the lupus group.

Keywords: lupus, proteasome, immunoproteasome, selective inhibitors, gene expression analysis

SEZNAM OKRAJŠAV

ANA	protitelesa proti jedrnim antigenom
ANOVA	analiza variance
anti-dsDNA	protitelesa proti dvovijačni deoksiribonukleinski kislini
anti-RNP	protitelesa proti ribonukleoproteinu
anti-SM	anti-Smithova protitelesa
BLyS	stimulator limfocitov B
CCLE	kronični kutani lupus eritematosus
cDNA	komplementarna dezoksiribonukleinska kislina
c _p	pražni cikel
DC	dendritične celice
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
E1	encim, ki aktivira ubikvitin
E2	ubikvitin-konjugirajoči encim
E3	ubikvitin-ligaza
IFN- α	interferon α
IFN- γ	interferon γ
IL	interlevkin
I κ B	inhibitor jedrnega dejavnika κ B
KD	20S katalitično jedro
MHC I	glavni histokompatibilnostni kompleks razreda 1
MHC II	glavni histokompatibilnostni kompleks razreda 2
miRNA	mikro RNA
NET	ekstracelularne nevtrofilne pasti, ang. neutrophil extracellular traps
NF- κ B	jedrni dejavnik κ B
PBMC	mononuklearne celice v periferni krvi, ang. peripheral blood mononuclear cell
qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času
RD	regulatorni 19S delec
RNA	ribonukleinska kislina
RNAza	encim, ki katalizira hidrolizo RNA
SLE	sistemski lupus eritematuzus
TLR	Toll-u podobni receptorji
T _t	temperatura tališča
TNF- α	tumor nekrotizirajoči dejavnik α

T _{reg}	regulatorni limfociti T
Ub	ubikvitin
UPS	sistem ubikvitin-proteasom

1 UVOD

1.1 Lupus

Lupus je kronična avtoimunska bolezen, ki se izraža z raznolikimi kliničnimi manifestacijami. Prevalenca bolezni je od 0,4 do 2 na 1000 ljudi v populaciji, 90% obolelih z lupusom pa je ženskega spola. Incidenca lupusa se razlikuje po posameznih etničnih skupinah. V zahodni Evropi je incidenca višja pri ženskah afro-karibskega porekla v primerjavi z ženskami kavkazijskega rodu (1,2,3).

Lupus karakterizirajo spremembe v imunskem odzivu, ki vključujejo okvare v celični signalizaciji, spremembe v imunski toleranci, moteno odstranjevanje apoptotičnih celic in okvare v delovanju regulatornih limfocitov T (T_{reg}). Zmanjšano število T_{reg} , vodi v proliferacijo limfocitov B, ki povzročijo sproščanje protiteles. Vezava protiteles z antigeni vodi v nastanek imunskih kompleksov, ki so odgovorni za vnetje in poškodbe organov, tudi zaradi motenega odstranjevanja imunskih kompleksov. Prav tako so pri lupusu vidne spremembe pri citokinih, kjer je prisotna visoka ekspresija predvsem interferona α (IFN- α) in interferona γ (IFN- γ) (1,4).

1.1.1 Klinični znaki

Pogosti zgodnji simptomi lupusa so nespecifični in vključujejo izčrpanost in gripi podobne simptome, kot so bolečina ter povišana temperatura. Včasih so zgodnji simptomi resnejši, pride lahko do vnetja osrčnika, vesplošne bolečine ali pa nevroloških sprememb (2).

V povprečju vsi pacienti z lupusom občutijo spremembe v sklepih in/ali na koži. Prepoznavna kožna sprememba je izpuščaj v obliki metulja na nosu in po licih. Pojavi se pri manj kot polovici pacientov. Najbolj pogosto je izpuščaj široko razširjen čez obraz, dekolte, roke in spodnje okončine. Približno 90 % pacientov s sistemskim lupus eritematosus (SLE) ima bolečine v sklepih, vendar je prisotno manjše vnetje kot pri pacientih z revmatoidnim artritisom. Pri približno polovici bolnikov se pojavijo spremembe v centralnem živčnem sistemu, ki vključujejo vse od migrene do grand mal epilepsije. Okoli 60 % pacientov občuti mialgijo in mišično oslabelost. Pri 20-50 % pacientov so prizadete tudi ledvice. Za aktivno obliko lupusa je značilen vaskulitis. Vnetje obsega predvsem majhne žile in se izrazi kot majhne ishemične lezije na koncu rok in nog (1,2).

1.1.2 Klasifikacija

Ena izmed možnih klasifikacij lupusa je delitev na:

- Sistemski lupus eritematuzus (SLE, ang. systemic lupus erythematosus) je sistemska avtoimunska bolezen karakterizirana s produkcijo vrste avtoprotiteles, nalaganjem imunskih kompleksov in s prizadetimi večimi sistemi. S 50 % pojavnosti je to najbolj pogosta oblika lupusa. Klinični znaki lahko obsegajo vse od milih bolečin v sklepih pa do življenje ogrožajoče odpovedi notranjih organov (4).
- Kutani lupus (ang. cutaneous lupus) je s 40 % pojavnostjo druga najbolj pogosta oblika lupusa. Kronični kutani lupus eritematosus (CCLE) je prisoten pri 90 % vseh bolnikov s kutanim lupusom. Veliko pacientov z CCLE izpolnjuje tudi kriterije za SLE, čisto obliko CCLE pa lahko potrdimo z biopsijo, ki pokaže patološke spremembe ob odsotnosti znakov SLE (4).
- Neonatalni lupus ni prava oblika lupusa. Pojavi se pri 1 od 14 novorojenčkov, katerih mater ima anti-Ro protitelesa, ki preidejo placenti in na novorojenčku povzročijo kožne spremembe ali celo poškodujejo srce (4).
- Lupus kot posledica zdravljenja izginja pri 99 % obolelih v treh mesecih po prekinutvi jemanja zdravila (4).
- Mešana bolezen vezivnih tkiv (ang. mixed connective tissue disease) in sindrom prekrivanja (ang. crossover and overlap syndrome) prizadeneta skupno 10 % bolnikov z lupusom. Pri obeh tipih bolezni bolnik izpolnjuje tako kriterije za SLE kot tudi kriterije za druge imunske bolezni. Obe obliki lahko med seboj ločimo po prisotnosti protiteles proti ribonukleoproteinu (anti-RNP), ki so prisotna pri mešani bolezni vezivnih tkiv (4).

Klasifikacija služi le kot vodilo v klinični praksi, saj se posamezni tipi lupusa med seboj nekoliko prekrivajo. Pogosto se zgodi, da pacient ustreza več kriterijem, ki definirajo različne tipe lupusa (5).

1.1.3 Diagnoza

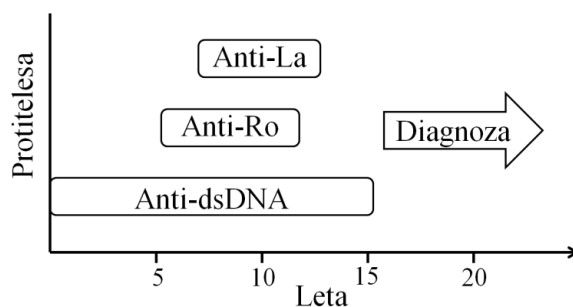
Ameriški kolegij revmatologov (American College of Rheumatology) je definiral test z enajstimi kriteriji, od katerih morajo biti zadovoljeni vsaj štirje, da je pacient klasificiran kot pacient s SLE in je tako lahko vključen v klinične študije. V nasprotju pa so v klinični praksi bolj uporabni laboratorijski testi. Protitelesa proti dvojnovijačni DNA (anti-dsDNA)

so ena izmed najbolj specifičnih protiteles pri pacientih s SLE, vendar niso prisotna ves čas in se pojavijo le pri približno polovici pacientov z lupusom. Anti-dsDNA protitelesa so lahko prisotna tudi pri drugih bolezenskih stanjih (2,6).

Protitelesa proti jedrnim antigenom (ANA) so raznolika skupina protiteles, ki so usmerjena proti jedrnim antigenom. Tudi druge bolezni, kot so Sjögrenov sindrom, revmatoidni artritis in druge avtoimunske bolezni, lahko pokažejo pozitiven test ANA. V redkih primerih je test lahko pozitiven tudi zaradi zdravil, ki povzročijo lupus. Pojavijo se tudi protitelesa proti topnim jedrnim antigenom, ki jih lahko razdelimo v več skupin:

- Anti-Smithova (anti-SM) protitelesa so bolj specifična, vendar diagnostično manj uporabna kot anti-DNA.
- Anti-RNP protitelesa. Ta najdemo pri tipu lupusa mešana bolezen vezivnih tkiv.
- Anti-Ro in anti-La protitelesa. Ta so povezana s Sjögrenovim sindromom, fotosenzitivnostjo in kožnimi izpuščaji. Povezana so tudi z neonatalnim lupusom in prirojenim zastojem srca.

Že pred samim izbruhom bolezni lahko zaznamo prisotnost protiteles anti-Ro, anti-La in anti-dsDNA (Slika 1). Protitelesa anti-dsDNA se lahko pojavijo tudi do 15 let pred postavitvijo diagnoze (2,6).



Slika 1: Pojav avtoprotiteles pred diagnozo. Nekatera avtoprotitelesa (anti-La, anti-Ro, anti-dsDNA) se lahko pojavijo tudi do 15 let pred pojavom kliničnih znakov lupusa. Povzeto po (2).

V krvni sliki je prisotna levkopenija, anemija in včasih trombocitopenija. Med poslabšanji lupusa pogosto upadejo koncentracije faktorjev C3 in C4 komplementnega sistema. Pri tem je potrebno biti pozoren, da bolnik z lupusom nima še drugih genetskih okvar, ki bi vodile do konstantno nizkega nivoja faktorja C4. Z merjenjem C-reaktivnega proteina ločimo med lupusom, kjer so koncentracije nizke in med infekcijo, kjer pride do zvišanja koncentracij.

Z merjenjem serumskega albumina zaznamo nivo proteinurije, ki je najpogostejši zgodnji znak lupusa, pri katerem so prizadete ledvice (2).

1.1.4 Vzroki za nastanek lupusa

Vzrok avtoimunosti pri lupusu je neznan, čedalje več pa je dokazov, da so vzroki za nastanek bolezni povezani z genetskimi, epigenetskimi, hormonskimi in okoljskimi dejavniki. Genetska predispozicija lupusa je bila preučevana na dvojčkih s SLE. Oba monozigotska dvojčka zbolita s 24-57 % verjetnostjo, medtem ko oba heterozigotska le s 3 % verjetnostjo. To na eni strani potrди dejstvo, da na bolezen vpliva genetika, vendar pa verjetnost, da zbolita oba enojajčna dvojčka nakazuje, da so pomembni tudi drugi dejavniki. K nastanku bolezni prispevajo geni, ki so vključeni pri čiščenju imunskih kompleksov in apoptotičnih celic (komplementni sistem, fagocitoza in razgradnja DNA), pri odgovoru pridobljenega imunskega sistema (signalizacija limfocitov T in B, sproščanje citokinov in predstavitev antigenov) in pri odgovoru prirojenega imunskega sistema (signalizacija preko interferona in jedrnega faktorja κB (NF- κB)) (1,5,7).

Vse več je dokazov, da na zagon bolezni vpliva tudi epigenetika. Pri ljudeh so odkrili razlike v metilaciji (hipometilacijo DNA), vpletenost mikro RNA (miRNA) in modifikacije histonov. Posttranslacijske modifikacije histonov bi lahko vplivale na nevtrofilce. Modificirani histoni v nevtrofilcih bi lahko bili vzrok, zakaj nevtrofilci pacientov s SLE večkrat uberejo specifično celično smrt, pri katerem sprostijo DNA in tvorijo ekstracelularne nevtrofilne pasti (NET, ang. neutrophil extracellular traps) (5,8).

Razmerje obolelih žensk v primerjavi z moškimi nakazuje na vlogo spolnih hormonov pri bolezni. Simptomi SLE se poslabšajo pred in med menstruacijo in med ter po nosečnosti pri približno 25 % žensk. Poskusi na miših so pokazali, da izpostavljenost hormonu estrogenu ali progesteronu zviša možnost razvoja SLE. Estradiol podaljša razpolovni čas avtoreaktivnih limfocitov T in B (4,9).

Med okoljske dejavnike spadajo UV žarki, ki so lahko preko metilacije DNA v limfocitih T eden izmed vzrokov nastanka SLE. Tudi infekcije lahko privedejo do izbruha bolezni. SLE se lahko prvič pojavi med ali po preboleli infekciji. Prav tako je bilo pomanjkanje vitamina D povezano z nastankom nekaterih avtoimunskih bolezni, kot je SLE (5,9).

1.1.5 Imunske osnove

Apoptotične celice se po programirani celični smrti (apoptozi) razgradijo na apoptotska telesca, ki vsebujejo modificirane proteine, DNA in RNA (Slika 2). Apoptotska telesca se odstranijo s fagocitozo. Pri SLE se pojavi povečana apoptoza in/ali zmanjšano odstranjevanje apoptotičnih celic. Neodstranjene apoptotične celice stopijo v sekundarno nekrozo, kjer se sprostijo fragmenti celice v okolico. Deli fragmentov se lahko oksidirajo, fosforilirajo, cepijo ali se vežejo z mikroorganizmi in tako postanejo telesu lastni antigeni (5,10).

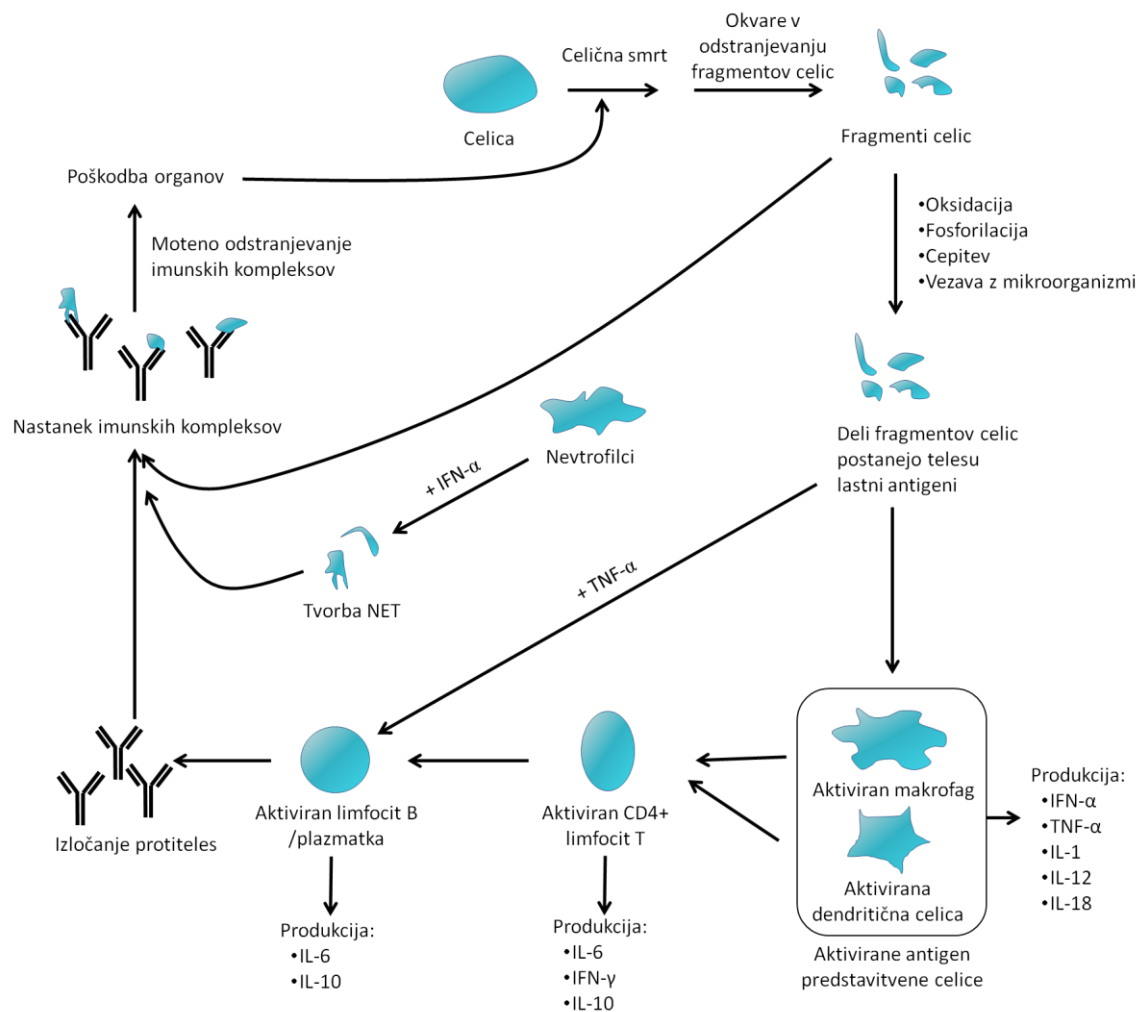
Sproščene avtoantigene fagocitirajo antigen predstavitvene celice (dendritične celice, monociti, makrofagi), ki se aktivirajo in predstavijo procesirane peptidne fragmente avtoreaktivnim $CD4^+$ celicam T pomagalkam. Aktivirane antigen predstavitvene celice sproščajo citokine, ki služijo kot kostimulatorne molekule pri predstavitvi antigenov $CD4^+$ celicam T pomagalkam. Poleg fagocitoze se lahko dendritične celice in makrofagi aktivirajo preko vezave DNA/protein ali RNA/protein kompleksov na receptor TLR. Vezava preko teh receptorjev vodi v produkcijo citokinov, kot so IFN- α , tumor nekrozirajoči dejavnik α (TNF- α), interleukin (IL) 1 in IL-12. Sproščen IFN- α deluje na monocyte in dendritične celice, kjer poveča ekspresijo receptorja TLR, kar vodi v še večjo produkcijo IFN- α . IFN- α spodbudi tudi zorenje dendritičnih celic, ki pa predstavijo avtoantigene celicam T pomagalkam. Aktivirane avtoreaktivne celice T pomagalka povzročijo aktivacijo in diferenciacijo avtoreaktivnih limfocitov B v plazmatke. Plazmatke sproščajo avtoprotitelesa. Vezava DNA/protein in/ali RNA/protein na receptorje TLR limfocitov B in TNF- α kot kostimulativna molekula lahko prav tako aktivirajo limfocite B. Nastali avtoreaktivni limfociti B (avtoreaktivne plazmatke) se pri SLE ne odstranijo z negativno selekcijo zaradi izgube tolerance (5,11).

Pri lupusu naj bi bili vključeni tudi T_{reg} , ki vzdržujejo imunsko homeostazo. T_{reg} so udeleženi pri inhibiciji aktivacije in ekspanzije avtoreaktivnih celic T pomagalk in limfocitov B ter pri aktivaciji antigen predstavitvenih celic. V nekaterih študijah so dokazali, da je njihovo delovanje, število in aktivnost pri lupusu spremenjeno (12).

Poleg apoptoze celic so vir avtoantigenov tudi nevtrofilci, ki so pri pacientih z lupusom spremenjeni. Nevtrofilci imajo antimikrobno funkcijo. Aktivirani nevtrofilci sprostijo DNA in tvorijo NET. IFN- α pri pacientih s SLE povzroči, da nevtrofilci večkrat uporabijo

mehanizem z NET. Nastali kompleksi iz peptidov in DNA, ki se sprostijo v okolico, lahko sprožijo aktivacijo dendritičnih celic in nastajanje imunskih kompleksov (13,14).

Moteno je tudi odstranjevanje imunskih kompleksov in apoptotičnih celic. V končni fazi pride pri lupusu do okvare tkiv in organov, zaradi nalaganja imunskih kompleksov v tkiva, ki povzročijo aktivacijo endotelijskih celic, citokinov in kemokinov (5).



Slika 2: Poenostavljen prikaz procesov, ki prispevajo k patogenezi lupusa. Zaradi motenj v odstranjevanju fragmentov apoptotičnih celic, lahko deli fragmentov postanejo telesu lastni avtoantigeni, ki jih prepoznajo antigen predstavitvene celice in se aktivirajo. Te sproščajo citokine in avtoantigene predstavijo avtoreaktivnim CD4⁺ limfocitom T. Sledi njihova aktivacija, sproščanje citokinov in aktivacija avtoreaktivnih limfocitov B. Ti poleg sproščanja citokinov izločajo protitelesa, ki tvorijo imunske komplekse. Pri lupusu je lahko moteno njihovo odstranjevanje, zato se nalagajo v organe, kjer sprožijo vnetje. Kronično vnetje lahko vodi v okvaro tkiv in organov.

1.1.6 Terapija

SLE je kronična multisistemska bolezen, ki lahko prizadene različne organe in se manifestira z različnimi simptomi. Lahko se pojavi v mili ali težji obliki in se prepleta med izbruhi simptomov in remisijo. Cilj terapije je remisija sistemskih simptomov in organskih manifestacij. Terapija se prilagaja individualnemu pacientu in se poslužuje tako farmakoloških kot nefarmakoloških ukrepov. V primeru bolezni, ki ogroža organe, se poslužuje uporaba kortikosteroidov in imunosupresivov, včasih tudi antimalarikov. Če bolezen še ni napadla organov, se zdravi z nestreoidnimi antirevmatiki, antimalariki in nizkimi odmerki kortikosteroidov. Antimalariki kot sta klorokin in hidroksiklorokin zmanjšajo vezavo avtoantigeničnih peptidov na MHC II, medtem ko pa vezava eksogenih antigenov ostane nespremenjena. Antimalariki delujejo pozitivno na zdravljenje lupusa, ker preprečijo signalizacijo preko TLR 7 in TLR 9 (4,6,15).

Pri pacientih s SLE s prisotnostjo ANA ali/in dsDNA protiteles se uporablja humano monoklonsko protitelo belimumab, edino registrirano biološko zdravilo za zdravljenje lupusa. Standardno terapijo belimumab le dopolni. Zdravilo ni primerno za bolnike s hudo prizadetostjo ledvic in aktivno vključenostjo centralnega živčnega sistema pri bolezni. Belimumab se veže na topni citokin stimulator limfocitov B (BLyS) in inhibira njegovo biološko aktivnost. BLyS sodi v skupino TNF ligandov in je ključnega pomena za preživetje limfocitov B. Njegova inhibicija vodi v apoptozo avtoreaktivnih limfocitov B (5,16).

Konvencionalna terapija pri več kot 50 % pacientov s SLE ne uspe nadzirati kliničnih znakov. Dolga uporaba in visoki odmerki kortikosteroidov vodijo v večjo pojavnost stranskih učinkov in umrljivost. Posledično poteka danes razvoj novih terapevtskih pristopov, med katerimi so tudi zaviraci imunoproteasoma (6).

1.2 Mišji model lupusa

Mišji modeli lupusa predstavljajo genetsko homogene populacije in se uporabljajo za odkrivanje mehanizmov nastanka bolezni, vključenost genov pri bolezni in za testiranje potencialnih terapevtskih pristopov. Dobro poznavanje lupusa pri miših omogoči tudi boljše razumevanje lupusa pri ljudeh. Različni mišji modeli lupusa z različnimi fenotipi in genotipi so privedli do odkritja več kot 20 genomskih zaporedij, ki so povezani z dovzetnostjo za lupus ali lupusu podobnih stanj. Mišji modeli lupusa se odražajo s

prisotnostjo protiteles proti lastnim jedrnim proteinom, ostalimi celično specifičnimi avtoprotitelesi in odpovedjo organov. Najpogosteje prizadeti organ so ledvice, kjer se pojavi glomerulonefritis kot posledica nalaganja imunskih kompleksov. Ledvice so glavni prizadet organ tudi pri mišjem modelu lupusa *Sle1Tg7*, ki se razvije spontano (5,17,18).

1.2.1 B6.*Sle1Tg7*

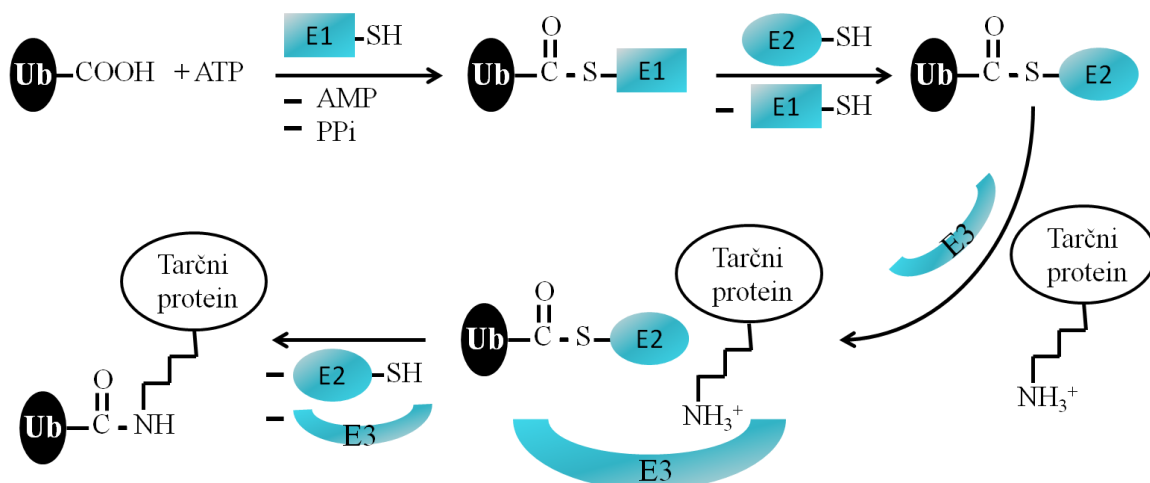
Dovzetnostni interval sistemski lupus eritematozus 1 (*Sle1*) na kromosomu 1 hišne miši (*Mus musculus*) in njegov sintenični (ang. syntený) ekvivalent v ljudeh, sta se izkazala za pomembne pri patogenezi lupusa. *Sle1* je povezan s selektivno izgubo tolerance na kromatin (H2A/H2B/DNA subnukleosom) (19), kar vodi v razvoj avtoreaktivnih limfocitov B in T ter produkcijo protiteles preko avtoreaktivnih limfocitov B (20). Nastala benigna imunost kot posledica *Sle1* potrebuje za napredovanje bolezni dodatne spremembe. Kombinacija *Sle1* z ostalimi dovzetnostnimi geni, posebno tistimi, odgovornimi za prirojeno imunost vodi v hudo obliko lupusa. Pri mišjem modelu lupusa *Sle1Tg7* je prisoten *Sle1* lokus in povečana ekspresija receptorja TLR 7 v limfocitih B, kar vodi v hudo obliko lupusa (21). Povišana ekspresija TLR 7 je pogosta tudi pri pacientih z lupusom v humanih mononuklearnih celicah v periferni krvi (PBMC, ang. peripheral blood mononuclear cell). Imunološke študije pa so potrdile tudi vključenost TLR 7 pri procesu sproščanja NET (17).

1.3 Proteasom in imunoproteasom

V evkariontskih celicah sistem ubikvitin-proteasom (UPS) ohranja homeostazo, tako da uravnava razgradnjo mnogih proteinov udeleženih v regulaciji celičnega cikla, aktivaciji transkripcijskih faktorjev in indukcije apoptoze (22).

Proteini, ki se razgradijo po tej poti, morajo biti označeni z ubikvitinom (Ub), kar se zgodi preko kaskadnih reakcij s pomočjo treh encimov (Slika 3). Encim, ki aktivira ubikvitin (E1), aktivira C-terminalni glicinski ostanek Ub s pomočjo ATP-ja. Nadalje poteče konjugacija Ub na katalitični cistein encima E2. Proces pripenjanja Ub se konča s pomočjo encima E3 ligaze, ki ustvari peptidno vez med C-terminalnim delom Ub in ϵ -aminsko skupino lizina na stranski verigi substratnega proteina. Protein, ki je označen s štirimi ali več Ub, je prepoznan s pomočjo 26S proteasoma in se nato razgradi na oligopeptide dolge 3-15 aminokislinskih ostankov. Ubikvitinsko verigo odstrani encim, molekule Ub pa se lahko ponovno uporabijo pri reakcijah. S pomočjo UPS se tako specifično razgradi 90 %

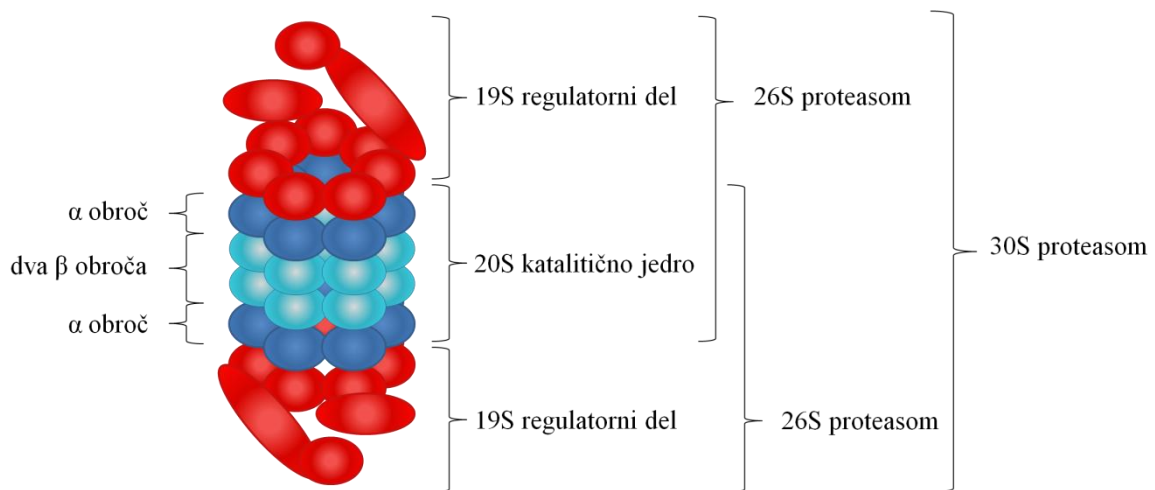
intracelularnih proteinov, katerih fragmenti se iz citosola prenesejo v endoplazemski retikulum s pomočjo transportnega prenašalca (TAP). Tam se lahko vežejo na receptor glavnega histokompatibilnostnega kompleksa razreda 1 (MHC I) in ob tvorbi dovolj močnega kompleksa z receptorjem preidejo z vezikli na površino celice. Približno 10 % proteinov pa se neselektivno razgradi s pomočjo lizosomov na fragmente, ki se lahko vežejo na receptor glavnega histokompatibilnostnega kompleksa razreda 2 (MHC II) (22,23).



Slika 3: Potek pripenjanja molekule ubikvitina (Ub) na tarčni protein. Po aktivaciji z ATP se Ub pripne preko karboksilne skupine na tiolno skupino encima E1. Sledi konjugacija Ub na encim E2 in odcep encima E1. S pomočjo encima E3 se tvori peptidna vez med ϵ -aminsko skupino lizina tarčnega proteina in Ub.

1.3.1 Struktura

Proteasom je proteazni kompleks, ki sestoji iz 20S katalitičnega jedra (KD) in enega ali dveh terminalnih regulatornih 19S delcev (RD ali PA700 aktivator), ki skupaj tvorijo 26S proteasom (Slika 4). V primeru vezave dveh RD se tvori druga izoforma proteasoma - 30S proteasom. KD je sestavljeno iz dveh istih α in dveh istih β obročev, katerih vsak vsebuje 7 podenot, ki skupaj oblikujejo ~730 kDa cilindrično strukturo. Zunanja obroča sta sestavljena iz podenote α , izmed katerih podenota α_3 s svojimi N-terminalnimi ostanki najbolj vpliva na zaprto cilindrično strukturo na robu. Podenote β_1 (*PSMB6*), β_2 (*PSMB7*), in β_5 (*PSMB5*) dveh notranjih β obročev imajo katalitično aktivne treoninske preostanke na N-terminalnih koncih in izražajo hidrolazno aktivnost. Podenota β_1 izraža kaspazi podobno aktivnost in cepi peptidno vez za kislimi preostanki, β_2 tripsinu podobno aktivnost in cepi za bazičnimi preostanki, podenota β_5 pa nosi kimotripsinu podobno aktivnost in cepi za hidrofobnimi aminokislinskimi preostanki (22,24,25).

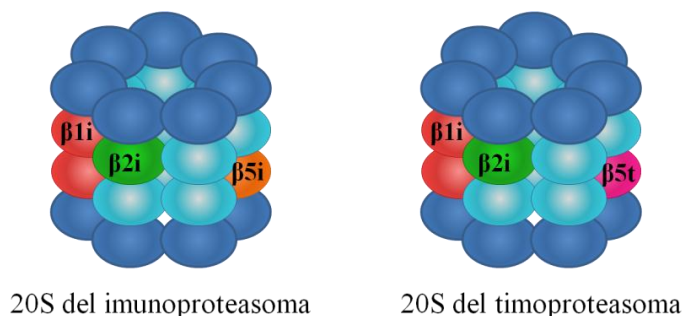


Slika 4: Struktura 30S proteasoma. 30S proteasom je sestavljen iz 20S katalitičnega jedra in dveh 19S regulatornih delov. 26S proteasom nastane, ko je na 20S katalitično jedro vezan le en 19S regulatorni delec. 20S katalitično jedro je sestavljeno iz dveh zunanjih α obročev in dveh notranjih β obročev. Vsak obroč vsebuje 7 podenot.

V celicah imunskega sistema se konstitutivno izražene podenote $\beta 1$, $\beta 2$, in $\beta 5$ zamenjajo z inducibilnimi podenotami $\beta 1i$ (LMP2, ang. low molecular weight protein 2, *PSMB9*), $\beta 2i$ (MECL1, ang. multicatalytic endopeptidase complex-like 1, *PSMB10*) in $\beta 5i$ (LMP7, ang. low molecular weight protein 7, *PSMB8*). Zamenjava podenot v inducibilne je posledica učinkov proinflammatoryh citokinov, ki lahko povzročijo nastanek imunoproteasoma tudi v nehematopoetskih/neimunskih celicah (Slika 5). Ime je imunoproteasom dobil zaradi lokacije genov za podenoti $\beta 1i$ in $\beta 5i$, ki ležita blizu ostalih genov za MHC II. Nastal imunoproteasom izraža večjo kimotripsinu in tripsinu podobno aktivnost, kaspazi podobna aktivnost pa je zmanjšana. V vretenčarjih so zasledili še tretjo obliko proteasoma in sicer timoproteasom. Ta se izraža v timusnih kortikalnih epiteljskih celicah. Za razliko od proteasoma se zamenjajo podenote $\beta 1i$, $\beta 2i$ in $\beta 5t$ (Slika 5), nastali timoproteasom pa prispeva k pozitivni selekciji nastajajočih $CD8^+$ citotoksičnih limfocitov T in k uravnavanju sproščanja citokinov (22,26,27).

RD je ~930 kDa velik kompleks, ki se nahaja na robu KD in je sestavljen iz 19 različnih podenot. Odgovoren je za vezavo poliubikvitiranih substratov, odstranjevanje poliubikvintinske verige, razpiranje substratnih proteinov, odprtje KP in transport substratov v cilindrično strukturo KP, za kar se porabi energija v obliki ATP. RD lahko nadalje razdelimo na dve skupini glede na ATPazno aktivnost: regulatorni delec s tremi ATPaznimi podenotami (Rtp 1-6) in na podenote regulatornega delca brez ATPazne

aktivnosti (Rpn 1-15). Strukturno je RD zgrajen iz pokrova in baze. Najpomembnejša podenota za prepoznavo ubikvitinskih podenot je Rpn10, ki veže molekulo Ub (22,24).



Slika 5: Sestava 20S katalitičnega jedra imunoproteasoma in timoproteasoma z označenimi proteolitičnimi podenotami $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ in $\beta 5t$. V primerjavi s standardnim proteasomom se v imunoproteasomu zamenjajo podenote $\beta 1i$, $\beta 2i$ in $\beta 5i$. V timoproteasomu so v primerjavi s standardnim proteasomom prisotne podenote $\beta 1i$, $\beta 2i$ in $\beta 5t$.

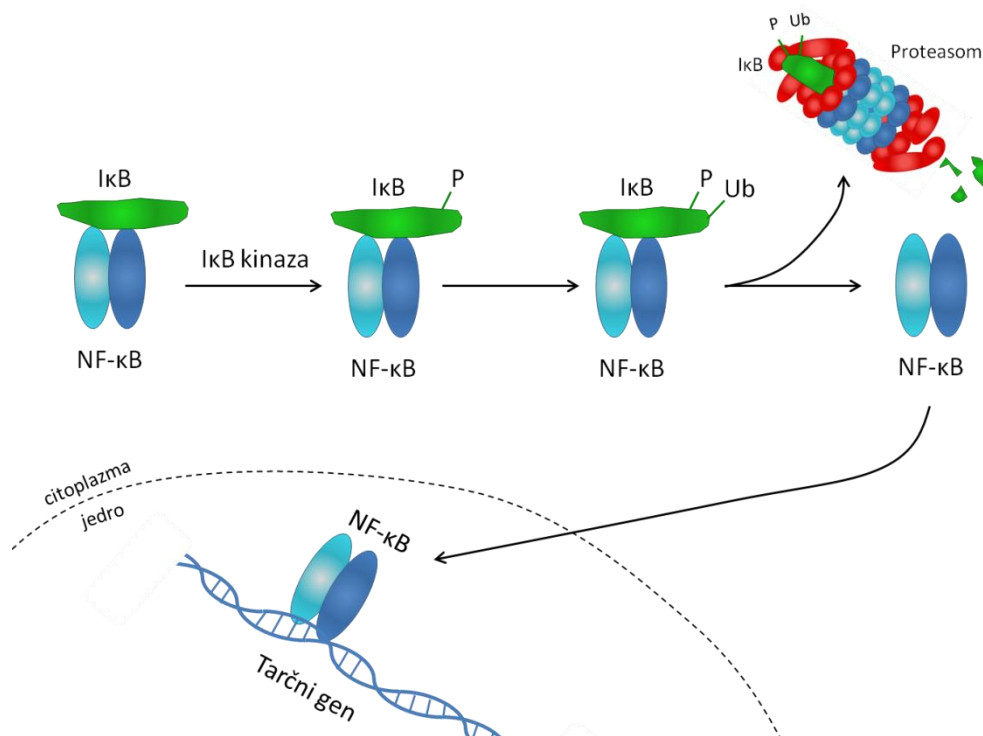
Poleg RD pri odpiranju cilindra 20S sodelujejo še alternativni regulatorni delci kot so PA28 α/β (ali 11S REG), PA28 γ (ali REG γ) in PA200, ki lahko interagirajo z α -obroči 20S KP in nadomestijo 19S RD (22).

1.3.2 Udeležенost proteasoma in imunoproteasoma v imunskem sistemu

Vsi trije tipi proteasomov konstitutivni, inducibilni in timoproteasom sodelujejo pri tvorbi oligopeptidov, ki se lahko predstavijo receptorju MHC I, vendar zaradi različne specifičnosti do substratov generirajo drugačne repertoarje epitopov. Pri miših z izbitimi geni za podenote imunoproteasoma $\beta 1i$, $\beta 2i$ in $\beta 5i$ so ugotovili, da imajo kvantitativno in kvalitativno spremenjen repertoar antigenov, kar nakazuje na pomembno vlogo imunoproteasoma pri predstavitvi antigenov (23).

Proteasom in imunoproteasom uravnavata tudi signalno pot NF- κ B. NF- κ B je transkripcijski dejavnik, ki je udeležen v regulaciji genov prirojene in pridobljene imunosti, med drugim tudi proinflammatoryh citokinov, ki so značilnost avtoimunskih bolezni. NF- κ B se nahaja v neaktivni obliki v citoplazmi v obliki homo- ali heterodimerov, na katere je vezan inhibitor NF- κ B (I κ B) (Slika 6). Fosforilacija I κ B s pomočjo I κ B kinaze in sledeča ubikvitinacija I κ B vodita v razgradnjo inhibitorja s proteasomom in imunoproteasomom. To vodi v aktivacijo NF- κ B in translokacijo v jedro, kjer se veže na promotorje tarčnih genov. Proteasom in imunoproteasom tako pripomoreta k daljšemu delovanju NF- κ B. Imunoproteasom ima v primerjavi s proteasomom večjo aktivnost pri

razgradnji I κ B, kar privede do močnejšega delovanja NF- κ B. Inhibicija imunoproteasoma tako zaradi močnejše inhibicije NF- κ B signalne poti privede do boljših izidov kot zaviranje proteasoma. Napake v transkripcijskem dejaviku NF- κ B lahko vodijo v sprostitvev avtoreaktivnih limfocitov T (28,29,30).



Slika 6: Signalna pot NF- κ B. NF- κ B se nahaja v citoplazmi v obliki homo- ali heterodimerov, na katere je vezan inhibitor jedrnega dejavnika κ B (I κ B). I κ B kinaza fosforilira I κ B, čemur sledi ubikvitinacija I κ B in razgradnja s proteasomom. NF- κ B translocira v jedro, kjer se veže na promotorje tarčnih genov.

Imunoproteasom igra tudi ključno vlogo pri diferenciaciji limfocitov T in sproščanju proinflamatornih citokinov IL-23, IL-2 in IFN- γ preko neodvisne poti od NF- κ B (23,27).

Prav tako je proteasom udeležen pri limfocitih B, kjer uravnava njihov razvoj ter funkcijo preko regulacije ekspresije CD20, ekspresije B-celičnega receptorja in predstavitve antigenov. Plazmatke se prav tako odzovejo na inhibicijo proteasoma, kar vodi v zmanjšano produkcijo protiteles (27).

Dendritične celice (DC) so antigen predstavitvene celice, ki med drugim uravnavajo periferno toleranco z indukcijo anergije ali odstranjevanja avtoreaktivnih limfocitov T. Pri razvoju in diferenciaciji DC je potreben UPS. Vlogo imunoproteasoma v DC so preučili z vplivom inhibitorjev. V mielodnih DC inhibicija proteasoma z bortezomibom zniža ekspresijo nekaterih aktivacijskih markerjev, inducira apoptozo, inhibira signaliziranje

preko TLR in zavre sproščanje citokinov (IL-12, TNF- α) preko faktorja NF- κ B. V drugih predkliničnih študijah plazmacitoidnih DC, je inhibicija z bortezomibom, carfilzomibom in PR-957 privedla do inhibicije signaliziranja TLR, inhibicije sproščanja IFN- α in IL-6 ter inhibicije indukcije apoptoze (27).

UPS je vpleten tudi pri komplementarni poti razgradnje proteinov - avtofagiji v nekaterih celicah. Inhibicija proteasoma z bortezomibom privede do indukcije avtofagije in je povezana s pozitivnim učinkom pri glomerulonefritisu pacientov in miši s SLE. Ob inhibiciji z bortezomibom se zazna zmanjšanje števila plazmatk in eliminacija sinteze protiteles. Nenormalno aktivirana avtofagija v makrofagih pospeši sintezo IL-6 in TNF- α , ki prispevajo k patogenezi SLE in ostalih avtoimunskih bolezni. Visoki nivoji avtofagične aktivnosti v timusnih epitelijskih celicah miši nakazujejo tudi na pomembnost avtofagije pri predstavitvi antigenov limfocitom med pozitivno in negativno selekcijo (31,32,33).

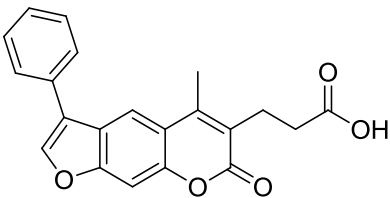
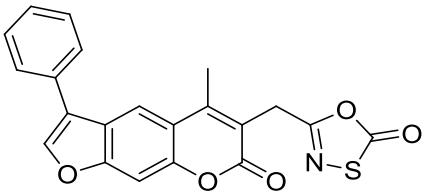
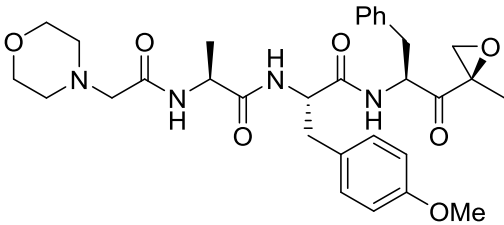
1.4 Zaviralci imunoproteasoma

Prvi odobren zaviralec proteasoma s strani Ameriške agencije za zdravila in hrano je bil bortezomib za zdravljenje multiplega mieloma. Mehanizem delovanja bortezomiba temelji predvsem na ubijanju plazmatk in eliminaciji protiteles. Uporaba bortezomiba pri avtoimunskih boleznih je omejena, ker pri več kot 30 % pacientov nastopi nevropatija (34,35).

Na mišjih celicah kostnega mozga in človeških PBMC so Ichikawa in sodelavci (2012) preučili dodaten mehanizem delovanja zaviralcev proteasoma. Preučevali so vpliv selektivne inhibicije LMP7 s spojino PR-957 in selektivne inhibicije podenote $\beta 5$ s spojino PR-893 na produkcijo IFN- α . Ugotovili so, da inhibicija podenote $\beta 5$ vodi v več kot 90 % zavrte produkcije IFN- α , medtem ko inhibicija podenote $\beta 5$ ne vpliva na produkcijo citokinov. Podoben vpliv so ugotovili tako na dendritičnih celicah *in vitro*, ki so glavni vir TNF- α , kot tudi v mišjem modelu lupusa *in vivo*, kjer sta oba, bortezomib in PR-957, znižala produkcijo IFN- α za približno 75 %. Pri uporabi zaviralcev proteasoma pri lupusu je prisoten sinergistični učinek preko eliminacije plazmatk in zaviranja sproščanja IFN- α . Odkritje, da je imunoproteasom in ne konstitutivni proteasom, udeležen v regulaciji citokinov v PBMC in dejstvo, da se imunoproteasom izraža predvsem v imunskih celicah (in po stimulaciji s citokini tudi v neimunskih celicah), sta vodila v razvoj selektivnih inhibitorjev imunoproteasoma (35,36).

Večina inhibitorjev imunoproteasomske podenote $\beta 5i$, med katere sodi tudi PR-957 (Tabela I), so molekule s peptidno strukturo in s tem povezano slabo biološko razpoložljivostjo *per os*. S pomočjo virtualnega rešetanja so odkrili psoralenske derivate kot potencialne nepeptidne zaviralce podenote $\beta 5i$ (spojina **37** in **75**) (Tabela I). Spojini **75** in PR-957 sta ireverzibilna inhibitorja, kjer se α, β -epoksiketon in oksatiazolon ireverzibilno vežeta na treonin katalitičnega centra. Oksatiazoloni imajo kratko razpolovno dobo v vodnih raztopinah, kar bi lahko omejujoče vplivalo na njihovo delovanje *in vivo*. Spojina **37** s karboksilno skupino deluje kot reverzibilni zaviralec (34,36).

Tabela I: Oznake, strukture in molekulske mase molekul, ki smo jih uporabili pri eksperimentu.

Oznaka	Struktura	Molekulska masa
37		348,35
75		391,40
PR-957 (ONX 0914)		580,68

2 NAMEN DELA

Imunoproteasom in proteasom sta vpletena v patogenezi lupusa preko uravnavanja homeostaze na različnih nivojih. Ker vpliva imunoproteasom na nekatere procese učinkoviteje kot standardni proteasom, predstavlja obetavno tarčo pri zdravljenju avtoimunskih bolezni. Poleg tega je imunoproteasom prisoten predvsem v celicah hematopoetskega izvora in tako zmanjšuje neželene učinke, ki bi lahko nastali pri zaviranju obeh tipov proteasoma. Predhodne raziskave so pokazale, da je selektivni zaviralec podenote $\beta 5i$ PR-957 učinkovit pri kroničnih vnetnih boleznih (35,37). Poleg zaviralca PR-957 je tudi večina ostalih znanih selektivnih zaviralcev podenote $\beta 5i$ peptidne narave, kar se povezuje z nižjo metabolično stabilnostjo in nižjo biorazpoložljivostjo (36). Z metodami molekulskega sidranja so odkrili nepeptidne selektivne zaviralce podenote $\beta 5i$ na osnovi derivatov psoralena.

Prvi cilj v magistrskem delu je preveriti vpliv selektivnih zaviralcev PR-957 in dveh derivatov psoralena na izražanje genov, ki kodirajo podenote proteasoma $\beta 1$, $\beta 2$ in $\beta 5$ in podenote imunoproteasoma $\beta 1i$, $\beta 2i$ in $\beta 5i$ v dendritičnih celicah mišjega modela lupusa po 2 in 24 urah izpostavljenosti *in vitro*. V ta namen bomo s pomočjo metode qPCR določili izražanje omenjenih podenot na nivoju mRNA. Predvidevamo, da bo izražanje imunoproteasomskih podenot na nivoju mRNA po izpostavljenosti zaviralcem spremenjeno v primerjavi z začetnim stanjem (ob času 0 ur), izražanje proteasomskih podenot pa bo ostalo nespremenjeno. Spremenjeno izražanje pričakujemo v primeru vseh treh spojin.

Drugi cilj magistrskega dela je ovrednotiti izražanje genov, ki kodirajo podenote proteasoma $\beta 1$, $\beta 2$ in $\beta 5$ in podenote imunoproteasoma $\beta 1i$, $\beta 2i$ in $\beta 5i$ na nivoju mRNA v različnih tipih imunskih celic mišjega modela lupusa. Celice, ki jih nameravamo ovrednotiti so limfociti T, limfociti B, monociti in granulociti. Poslužili se bomo metode kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR) in iz izolirane mRNA analizirali izražanje podenot proteasoma in imunoproteasoma za različne tipe celic. Ugotoviti želimo ali je izražanje imunoproteasoma in proteasoma različno pri mišjem modelu lupusa glede na tip celic in v primerjavi s kontrolno skupino.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Kemikalije

Kemikalija/reagent	Proizvajalec
Agaroza	Sigma-Aldrich
Avtoklavirana ultračista voda	Fakulteta za farmacijo
Barvilo Midori Green	Nippon Genetics
Barvilo Sybr Safe DNA Gel Stain	Invitrogen
Čistilo z inhibitorjem RNAz RNaseZAP™	Sigma-Aldrich
Kloroform	Ph. Eur za analizo
Nanašalni pufer Blue/Orange 6x Loading Dye	Promega Corporation
Oligonukleotidni začetnik za gen <i>ACTB</i>	Sigma-Aldrich
Oligonukleotidni začetnik za gen <i>GAPDH</i>	Sigma-Aldrich
Oligonukleotidni začetnik za gen <i>HPRT</i>	Sigma-Aldrich
Oligonukleotidni začetnik za gen <i>Mrpl46</i>	Sigma-Aldrich
Oligonukleotidni začetnik za gen <i>PSMB10</i>	Sigma-Aldrich
Oligonukleotidni začetnik za gen <i>PSMB5</i>	Sigma-Aldrich
Oligonukleotidni začetnik za gen <i>PSMB6</i>	Sigma-Aldrich
Oligonukleotidni začetnik za gen <i>PSMB7</i>	Sigma-Aldrich
Oligonukleotidni začetnik za gen <i>PSMB8</i>	Sigma-Aldrich
Oligonukleotidni začetnik za gen <i>Srp72</i>	Sigma-Aldrich
Označevalec velikosti Quick-Load® 100bp DNA Ladder	New England BioLabs

3.1.2 Pufri

- Pufer TAE (Tris, acetat, EDTA)

3.1.3 Kompleti

Komplet	Proizvajalec
Komplet za izolacijo RNA PureLink™ Micro-to-Midi Total RNA Purification Kit	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
Komplet za reverzno transkripcijo High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific
Osnovna zmes za qPCR 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix	Solis BioDyne
Osnovna zmes za qPCR SYBR® Select Master Mix	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific

3.1.4 Laboratorijska oprema

Aparatura/Material	Proizvajalec
Aparatura za poslikavo gela G:BOX	Syngene
Avtoklav A-21	Kambič laboratorijska oprema
Centrifuga Centric 322A Tehrtinca®	Železniki
Centrifuga Centrifuge 5415 R	Eppendorf
Ciklični termostat C 1000™ Thermal Cycler	BioRad
Ciklični termostat LightCycler® 480 II	Roche Applied Science
Hladilnik in zamrzovalnik	Gorenje, Velenje
Kalup za agarozni nosilec z glavnikom	
Komora DNA/RNA UV-CLEANER, UVC/T-M-AR	Biosan
Komora z UV svetlobo - g:BOX	Syngene
Mikrotitrne ploščice LightCycler® 480 Multiwell plate 384, white	Roche Applied Science
Mikrovalovna pečica	
Nosilec ter kadička za elektroforezo	
Optična folija za pokrivanje reakcijske plošče LightCycler® 480 Sealing Foil	Roche Applied Science
Spektrofotometer Nanodrop™ 1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
Stresalnik in centrifuga Combi-Spin FVL-2400N	Biosan
Tehtnica za tehtanje agaroze Vibra SJ	Shinko Densi
Usmernik električnega toka Power Pac 300	BioRad
Zamrzovalnik (-80°C) model MDF-U74	Sanyo

3.2 Metode dela

3.2.1 Vzorci

Vzorci izoliranih mišjih celic smo pridobili v okviru sodelovanja z dr. Tejo Čelhar iz inštituta Singapore Immunology Network. Testiranja so potekala v skladu z zahtevami lokalne etične komisije za poskuse na živalih.

Iz žrtvovanih treh miši z lupusom in treh kontrolnih miši so izolirali celice kostnega mozga in jih nato s pomočjo rastnih faktorjev diferencirali do dendritičnih celic. Sledila je njihova *in vitro* inkubacija s spojinami 37, 75 in PR-957 v koncentraciji 200 nM. Za kontrolno točko smo imeli tudi vzorce neizpostavljenih dendritičnih celic. Za določanje odziva na izbrano spojino, so bili odvzeti vzorci v časovnih točkah 0 ur, 2 ur in 24 ur po izpostavljenosti. Prvo skupino je predstavljalo 54 vzorcev.

Drugo skupino so predstavljali vzorci iz žrtvovanih štirih miši z lupusom in štirih kontrolnih miši. Iz krvi so bili izolirani limfociti T, limfociti B, monociti in granulociti. Izjema je bila pri vzorcih granulocitov, kjer ni bilo vzorca iz miši številka 7-kontrolne miši. Skupaj je bilo v tej skupini 31 vzorcev.

3.2.2 Izolacija RNA

Izolacija RNA je potekala v komori, ki smo jo najprej sterilizirali z UV svetlobo, nato pa še prebrisali s hipokloritom in z inhibitorjem RNAz. Ves material, ki je prišel v kontakt z vzorci, je bil ustrezno steriliziran, tako da ni vseboval inhibitorjev RNAz. RNA smo izolirali iz celic, ki jim je bil pred zamrzovanjem na -80 °C dodan TRIzol. Funkcija tega reagenta, ki je mešanica fenola in gvanidin izotiocianata, je razgradnja celic in topljenje celičnih sestavin pri čemer se integriteta RNA ohrani, zaradi zelo učinkovite inhibicije RNAz. Primeren je za majhne (5×10^6 celic) in večje količine vzorcev ($>10^7$ celic).

Vzorci smo odmrznili na sobni temperaturi in jih inkubirali 5 minut. Po inkubaciji je sledil dodatek 0,2 ml kloroforma in 15 sekundno stresanje z roko. Preostala DNA in proteini preidejo v organsko fazo, RNA pa ostane v vodni fazi. Sledila je 2 do 3 minutna inkubacija in nato centrifugiranje na 12000 x g 15 minut pri 4 °C. Približno 400 µL zgornje vodne faze smo prenesli v novo mikrocentrifugirko, spodnjo rdečo fenol-kloroformno fazo in interfazo pa smo zavrgli. Odvzeti vodni fazi smo dodali enak volumen 70 % etanola in dobro premešali z obračanjem mikrocentrifugirke in z vorteksiranjem. Ob tvorbi

morebitnega precipitata smo tega z etanolom dispergirali. Pri nadaljnji izolaciji smo uporabili komplet za izolacijo PureLink™ Micro-to-Midi Total RNA purification kit. Ta komplet je namenjen enostavnemu in hitremu pridobivanju visoko čiste RNA iz različnih vzorcev, kot so živalske, rastlinske celice, tkiva, kri, bakterije in drugih. Na kolono RNA Spin Cartridge smo nanesti do 700 µL vzorca in centrifugirali na 12000 x g 15 sekund pri sobni temperaturi (22 °C). Eluat smo zavrgli in kolono ponovno vstavili v mikrocentrifugirko. Preostanek vzorca smo nanesti na kolono, ponovno centrifugirali in eluat zavrgli. RNA se veže na kolono s silikagelom, nečistoče pa se sperejo s spiranjem, ki sledi. Za spiranje smo uporabili 700 µL Wash Buffer I. Sledilo je centrifugiranje na 12000 x g 15 sekund pri sobni temperaturi. Kolono smo prenesli v čisto RNA Wash Tube in dodali 500 µL Wash Buffer II ter centrifugirali pri istih pogojih. Eluat smo zavrgli, kolono pa ponovno vstavili v mikrocentrifugirko. Korak z dodatkom Wash Buffer II in centrifugiranjem smo ponovili. Membrano smo osušili s centrifugiranjem na 12000 x g 1 minuto pri sobni temperaturi. Zbirno mikrocentrifugirko smo zavrgli in vstavili kolono v RNA Recovery Tube. Za elucijo smo dodali skupno 40 µL vode brez RNaz (najprej 30 µL in nato po centrifugiranju ponovili korak še z 10 µL) in centrifugirali 2 minuti na $\geq 12000 \times g$ pri sobni temperaturi. Za določitev koncentracije RNA smo od vsakega vzorca odvzeli 3 µL in alikvot prenesli novo mikrocentrifugirko, preostalih 27 µL pa takoj zamrznili v zamrzovalniku na -80 °C.

3.2.3 Določanje koncentracije RNA

Za določitev koncentracije izolirane RNA in čistosti vzorca smo uporabili UV/VIS spektrofotometer Nanodrop®. Izmerili smo absorbance pri 230, 260 in 280 nm ter preučili razmerje $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$, ki naj bi bilo med 1,8 in 2,0. Pri valovni dolžini 260 nm absorbirajo nukleinske kisline, zato nižje razmerje nakazuje na prisotnost proteinov, fenola ali drugih snovi, ki absorbirajo pri 280 nm. Pričakovano razmerje $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ je med 2,0 in 2,2. V primeru kontaminacije (EDTA, ogljikovi hidrati, fenol) je razmerje nižje (38).

3.2.4 Reverzna transkripcija

Izolirano RNA smo prepisali v komplementarno DNA (cDNA) s procesom reverzne transkripcije, ki jo katalizira encim reverzna transkriptaza. Gre za od RNA odvisno DNA polimerazo, ki je prisotna v nekaterih virusih. V našem eksperimentu uporabljena MultiScribe™ Reverse Transcriptase je rekombinantna reverzna transkriptaza Maloney

mišjega virusa levkemije. Koncentracija RNA je po reverzni transkripciji enaka nastali koncentraciji cDNA.

Delo je potekalo v komori, ki smo jo naprej prebrislali z inhibitorjem RNAz in etanolom ter jo 15 minut prežarili z UV svetlobo. S pomočjo kompleta za transkripcijo High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit smo prepisali 600 ng RNA vsakega vzorca, kar je pri skupnem volumnu za reverzno transkripcijo 20 μL ustrezalo koncentraciji 30 ng/ μL RNA in enaki koncentraciji cDNA. Pri reakciji so poleg reverzne transkriptaze (MultiScribeTM Reverse Transcriptase) potrebni tudi naključni začetni oligonukleotidi (10 x RT Random Primers), deoksinukleotid trifosfati (25 x dNTP Mix (100nM)), inhibitor RNAz (RNase inhibitor) in pufer za reverzno transkripcijo (10 x RT Buffer). Te komponente tvorijo osnovno zmes, ki se jo skupaj pripravi za želeno število reakcij (Tabela II). Potrebno količino osnovne zmesi 6,8 μL smo prenesli v mikrocentrifugirko, dodali ustrezen volumen ultračiste vode brez RNAz ter vzorec odtaljen na sobno temperaturo na hitro centrifugirali in do prenosa v aparaturu za PCR mikrocentrifugirke shranili na ledu. Za potrebno količino vzorca smo uporabili izmerjene koncentracije RNA na spektrofotometru, da smo dobili vzorce s koncentracijo RNA 30 ng/ μL . Preostal primanjkljaj v skupnem volumnu zmesi za reverzno transkripcijo je predstavljal ultračista voda brez RNAz. Sledila je sinteza cDNA s pomočjo cikličnega termostata po programu, zapisanem v tabeli III. Vzorce smo po končanem prepisu shranili pri -80 °C.

Tabela II: Priprava osnovne zmesi za reverzno transkripcijo.

Komponenta osnovne zmesi	Volumen/reakcijo [μL]	Volumen za 15 reakcij [μL]
MultiScribe TM Reverse Transcriptase	1,0	15,0
10 x RT Random Primers	2,0	30,0
25 x dNTP Mix (100nM)	0,8	12,0
RNase inhibitor	1,0	15,0
10 x RT Buffer	2,0	30,0
Skupni volumen	6,8	102,0

Tabela III: Program za prepis RNA v cDNA.

	1. korak	2. korak	3. korak	4. korak
Temperatura	25°C	37°C	85°C	4°C
Čas	10 min	120 min	5min	∞

3.2.5 Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času

Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR) omogoča pomnoževanje izredno majhnih količin DNA in sočasno kvantitativno spremljanje nastalega produkta ob koncu vsakega cikla. Pri eksperimentu smo uporabili ciklični termostat LightCycler® 480 II.

Razvoj verižne reakcije s polimerazo je omogočilo odkritje Taq polimeraze izolirane iz termostabilnega mikroorganizma *Thermus aquaticus*. Gre za DNA polimerazo, ki je stabilna tudi pri višjih temperaturah, ki so potrebne pri pomnoževanju. Poleg termostabilnega encima, matrične DNA, začetnikov in vode pa so potrebni še pufer za uravnavanje pH (Tris), monovalentni in divalentni ioni (KCl, MgCl₂) ter deoksinukleotidi. Slednji se lahko kupijo v kombinaciji kot osnovna zmes, kot sta v naših eksperimentih uporabljena SYBR® Select Master Mix (z barvilom SYBR® GreenER™) in 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix (z barvilom EvaGreen®) (Tabela IV). Sledi pipetiranje osnovne zmesi v ustrezne reakcijske ploščice in dodatek vzorca. Pred vstavitvijo vzorca v ciklični termostat, je potrebno reakcijsko ploščico prekriti s samolepilno folijo, da preprečimo izhlapevanje med qPCR in centrifugiranje ploščice, da odstranimo vzorec iz sten ploščice (39).

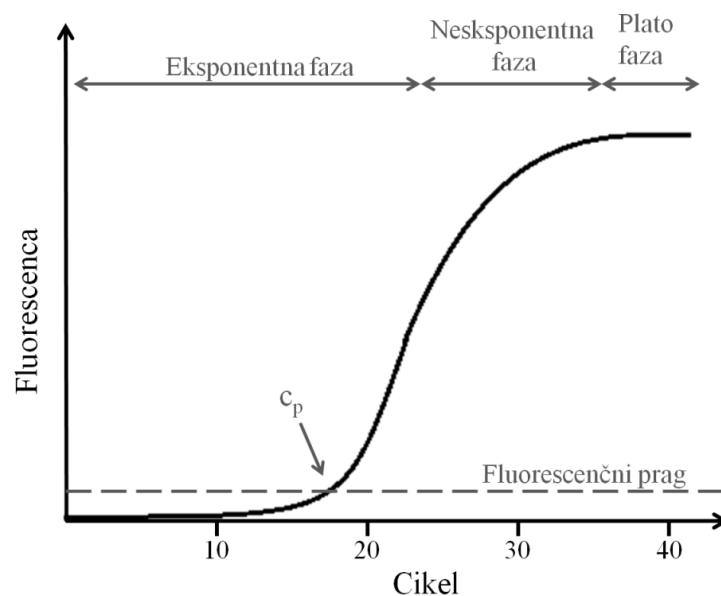
Tabela IV: Sestava osnovnih zmesi za qPCR.

Osnovna zmes	Sestava
SYBR® Select Master Mix	barvilo SYBR® GreenER™
	AmpliTaq® DNA polimeraza, UP (Ultra Pure) s hot start mehanizmom
	temperaturno labilna uracil-DNA glikosilaza (UDG) / uracil-N-glikozidaza
	pasivno referenčno barvilo ROX™
	dNTPji z dUTP/dTTP
5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix	optimiziran reakcijski pufer
	barvilo EvaGreen®
	HOT FIREPol® DNA polimeraza
	interna referenca bazirujoča na barvilu ROX
	dNTPji z dUTP/dTTP
	optimiziran reakcijski pufer
	12,5 mM MgCl ₂
	GC enhancer

Pomnoževanje se prične z denaturacijo cDNA, ki jo dosežemo s povišanjem temperature (94-96 °C), ki prekini vodikove vezi, tako da se dvojna vijačnica loči. Sledi specifično prileganje začetnih oligonukleotidov dolgih približno 20-40 nukleotidov na želenem odseku DNA na 5' in 3' koncu. Ponavadi poteka 5 °C nižje od temperature tališča (temperatura, kjer se 50 % molekul začetnika prileže na komplementarno zaporedje) obeh začetnikov, nekje pri 45-60 °C. Končni korak cikla je podaljševanje s pomočjo DNA polimeraze, ki podaljša novo nastalo verigo s pomočjo nukleotidnega zaporedja matrice. Temperatura tega koraka je odvisna od DNA polimeraze (40).

Detekcijo nastale koncentracije DNA omogočajo DNA interkalirajoča barvila, kot sta SYBR® GreenERTM ali EvaGreen®, ki se interkalirajo med nastalo dvojno vijačnico in v vezanem stanju spremenijo fluorescenco. Po končani verižni reakciji ciklični termostat izvede še analizo talilne krivulje. Pri dvovijačni DNA se s povišanjem temperature vijačnici ločujeta, pri čemer interkalirajoča barvila disociirajo od DNA, zazna pa se upad fluorescence. Iz talilne krivulje lahko določimo koliko različnih produktov je nastalo, kakšno temperaturo tališča in obliko talilne krivulje imajo. Temperatura tališča je odvisna od dolžine produkta, razmerja baznih parov GC/AT, distribucije GC. Za lažjo analizo graf, kjer upada fluorescenca v odvisnosti od temperature, pretvorimo v prvi negativni odvod. Tak prikaz omogoča lažjo določitev karakteristik vzorca (40,41).

Pri pomnoževanju ene matrične dvovijačnice nastaneta dve dvojni vijačnici v naslednjem ciklu, pri katerih je ena veriga matrična, druga pa na novo nastala. Gre torej za semikonzervativno podvajanje. V naslednjem ciklu dobimo iz dveh štiri dvovijačnice. Tako eksponentno naraščanje ob pomanjkanju komponent preide v naslednjo fazo neeksponentnega naraščanja, ki preide v zadnjo plato fazo (Slika 7). Kvantitativno lahko merimo le v eksponentnem območju, kar izkoristimo pri določanju fluorescenčnega praga, ki je značilno večji od fluorescenčnega ozadja. Cikel, kjer se preseže prag, imenujemo pražni cikel (c_p , ang. crossing point cycle) in je v direktni korelaciji z začetno koncentracijo DNA v vzorcu. S pomočjo relativne kvantifikacije s standardno krivuljo se izračuna koncentracija cDNA v vzorcu pred qPCR. Pridobljene koncentracije izražanja tarčnega gena v vzorcih delimo s koncentracijami izražanja referenčnih genov v istih vzorcih. Koncentracije poda programska oprema LightCycler, razmerje pa smo izračunali s pomočjo programa MS Excel (39,42).



Slika 7: Prikaz naraščanja fluorescence v odvisnosti od števila ciklov pri qPCR. Pri pomnoževanju eksponentno naraščanje fluorescence preide v neeksponentno in končno v plato fazo. Na sliki je označen tudi fluorescenčni prag in prazni cikel (c_p).

3.2.5.1 Priprava standardov

Po prepisu RNA v cDNA smo iz vsakega vzorca odvzeli alikvot in te združili, tako da smo dobili zmes vseh vzorcev s koncentracijo 30 ng/ μ L cDNA. Sledila je priprava standardov z redčenjem bazena. Koncentracije standardov so podane v tabeli V.

Tabela V: Koncentracije uporabljenih standardov.

Standardi za dendritične celice		Standardi za limfocite T, limfocite B, monocite in granulocite	
Oznaka	Koncentracija [ng/ μ L]	Oznaka	Koncentracija [ng/ μ L]
ST1	30,000000	ST1	7,500000
ST2	15,000000	ST2	3,750000
ST3	7,500000	ST3	1,875000
ST4	3,750000	ST4	0,937500
ST5	1,875000	ST5	0,468750
ST6	0,937500	ST6	0,234375
ST7	0,468750	ST7	0,117188
ST8	0,234375	ST8	0,058594
ST9	0,117188	ST9	0,029297
ST10	0,058594	ST10	0,014648
ST14	0,014648	ST11	0,007324
ST18	0,003662	ST15	0,001831
		ST19	0,000458

3.2.5.2 Učinkovitost pomnoževanja in pogoji za qPCR

Pred uporabo začetnikov pri qPCR analizi vzorcev je potrebno najprej potrditi njihovo učinkovitost pri pomnoževanju. V ta namen smo uporabili standardno krivuljo, s pomočjo katere se lahko izračuna učinkovitost (E) s pomočjo naklona (n) premice za vsak začetnik po sledeči formuli:

$$E = 10^{-\frac{1}{n}}$$

Učinkovitost za qPCR idealno znaša 2,0, pri čemer se v praksi omejimo z učinkovitostjo 1,8-2,1. Nižja učinkovitost nakazuje na slabo izbiro začetnikov ali na slabo optimizirane reakcijske pogoje, učinkovitost nad 2,0 pa je pokazatelj napak pri pipetiranju in nespecifičnih produktov (40).

Tabela VI: Prikaz sekvence in temperature tališča (T_t) začetnikov za izražanje genov za podenote proteasoma in imunoproteasoma. Prikazane so tudi pričakovane dolžine produktov za vsak par začetnikov.

Gen / podenota	Ime začetnika	Dolžina produkta qPCR [bp]	Sekvenca začetnika (5' - 3')	T _t [°C]
<i>PSMB6</i> / β1	mBeta1	157	F: TTCCACTGCTGCTTACCGAG	65,4
			R: AGTGTCTGAAGCGACGATGG	65,5
<i>PSMB7</i> / β2	mBeta2	151	F: ACAAGAAAGGGACCAGGCTT	63,8
			R: TATCCAACCACCCACAGCAC	65,8
<i>PSMB5</i> / β5	mBeta5	122	F: CCAAAGTCTGCTCGCTAACATGG	66,6
			R: CCTGTTCCCCTCGCTGTCTA	66,5
<i>PSMB9</i> / β1i (LMP2)	Beta1i	133	F: CATCATGGCAGTGGAGTTTG	57,1
			R: TGAGAGGGCACAGAAGATG	56,4
<i>PSMB10</i> / β2i (MECL1)	Beta2i	112	F: CAGCCAAACATGACGCTGG	59,8
			R: CAGTGATCACACAGGCATCCAC	61,5
<i>PSMB8</i> / β5i (LMP7)	mBeta5i	122	F: GGAACGCATCTCCGTGTCTG	68,2
			R: AAAGTCCTGGTCCCTTCTTGT	62,8

Izražanje podenot proteasoma in imunoproteasoma smo izvedli z začetniki, podani v tabeli VI. Po vsaki končani qPCR je bil izveden talilni protokol, kjer smo ob prisotnosti krivulj z istim vrhom lahko potrdili, da je nastal le en produkt.

Iz teh eksperimentov smo za določitev vsakega gena našli ustrezne koncentracije začetnikov in programe za določanje izražanja genov (Tabela VII-X). Optimizirani pogoji

za qPCR se za gen *PSMB8* razlikujejo med obema skupinama vzorcev. Vzrok leži v spremembi osnovne zmesi SYBR.

Tabela VII: Program za analizo izražanja genov *Srp72*, *GAPDH*, *ACTB*, *Mrl46*, *HPRT*, *PSMB9* in *PSMB10* v SYBR za vse vzorce in program za analizo izražanja gena *PSMB8* v SYBR v limfocitih T, limfocitih B, monocitih in granulocitih.

Korak	Število ponovitev	Temperatura	Čas
UDG aktivacija	1	50 °C	2 min
Aktivacija DNA polimeraze	1	95 °C	2 min
Denaturacija/prilaganje/podaljševanje	45	95 °C	15 s
		60 °C	1 min

Tabela VIII: Program za analizo izražanja gena *PSMB8* v Evagreen v dendritičnih celicah.

Korak	Število ponovitev	Temperatura	Čas
Začetna denaturacija	1	95 °C	12 min
Denaturacija/prilaganje/podaljševanje	45	95 °C	15 s
		60 °C	20 s
		72 °C	20 s

Tabela IX: Program za analizo izražanja genov *PSMB6* in *PSMB7* v Evagreen.

Korak	Število ponovitev	Temperatura	Čas
Začetna denaturacija	1	95 °C	12 min
Denaturacija/prilaganje/podaljševanje	45	95 °C	15 s
		63 °C	20 s
		72 °C	20 s

Tabela X: Program za analizo izražanja gena *PSMB5* v Evagreen.

Korak	Število ponovitev	Temperatura	Čas
Začetna denaturacija	1	95 °C	12 min
Denaturacija/prilaganje/podaljševanje	45	95 °C	15 s
		62 °C	20 s
		72 °C	20 s

3.2.5.3 qPCR vzorcev

Optimizaciji pogojev qPCR je sledilo določanje izražanja vzorcev v reakcijskih ploščicah za PCR s 384 vdolbinicami. Vse reakcije smo izvajali v duplikatih. Delo je potekalo v komori za delo z DNA, ki smo jo prebrisali s hipokloritom, etanolom in jo 15 minut prežarili z UV svetlobo. Volumen reakcijske zmesi je znašal 10 μL . Osnovno zmes smo pripravili skupaj za vse reakcije za posamezni gen. Ta je vsebovala SYBR® Select Master Mix ali FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix, ultračiste vode brez RNAze in ustrezne koncentracije smernih in protismernih začetnikov. Preostali volumen je predstavljal vzorec s koncentracijo cDNA 30 ng/ μL oziroma ustrezni standardi za pripravo umeritvene krivulje (Tabela XI).

Tabela XI: Sestava reakcijske zmesi za qPCR s koncentracijo začetnikov 400nM z uporabo SYBR® Select Master Mix in FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix.
dH2O = ultračista voda, F = smerni začetnik, R = protismerni začetnik

	1x	82x		1x	82x
dH2O	3,1 μL	254,2 μL	dH2O	6,1 μL	500,2 μL
F 20 μM	0,2 μL	16,4 μL	F 20 μM	0,2 μL	16,4 μL
R 20 μM	0,2 μL	16,4 μL	R 20 μM	0,2 μL	16,4 μL
Sybr	5,0 μL	410 μL	Evagreen	2,0 μL	164 μL
cDNA	1,5 μL		cDNA	1,5 μL	

Poleg vzorcev in standardov smo ob vsaki reakciji na ploščico za PCR nanesti tudi slepo kontrolo, ki je bila sestavljena iz osnovne zmesi z dodano ultračisto vodo brez RNAz namesto dodatka cDNA. Slepa kontrola nam potrdi dejstvo, da podvojevanje ni posledica kontaminacije, ki bi se lahko zgodila med pripravo ali kot posledica kontaminiranih reagentov za qPCR. Kontrola zazna tudi nastanek dimerov začetnikov (43).

Prav tako smo pri vsaki izvedbi qPCR na ploščico nanesti tudi negativno kontrolo NTC (ang. no template control). Ta je poleg osnovne zmesi vsebovala RNA, razredčeno na 1 ng/ μL . Negativna kontrola bi nam pokazala prisotnost genomske DNA v vzorcih z RNA, kontaminacijo z DNA ali nastanek dimerov.

3.2.5.4 Referenčni geni in normalizacija

Kot interno kalibracijo metode smo uporabili endogeno kontrolo z referenčnimi geni. To so geni, ki naj bi bili konstitutivno izraženi, prisotni v podobnih koncentracijah v različnih tipih celic v vseh stopnjah razvoja in neodzivni na interne in eksterne dražljaje (43). Po

izvedbi qPCR naših vzorcev z začetniki za pet različnih referenčnih genov (Tabela XII) smo dobljene podatke o izražanju prenesli v program Excel. NormFinder je dodatek za Excel in je algoritem, ki identificira najbolj optimalen gen za normalizacijo na podlagi ekspresijske stabilnosti v danih vzorcih in eksperimentalnih pogojih. Na podlagi matematičnega modela poda indeks stabilnosti za vsak gen in kombinacijo najboljših dveh genov (44). Uporabili smo Jo Vandesompelejev pristop, kjer za bolj natančno normalizacijo uporabimo geometrijsko sredino več genov (40). Normalizacija popravi napake, ki lahko nastanejo pri pipetiranju in razlike v učinkovitosti reverzne transkripcije in qPCR, ki bi sicer privedle do napačne detekcije izhodne koncentracije RNA (cDNA).

Tabela XII: Prikaz sekvence in temperature tališča (T_t) začetnikov za izražanje referenčnih genov.

Gen	Ime začetnika	Sekvenca začetnika (5' - 3')	T_t [°C]
<i>ACTB</i>	mACTB	F: CTAAGGCCAACCGTGAAAAGAT	65,1
		R: CACAGCCTGGATGGCTACGT	67,5
<i>HPRT</i>	mHPRT	F: GCTCGAGATGTCATGAAGGAGAT	65,7
		R: AAAGAACTTATAGCCCCCCTTGA	64,6
<i>Mrpl46</i>	mMrpl46	F: GGGAGCAGGCATTCCTACAG	65,9
		R: GGTCCGGTCATTTTTTTTGTCA	66,6
<i>Srp72</i>	mSrp72	F: CACCCAGCAGACAGACAAACTG	67,1
		R: GCACTCATCGTAGCGTTCCA	66,3
<i>GAPDH</i>	mGADPH	F: AACTTTGGCATTGTGGAAGG	63,8
		R: GGATGCAGGGATGATGTTCT	63,9

3.2.6 Agarozna gelska elektroforeza

Pogosta metoda za določanje kvalitete nastalih produktov qPCR je gelska elektroforeza. Koncentracija in tip agaroze v trdnem matriksu, določata njegovo gostoto. Agarozni gel z 1-2 % deležem agaroze omogoča ločevanje produktov PCR dolgih med 100 bp in 10 kbp. Matriks služi kot molekularno sito med elektroforezo, kjer negativno nabita molekula DNA potuje s pomočjo enosmernega električnega toka k pozitivno nabiti anodi. Produkti na gelu se ločijo na podlagi njihove velikosti in se primerjajo s standardno raztopino DNA. Sledi detekcija ločenih lis in njihovo ovrednotenje (43).

Za pripravo 2 % agaroznega gela smo v elermajerico natehtali 1,5 g agaroze, dodali 75 mL pufra TAE ter pokrito z urnim steklom v mikrovalovni pečici segrevali dokler se agaroz ni raztopila. Količino izparele vode smo nadomestili z destilirano vodo. Ko se je zmes

nekoliko ohladila, smo v digestoriju dodali 2 μ L barvila Midori Green, premešali ter vlili v nosilec za gel z dvema glavnikoma. Strjen gel smo po odstranitvi glavnika uporabili za ločevanje ali pa smo ga shranili v hladilniku na 4 °C. Gel smo položili v kadičko za elektroforezo v kateri je bil TAE pufer. Za določitev velikosti smo uporabili standardno raztopino Quick-Load® 100 bp DNA Ladder, kot nanašalni pufer pa Blue/Orange 6x Loading Dye. Elektroforeza je potekala pri konstantni napetosti 100 V 25-30 minut. Sledila je detekcija lis z aparaturo za poslikavo gela G:BOX, kjer z UV svetlobo barvilo Midori Green spravimo v vzbujeno stanje. Pri prehodu v osnovo stanje barvilo emitira svetlobo v vidnem območju. Sledilo je ovrednotenje lis s programsko opremo GeneSnap.

3.3 Statistična analiza rezultatov

Statistično analizo smo izvedli s programom GraphPad Prism. S pomočjo parametričnega testa dvofaktorske analize variance (ANOVA) za ponavljajoče meritve smo določili statistične razlike. Predpostavko testa normalno porazdelitev vzorcev smo preverili z testoma Shapiro-Wilk in D'Agostino Pearson. Če se vzorci niso porazdeljevali normalno, smo jih pretvorili v logaritmične vrednosti in ponovno preverili porazdeljevanje z obema testoma. Logaritemska transformacija je bila potrebna pri rezultatih za izražanje podenot β_1 , β_2 in β_5 pri dendritičnih celicah in pri β_1 , β_2 , β_5 in β_{2i} pri limfocitih T, limfocitih B, monocitih in granulocitih. Predpostavili smo homogenost varianc.

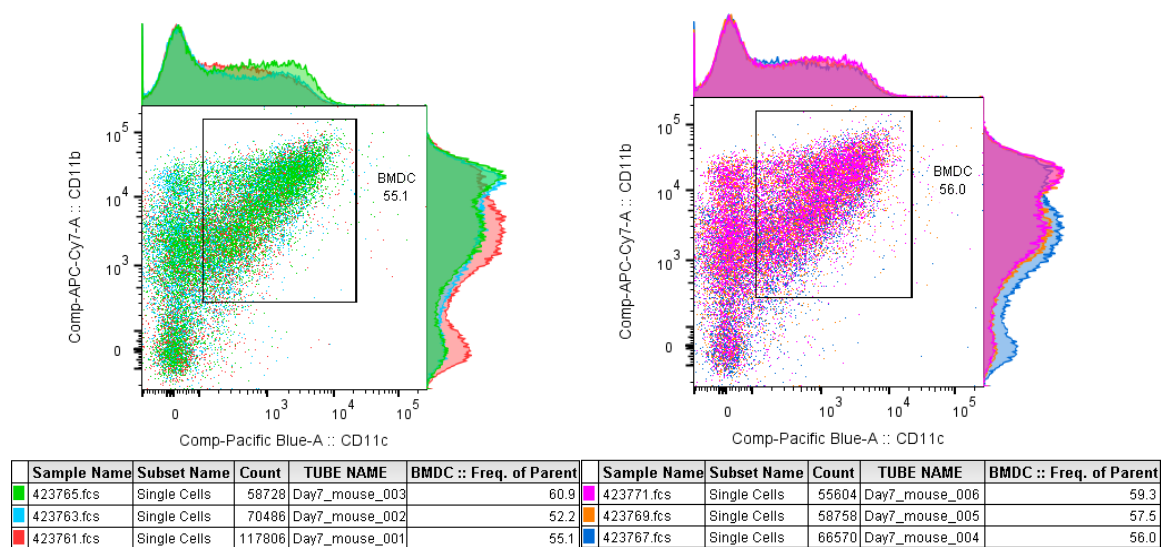
Pri rezultatih statističnega testa smo bili pozorni predvsem na p vrednost interakcije in obeh faktorjev. V primeru statistično značilnih razlik v interakciji (sistematične razlike med stolpci niso iste za vsako vrstico in obratno) smo test zavrgli. Po analizi ANOVE za ponavljajoče meritve smo preverili tudi parameter za ujemanje med skupinami (ang. Subjects matching), ki pove, koliko celotne variacije med vzorci je zaradi razlik med posameznimi skupinami/osebki.

Pri testiranju vpliva faktorjev ničelna hipoteza predpostavlja, da ni razlik med povprečji vzorcev skupin. To smo zavrgli, če je bil p manjši od stopnje tveganja 0,05 ($\alpha = 0,05$) in sprejeli alternativno, ki pravi, da so razlike med povprečji vzorcev prisotne. Ker nam ANOVA pove le, če so razlike prisotne, ne pa kje so, se poslužujemo preizkusa mnogoternih primerjav (*post-hoc* testov). Izvedeni *post-hoc* test sta bila Tukeyev in Sidak test. Statistično značilna razlika je za vsak posamezni par vzorcev označena na grafu. Na vseh grafih je prikazano tudi povprečje s standardno napako aritmetične sredine.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

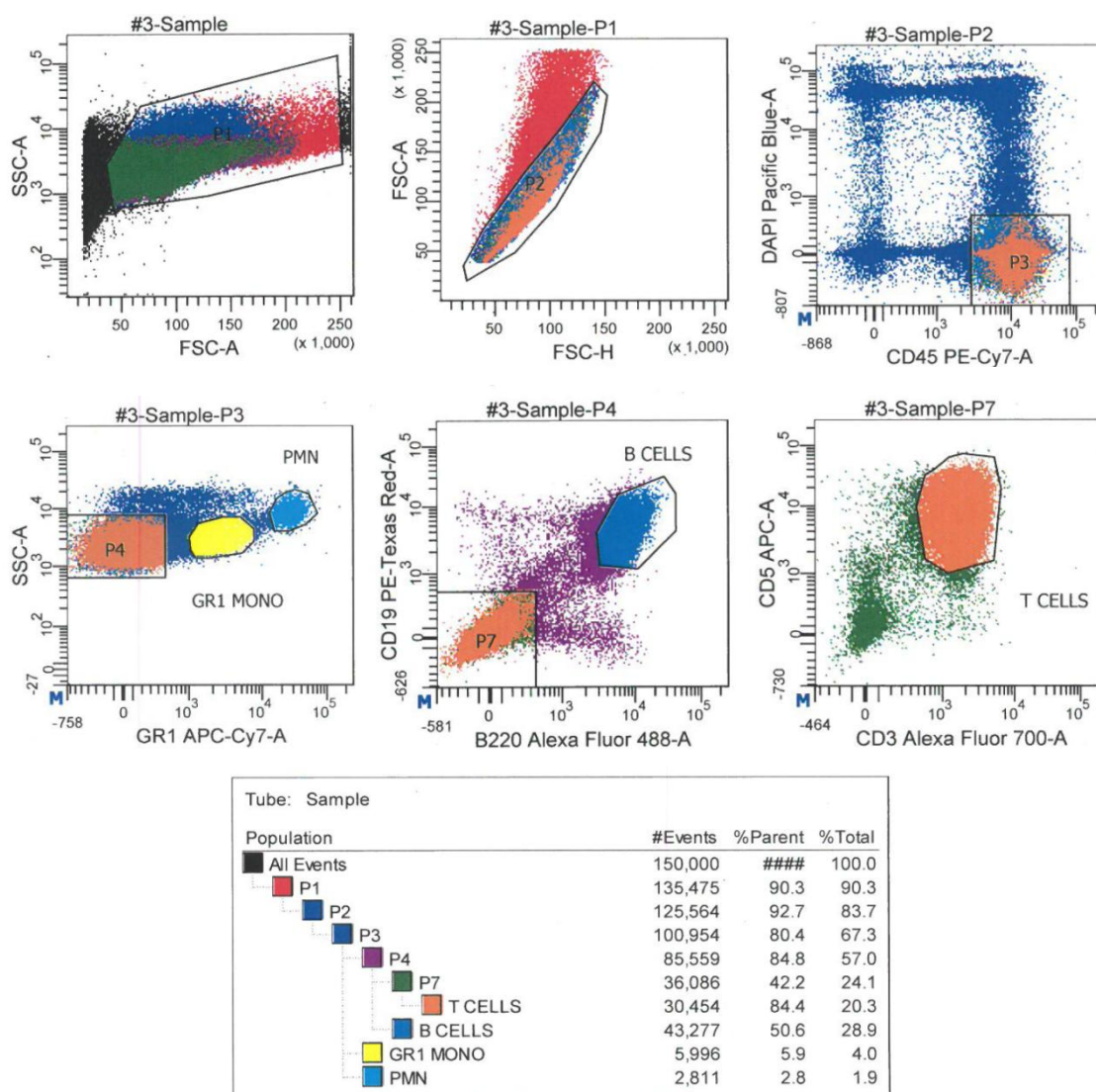
4.1 Karakterizacija celic

Na inštitutu Singapore Immunology Network so s pomočjo pretočne citometrije karakterizirali in ločili celice. Izolirane celice kostnega mozga se *in vitro* ob prisotnosti rastnih faktorjev diferencirajo v dendritične celice. Sedem dni po gojenju so jim zato preverili fenotip in jih karakterizirali kot $CD11b^{+}CD11c^{+}$ (Slika 8).



Slika 8: Rezultati pretočne citometrije pri določanju fenotipa dendritičnih celic po sedmih dneh gojenja *in vitro*. Dendritične celice so bile karakterizirane kot $CD11b^{+}$ in $CD11c^{+}$.

Pri vzorcih, iz katerih so bili ločeni limfociti T, limfociti B, monociti in granulociti, so najprej odstranili fragmente celic s pomočjo določitve granularnosti in velikosti celic (SSC-A in FSC-A), v naslednjem koraku pa so bile odstranjene celice, ki so se nahajale v skupkih (FSC-A in FSC-H) (Slika 9). Sledilo je ločevanje živih $CD45^{+}$ celic (DAPI in $CD45$) od mrtvih ali $CD45$ negativnih. Izmed teh celic so bile $GR1^{-}$ nadalje ločene na $CD45^{+}Gr1^{-}B220^{+}CD19^{+}$ limfocite B in $CD45^{+}Gr1^{-}CD3^{+}CD5^{+}$ limfocite T. Izmed $GR1$ pozitivnih celic pa so ločili $CD45^{+}Gr1^{+}$ monocite in $CD45^{+}Gr1^{+}$ granulocite.

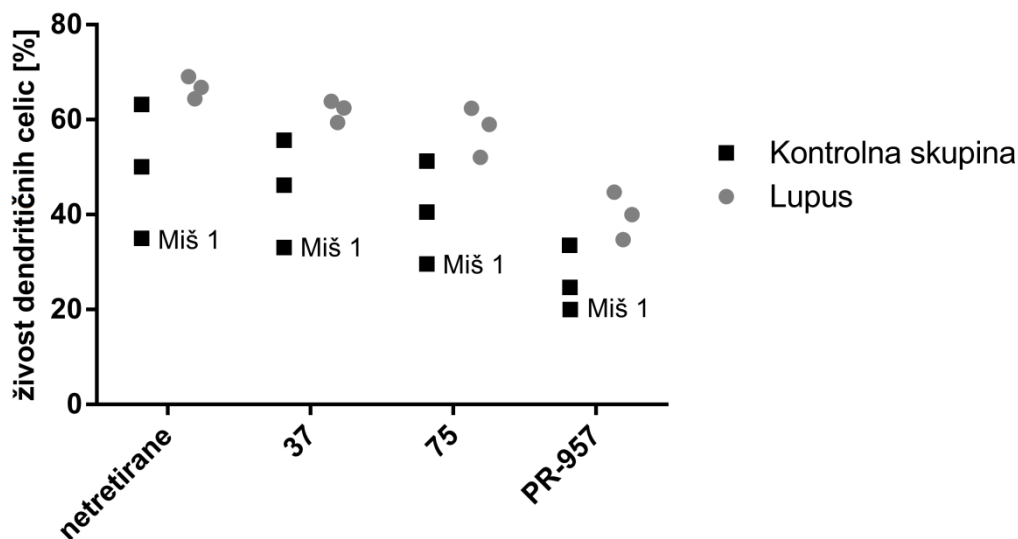


Slika 9: Rezultati ločevanja preučevanih celic s pretočnim citometrom. Prikazani so rezultati za miš 3. Pri ločevanju so bile najprej izbrane le intaktne celice (SSC-A in FSC-A) nato je sledilo odstranjevanje celic, ki so se nahajale v skupkih (FSC-A in FSC-H). V naslednjem koraku so bile izbrane žive $CD45^+$ celice (DAPI in $CD45$), izmed katerih so v naslednjem koraku ločili GR^+ monocite in GR^+ granulocite ter GR^- celice. Iz GR^- celic so z označevalci $CD19$ in $B220$ ločili $CD45^+GR1^-B220^+CD19^+$ limfocite B ali z označevalci $CD5$ in $CD3$ $CD45^+$ ločili $Gr1^-CD3^+CD5^+$ limfocite T.

4.2 Živost dendritičnih celic po inkubaciji z zaviralci

Po inkubaciji dendritičnih celic s selektivnimi zaviralci imunoproteasoma (spojina 37, 75 in PR-957) so na inštitutu Singapore Immunology Network merili živost celic. Rezultati po 24-urni inkubaciji so prikazani na sliki 10. Ker je bila živost celic pri prvi miši iz kontrolne skupine že pri netretiranih celicah nizka, smo to miš izpustili iz analize. Spojina PR-957 se

je po 24-urni izpostavljenosti v uporabljeni koncentraciji 200 nM izkazala za citotoksično, zato smo te rezultate iz analize prav tako izvzeli.



Slika 10: Prikaz živosti dendritičnih celic skupine z lupusom in kontrolne skupine, po 24-urni izpostavljenosti spojinam 37, 75 in PR-975 ter neizpostavljenih celic.

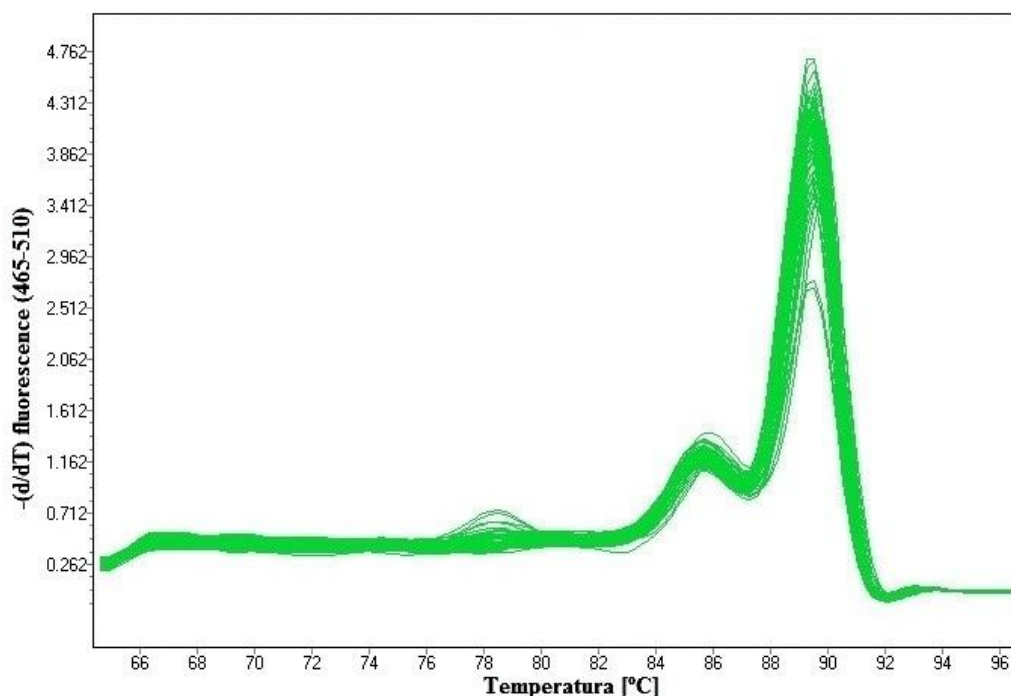
4.3 Optimizacija metode qPCR

4.3.1 Optimizacija koncentracije začetnikov in njihove temperature prileganja

Za analizo izražanja genov smo uporabili oligonukleotidne začetnike, ki so navedeni v Tabela XII v poglavju 3.2.5.4. Pred analizo vzorcev smo optimizirali metodo qPCR s standardno krivuljo, pripravljeno iz mešanice nekaj eksperimentalnih vzorcev. Koncentracije standardov za standardno krivuljo so znašale od 15 ng/μL do 0,46875 ng/μL. Pri izbiri ustreznih reakcijskih pogojev smo bili pozorni na učinkovitost pomnoževanja, napako pri pomnoževanju in talilno krivuljo nastalih produktov. Testirane koncentracije oligonukleotidnih začetnikov so ležale v območju 200 - 800 nM. Temperaturo prileganja smo prilagodili izbranemu paru začetnikov glede na njuno temperaturo tališča. Pri prenizki temperaturi bi se začetniki vezali nespecifično, pri previsoki temperaturi pa do prileganja začetnikov sploh ne bi prišlo.

Pomnoževanje cDNA smo izvedli v cikličnem termostatu C 1000™ Thermal Cycler, produkte pa detektirali s pomočjo agarozne gelske elektroforeze. Na gelu smo bili pozorni na število in velikost nastalih produktov.

Pri optimizaciji reakcijskih pogojev za analizo izražanja gena za podenoto $\beta 1$ z oligonukleotidnima začetnikoma mBeta1 je talilna krivulja nakazovala, da je nastal dodaten produkt (Slika 11). Nastalo zmes smo po qPCR reakciji z mBeta1 začetnikoma zato nanesti na agarozni gel in izvedli elektroforezo. Slika agaroznega gela je pokazala, da je nastal en produkt ustrezne velikosti. Po pregledu literature smo izsledili članek (45), kjer so avtorji preučevali problem neobičajno oblikovanih talilnih krivulj pri qPCR. Ugotovili so, da je produkt, katerega talilna krivulja ima dva vrha, kjer leži en vrh ob vznožju drugega (ang. shoulder peak), produkt specifičnega pomnoževanja. Do tega pojava pride z večjo verjetnostjo pri daljših produktih, ki vsebujejo več talilnih domen z različnimi deleži gvanina in citozina (45).



Slika 11: Talilna krivulja standardov po qPCR z oligonukleotidnim začetnikom mBeta1. Talilna krivulja z dvema vrhoma, kjer en vrh leži ob vznožju drugega je lahko produkt specifičnega pomnoževanja (45).

Optimizirani reakcijski pogoji za obe skupini eksperimentalnih vzorcev so podani v tabelah XIII in XIV. Pogoji izražanja za posamezni gen so v obeh skupinah vzorcev enaki z izjemo osnovne zmesi, saj smo na začetku eksperimentalnega dela uporabljali osnovno zmes SYBR® Select Master Mix, kasneje pa prešli na uporabo osnovne zmesi HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix.

Tabela XIII: Optimizirani pogoji za izražanje posameznih genov s qPCR v dendritičnih celicah.

Gen / podenota	Temperatura prileganja	Osnovna zmes	Koncentracija začetnikov
<i>PSMB6</i> / $\beta 1$	63 °C	5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix	400 nM
<i>PSMB7</i> / $\beta 2$	63 °C	5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix	400 nM
<i>PSMB5</i> / $\beta 5$	62 °C	5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix	400 nM
<i>PSMB9</i> / $\beta 1i$ (LMP2)	60 °C	SYBR® Select Master Mix	400 nM
<i>PSMB10</i> / $\beta 2i$ (MECL1)	60 °C	SYBR® Select Master Mix	400 nM
<i>PSMB8</i> / $\beta 5i$ (LMP7)	60 °C	5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix	400 nM
<i>Srp72</i>	60 °C	SYBR® Select Master Mix	200 nM
<i>GADPH</i>	60 °C	SYBR® Select Master Mix	200 nM
<i>ACTB</i>	60 °C	SYBR® Select Master Mix	200 nM
<i>Mrl46</i>	60 °C	SYBR® Select Master Mix	200 nM
<i>HPRT</i>	60 °C	SYBR® Select Master Mix	400 nM

Tabela XIV: Optimizirani pogoji za izražanje posameznih genov s qPCR v limfocitih T, limfocitih B, monocitih in granulocitih.

Gen / podenota	Temperatura prileganja	Osnovna zmes	Koncentracija začetnikov
<i>PSMB6</i> / $\beta 1$	63 °C	5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix	400 nM
<i>PSMB7</i> / $\beta 2$	63 °C	5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix	400 nM
<i>PSMB5</i> / $\beta 5$	62 °C	5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix	400 nM
<i>PSMB9</i> / $\beta 1i$ (LMP2)	60 °C	5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix	400 nM
<i>PSMB10</i> / $\beta 2i$ (MECL1)	60 °C	5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix	400 nM
<i>PSMB8</i> / $\beta 5i$ (LMP7)	60 °C	5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix	400 nM
<i>Mrl46</i>	60 °C	5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix	200 nM
<i>HPRT</i>	60 °C	5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix	400 nM

Izbira pravih pogojev za qPCR je predpogoj za ustrezno specifičnost in učinkovitost pomnoževanja cDNA ter natančen prikaz razlik med vzorci. Specifičnost je še toliko bolj pomembna pri uporabi interkalirajočih barvil (v primerjavi z uporabo nukleotidnih sond označenih s fluorescentnim barvilom), saj se interkalirajoča barvila vežejo nespecifično v nastalo DNA. Pri učinkovitosti smo se omejili na območje 1,8-2,1. Učinkovitosti in napake določene pri izražanju posameznih genov so prikazane v tabeli XV za skupino vzorcev z dendritičnimi celicam in v tabeli XVI za skupino vzorcev z limfociti T, limfociti B, monociti in granulociti. Napaka je podana kot srednja kvadratna napaka (ang. mean square error), in podaja odstopanje izmerjene vrednosti od napovedane vrednosti iz standardne krivulje. Vrednost napake je sprejemljiva v kolikor je manjša od 0,2 (41).

Tabela XV: Prikaz učinkovitosti in napake za vsak začetnik pri qPCR v dendritičnih celicah.

Gen / podenota	Učinkovitost	Napaka
<i>PSMB6</i> / $\beta 1$	1,897	0,011
<i>PSMB7</i> / $\beta 2$	1,983	0,013
<i>PSMB5</i> / $\beta 5$	1,966	0,010
<i>PSMB9</i> / $\beta 1i$ (LMP2)	1,873	0,134
<i>PSMB10</i> / $\beta 2i$ (MECL1)	2,095	0,017
<i>PSMB8</i> / $\beta 5i$ (LMP7)	1,933	0,008
<i>HPRT</i>	2,009	0,006
<i>Mrpl46</i>	1,997	0,008

Tabela XVI: Prikaz učinkovitosti in napake za vsak začetnik pri qPCR v limfocitih T, limfocitih B, monocitih in granulocitih.

Gen / podenota	Učinkovitost	Napaka
<i>PSMB6</i> / $\beta 1$	1,887	0,028
<i>PSMB7</i> / $\beta 2$	1,895	0,014
<i>PSMB5</i> / $\beta 5$	1,945	0,017
<i>PSMB9</i> / $\beta 1i$ (LMP2)	1,991	0,009
<i>PSMB10</i> / $\beta 2i$ (MECL1)	2,049	0,019
<i>PSMB8</i> / $\beta 5i$ (LMP7)	1,875	0,026
<i>HPRT</i>	2,006	0,008
<i>Mrpl46</i>	1,952	0,018

4.3.2 Izbor referenčnih genov in normalizacija

Po izvedbi qPCR z eksperimentalnimi vzorci smo dobili koncentracije izražanja vseh izbranih referenčnih genov. S pomočjo Excelovega dodatka Normfinder (44) smo

izračunali stabilnost ekspresije za vsak referenčni gen. Indeksi stabilnosti referenčnih genov so prikazani v tabeli XVII. Nižje vrednosti indeksa pomenijo bolj stabilno izražanje genov. Kot najbolj primeren gen se je izkazal *HPRT* z indeksom stabilnosti 0,042, najbolj primerna kombinacija pa *HPRT* in *Mrpl46* s skupnim indeksom stabilnosti 0,031.

Tabela XVII: Vrednosti indeksa stabilnosti za izražanje referenčnih genov.

Gen	Indeks stabilnosti
<i>HPRT</i>	0,042
<i>Mrpl46</i>	0,045
<i>ACTB</i>	0,051
<i>Srp72</i>	0,149
<i>GAPDH</i>	0,237

Za potrebe normalizacije izražanja genov smo pri vsakem vzorcu posebej izračunali geometrijsko sredino vrednosti izražanja referenčnih genov *HPRT* in *Mrpl46*. Vrednost izražanja posameznega gena za podenote proteasoma in imunoproteasoma smo delili z izračunano geometrijsko sredino in tako dobili normalizirane vrednosti izražanja genov, ki smo jih uporabili pri nadaljnji analizi izražanja genov za podenote proteasoma in imunoproteasoma.

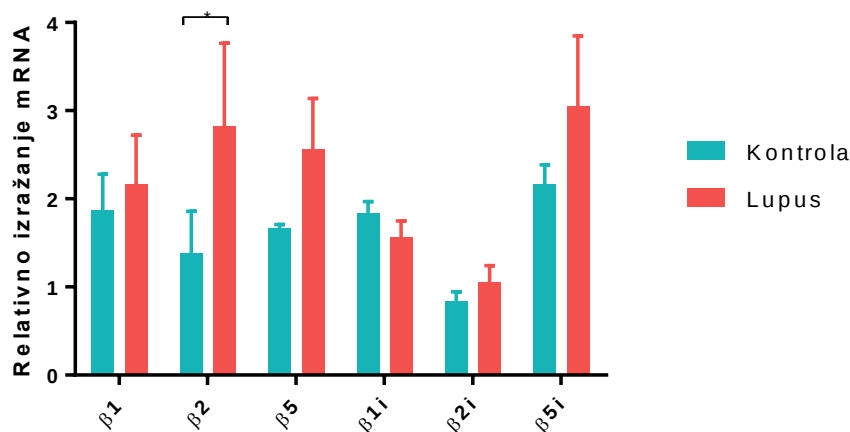
4.4 Analiza izražanja genov podenot proteasoma in imunoproteasoma

4.4.1 Izražanje genov v dendritičnih celicah

V prvem delu eksperimentalnega dela smo želeli ovrednotiti izražanje genov za podenote proteasoma in imunoproteasoma na nivoju mRNA v dendritičnih celicah mišjega modela lupusa. Zanimalo nas je, kakšno je izražanje v CD11b⁺CD11c⁺ dendritičnih celicah.

Na sliki 12 je prikazano relativno izražanje posameznih podenot proteasoma in imunoproteasoma glede na izbrana referenčna gena v dendritičnih celicah, ki niso bile izpostavljene zaviralcu imunoproteasoma. Z izjemo podenote $\beta 1i$, je trend izražanja vseh preučevanih podenot višji pri miših z lupusom v primerjavi s kontrolnimi miši brez lupusa, vendar je bila statistično značilna razlika ($p < 0,0001$) potrjena le pri izražanju podenote $\beta 2$ med skupino miši z lupusom in kontrolno skupino. Statistično značilne razlike v izražanju podenote $\beta 2$ na nivoju mRNA v dendritičnih celicah je ugotovil tudi Lesemann

(2010) v svojem doktorskem delu, kjer je preučeval izražanje podenot proteasoma $\beta 1$, $\beta 2$ in $\beta 5$ ter podenot imunoproteasoma $\beta 1i$, $\beta 2i$ in $\beta 5i$ pri pacientih z avtoimunsko boleznijo Sjögrenov sindrom (46). Ugotovil je, da je v dendritičnih celicah statistično značilno višje izražanje podenot $\beta 2$ ter $\beta 5i$ pri pacientih v primerjavi s kontrolno skupino.



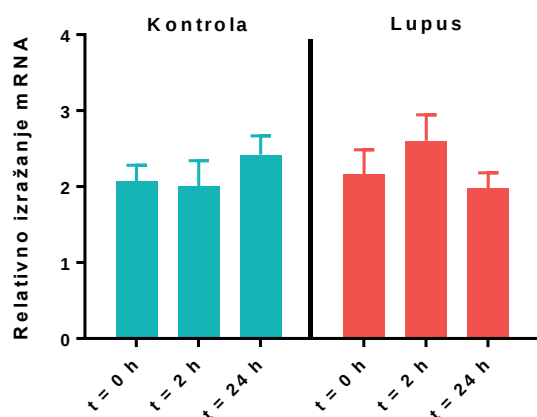
Slika 12: Relativna genska ekspresija podenot proteasoma in imunoproteasoma pri miših z lupusom in kontrolnih miših v dendritičnih celicah. Prikazano je relativno izražanje genov za podenote proteasoma $\beta 1$, $\beta 2$ in $\beta 5$ ter podenote imunoproteasoma $\beta 1i$, $\beta 2i$ in $\beta 5i$ glede na referenčna gena HPRT in Mrpl46. Horizontalna linija z zvezdo (*) na grafu prikazuje statistično signifikantno razliko ($p < 0,05$) ugotovljeno s pomočjo ANOVE in sledečega *post-hoc* Sidakovega testa.

4.4.2 Vpliv zaviralcev podenote $\beta 5i$ na izražanje genov v dendritičnih celicah

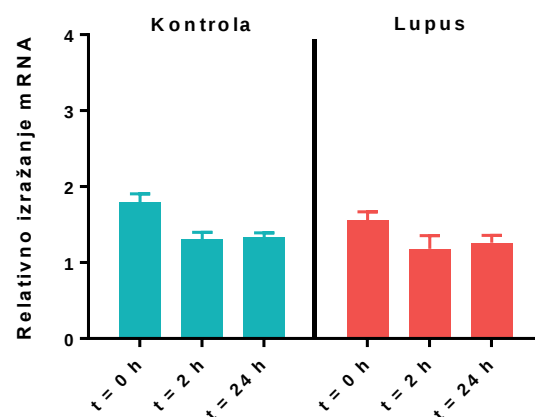
Želeli smo preučiti tudi vpliv treh različnih zaviralcev podenote imunoproteasoma $\beta 5i$ v koncentraciji 200 nM po 2- ter 24-urni izpostavljenosti zaviralcu *in vitro* na izražanje genov za podenote proteasoma in imunoproteasoma. Vpliv izpostavljenosti smo preučevali na $CD11b^+CD11c^+$ dendritičnih celicah miši z lupusom in kontrolnih miši.

Pri spojini **37**, ki je reverzibilni zaviralec, smo ugotovili statistično signifikantne razlike v izražanju genov za podenote $\beta 2$ ($p = 0,0011$; ANOVA), $\beta 5$ ($p = 0,0356$; ANOVA) in $\beta 5i$ ($p = 0,0095$; ANOVA) med mišmi z lupusom in mišmi kontrolne skupine (Slika 13). Statistično značilne razlike so tudi v izražanju genov za podenoti $\beta 1i$ ($p = 0,0425$; ANOVA) in $\beta 5i$ ($p = 0,0120$; ANOVA) med različnimi časi izpostavljenosti. Statistično signifikantno nižje izražanje podenote $\beta 5i$ opazimo pri lupusu v času 24 ur v primerjavi z časom 0 ur ($p = 0,0161$; Tukeyev test) ter pri 24 urah v primerjavi z dvema urama ($p = 0,0303$; Tukeyev test) (Slika 13 e).

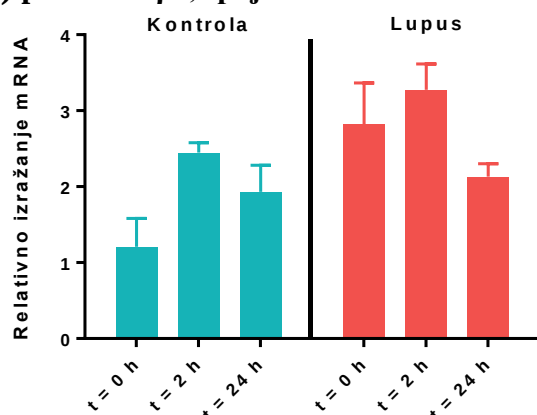
a) podenota $\beta 1$, spojina 37



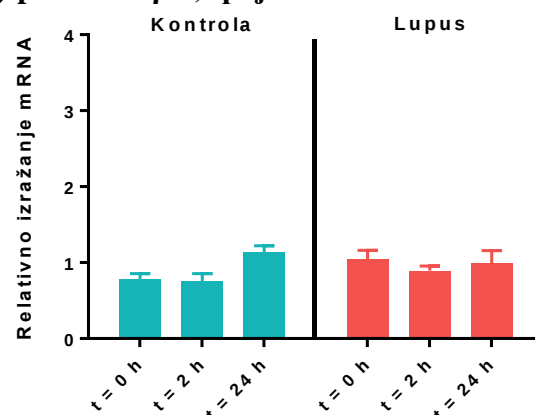
b) podenota $\beta 1i$, spojina 37



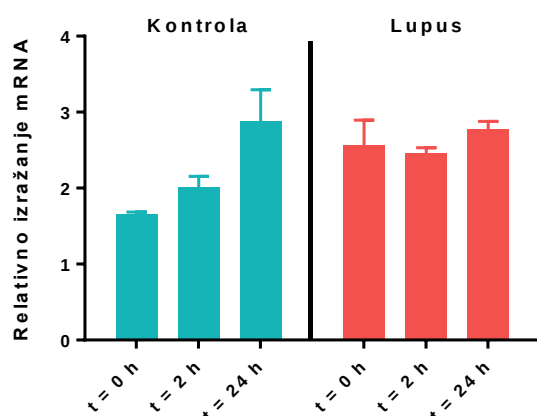
c) podenota $\beta 2$, spojina 37



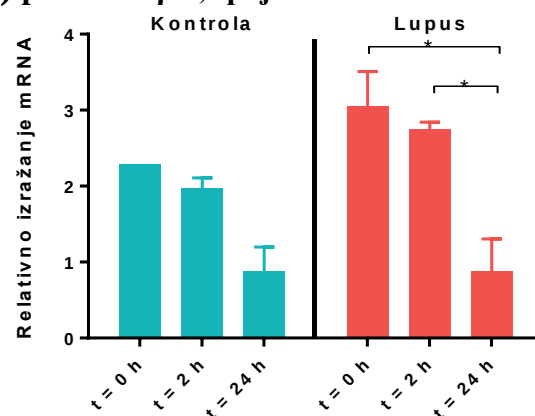
č) podenota $\beta 2i$, spojina 37



d) podenota $\beta 5$, spojina 37



e) podenota $\beta 5i$, spojina 37



Slika 13: Izražanje genov za podenote proteasoma in imunoproteasoma v dendritičnih celicah miši po inkubaciji s spojino 37. Prikazano je relativno izražanje genov za podenote a) $\beta 1$, b) $\beta 1i$, c) $\beta 2$, č) $\beta 2i$, d) $\beta 5$ in e) $\beta 5i$ ob času 0 h in po 2 h ter po 24 h izpostavljenosti spojini 37 v 200nM koncentraciji glede na referenčna gena HPRT in Mrpl46. Horizontalna linija z zvezdo (*) na grafu prikazuje statistično značilno razliko ($p < 0,05$) ugotovljeno s pomočjo ANOVE in sledečega post-hoc Sidakovega testa.

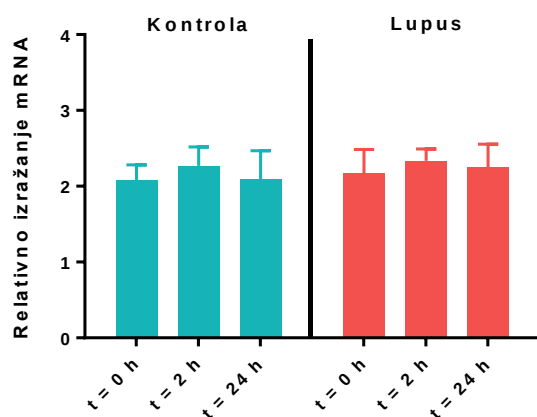
Nadalje smo preučili vpliv spojine 75, ki je ireverzibilni zaviralec, na izražanja genov za podenote proteasoma in imunoproteasoma. Statistično značilno nižje izražanje podenote $\beta 2$

pri kontrolni skupini v primerjavi z lupusom ob času 0 ur smo ugotovili s Sidakovim testom. Pri izražanju gena za podenoto $\beta 5i$ smo ugotovili statistično značilne razlike med različnimi časi izpostavljenosti ($p = 0,0159$; ANOVA) (Slika 14 e). Gen za podenoto $\beta 5i$ se pri miših z lupusom statistično značilno nižje izraža po 24-tih urah v primerjavi s stanjem ob času 0 ur ($p = 0,0069$; Tukeyev test).

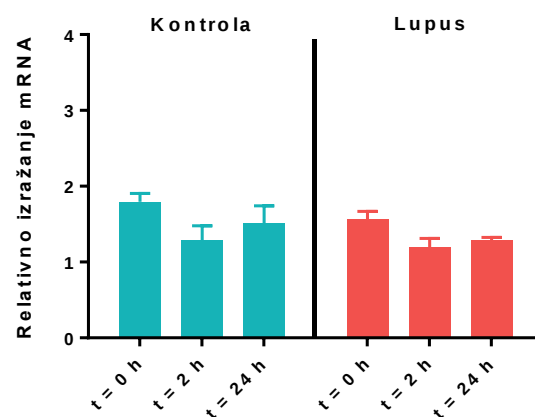
Tako pri spojini **37** kot pri spojini **75**, ki sta selektivna zaviralca podenote $\beta 5i$, smo pri dendritičnih celicah, ki so bile 24 ur inkubirane s spojinama, ugotovili zmanjšano izražanje gena za podenoto $\beta 5i$ pri miših z lupusom (in s trendom tudi v kontrolni skupini) v primerjavi z začetnim stanjem ($t = 0$ h) (Slika 13 e in Slika 14 e). Hkrati se pri obeh spojinah kaže trend v zvišani ekspresiji podenot $\beta 5$ in $\beta 2$ pri kontrolni skupini po 24-urni izpostavljenosti (Slika 13 d in Slika 14 d). Pri miših z lupusom je po inkubaciji z zaviralcema kompenzacija ekspresije podenot $\beta 5$ in $\beta 2$ manj vidna.

Spojina PR-957 je tako kot spojina **75** ireverzibilni zaviralec. Pri zaviralcu PR-957 smo izpustili meritve v času 24 ur, ker se je v eksperimentu spojina v uporabljeni koncentraciji (200 nM) izkazala kot citotoksična. Ugotovili smo statistično značilno različno izražanje med časoma 0 ur in dve uri pri podenoti $\beta 1i$ ($p = 0,366$; ANOVA) po izpostavljenosti spojini PR-957. Izražanje gena za podenoto $\beta 2$ pri kontrolni skupini po inkubaciji z zaviralcem po dveh urah nekoliko izstopa.

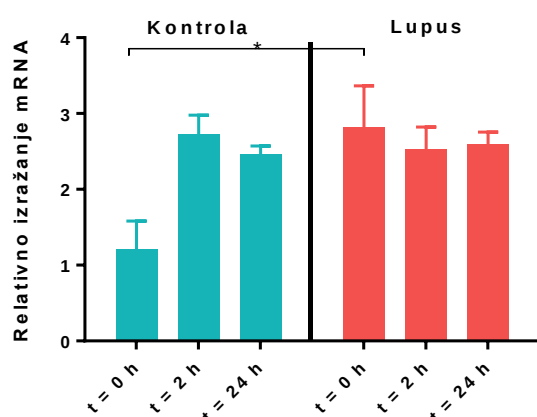
a) podenota $\beta 1$, spojina 75



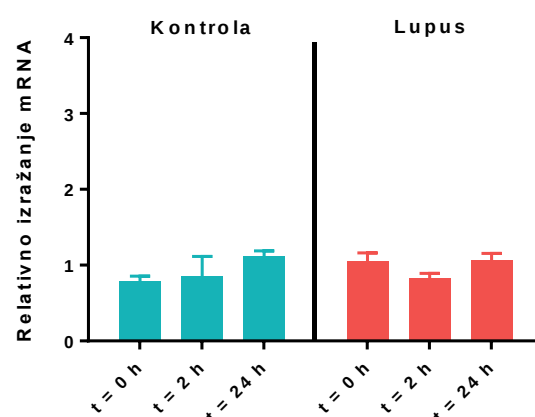
b) podenota $\beta 1i$, spojina 75



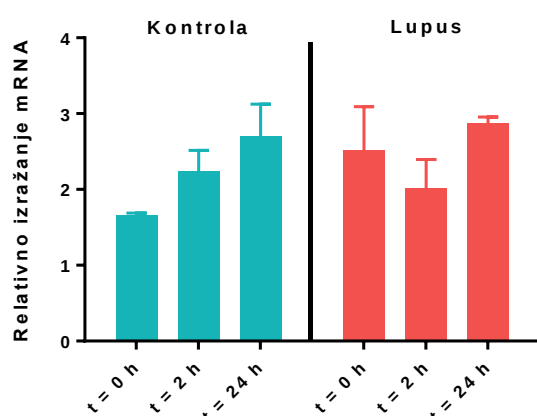
c) podenota $\beta 2$, spojina 75



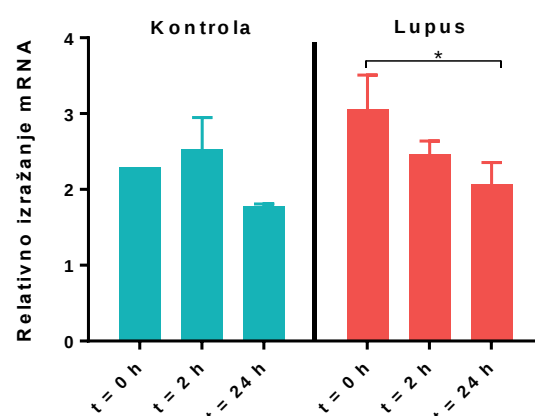
č) podenota $\beta 2i$, spojina 75



d) podenota $\beta 5$, spojina 75

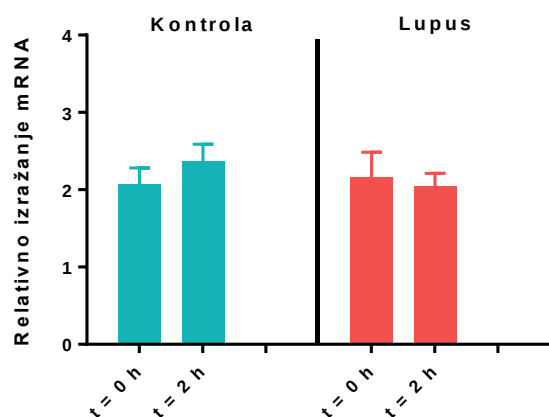


e) podenota $\beta 5i$, spojina 75

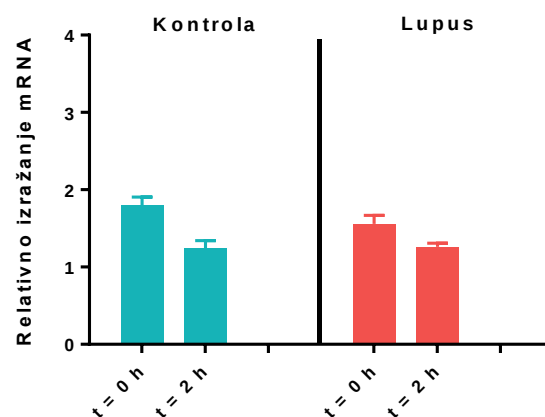


Slika 14: Izražanje genov za podenote proteasoma in imunoproteasoma v dendritičnih celicah miši po inkubaciji s spojino 75. Prikazano je relativno izražanje genov za podenote a) $\beta 1$, b) $\beta 1i$, c) $\beta 2$, č) $\beta 2i$, d) $\beta 5$ in e) $\beta 5i$ ob času 0 ur in po dveh urah ter po 24 urah izpostavljenosti spojini 75 v 200nM koncentraciji glede na referenčna gena HPRT in Mrpl46. Horizontalna linija z zvezdo (*) na grafu prikazuje statistično značilno razliko ($p < 0,05$) ugotovljeno s pomočjo ANOVE in sledečega post-hoc Sidakovega in Tukeyevega testa.

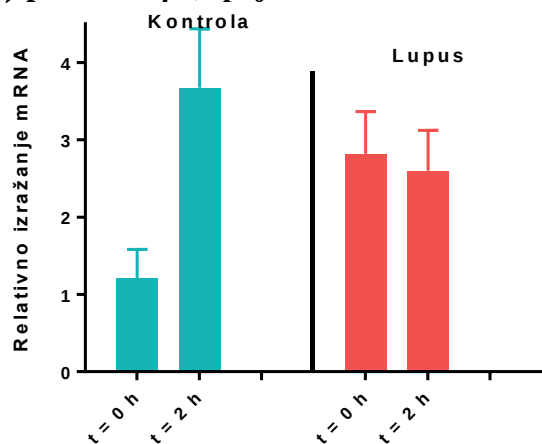
a) podenota $\beta 1$, spojina PR-957



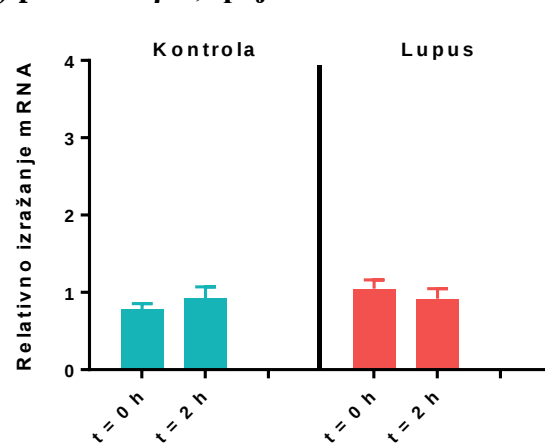
b) podenota $\beta 1i$, spojina PR-957



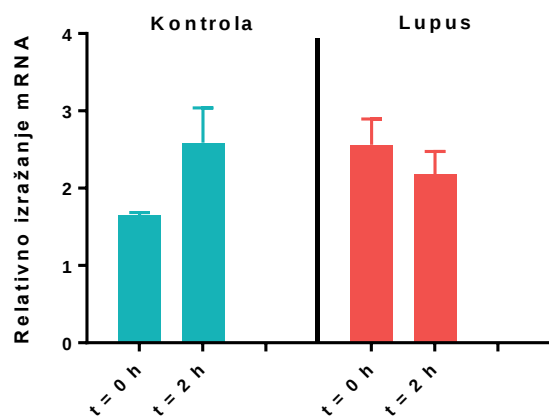
c) podenota $\beta 2$, spojina PR-957



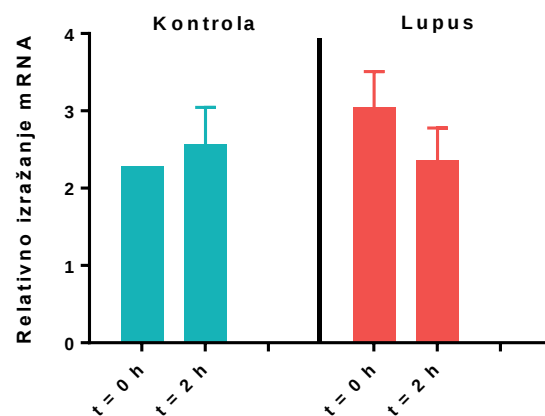
č) podenota $\beta 2i$, spojina PR-957



d) podenota $\beta 5$, spojina PR-957



e) podenota $\beta 5i$, spojina PR-957



Slika 15: Izražanje genov za podenote proteasoma in imunoproteasoma v dendritičnih celicah miši po inkubaciji s spojino PR-957. Prikazano je relativno izražanje genov za podenote a) $\beta 1$, b) $\beta 1i$, c) $\beta 2$, č) $\beta 2i$, d) $\beta 5$ in e) $\beta 5i$ ob času 0 ur in po dveh urah izpostavljenosti spojini PR-957 v 200nM koncentraciji glede na referenčna gena HPRT in Mrpl46.

V raziskavi Meiners in sodelavcev (2003) z reverzibilnim zaviralcem proteasoma MG132 in ireverzibilnim zaviralcem proteasoma laktacistinom pokazali spremembe v izražanju

podenot proteasoma na nivoju mRNA v celicah podgan (47). Po šestih urah izpostavljenosti je v njihovi študiji prišlo do zvišanja ekspresije vseh 20S konstitutivnih podenot z ATPazno aktivnostjo. Zvišano izražanje je bilo časovno in koncentracijsko odvisno. Do povišanja izražanja podenot imunoproteasoma $\beta 1i$ je prišlo le v majhnem obsegu, pri $\beta 5i$ pa je prišlo do znižanega izražanja. Podobno našem eksperimentalnem delu je po reverzibilni selektivni inhibiciji podenote imunoproteasoma $\beta 5i$ s spojino **37** po dveh urah izpostavljenosti prišlo do zvišanja ekspresije podenot proteasoma $\beta 1$, $\beta 2$ in $\beta 5$ pri lupusu in kontrolni skupini (izjema je $\beta 5$ podenota pri lupusu, kjer je bilo izražanje nižje) (Slika 13). Nasprotno rezultatom Meiners in sodelavcev naši rezultati ob 2-urni inhibiciji s spojino **37** kažejo na znižano izražanje podenote $\beta 1i$ pri lupusu in kontrolni skupini. Dvourni inhibicija s spojino **75** in s spojino PR-957 je v kontrolni skupini vodila do večjega izražanja podenot proteasoma, kar se ujema z rezultati Meiners in sodelavcev (Slika 14 in Slika 15).

4.4.3 Izražanje genov v različnih tipih celic

V drugem delu eksperimentalnega dela smo želeli ovrednotiti izražanje genov za podenote proteasoma $\beta 1$, $\beta 2$ in $\beta 5$ ter imunoproteasoma $\beta 1i$, $\beta 2i$ in $\beta 5i$ na nivoju mRNA v limfocitih T, limfocitih B, monocitih in granulocitih.

Med poglavitne ugotovitve štejemo višjo ekspresijo podenot proteasoma $\beta 1$, $\beta 2$ in $\beta 5$ tako pri miših z lupusom, kot pri kontrolni skupini v granulocitih v primerjavi z limfociti T, limfociti B in monociti (Slika 16). Pri miših z lupusom je v granulocitih nižje izražanje genov za podenote proteasoma v primerjavi s kontrolno skupino. Nasprotno pa smo pri dendritičnih celicah (Slika 12) opazili pri miših z lupusom višje izražanje proteasomskih podenot v primerjavi s kontrolno skupino. Vpletenost nevtrofilcev, ki so podskupina granulocitov, pri patogenezi SLE je posledica spremenjenega delovanja nevtrofilcev. Pri pacientih s SLE nevtrofilci lahko izkazujejo spremenjeno fagocitozno aktivnost, večkrat sprostito NET in izkazujejo zmanjšano odzivnost na citokine (48).

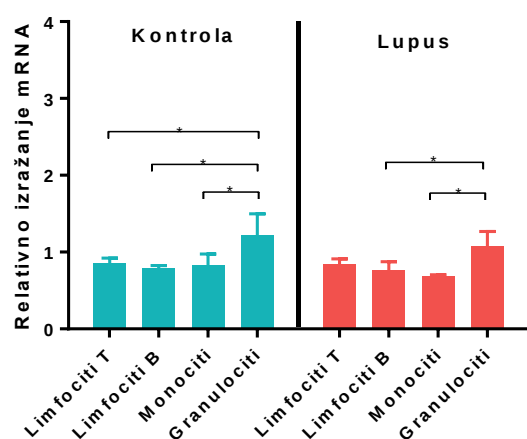
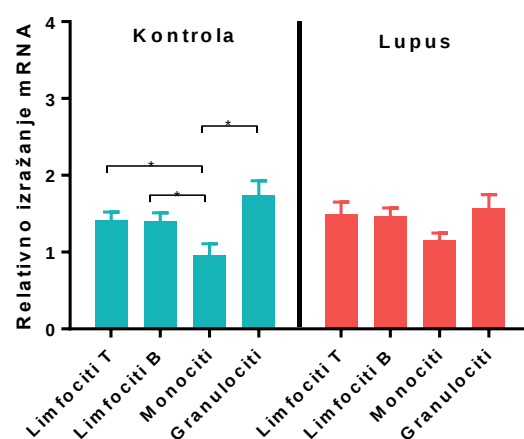
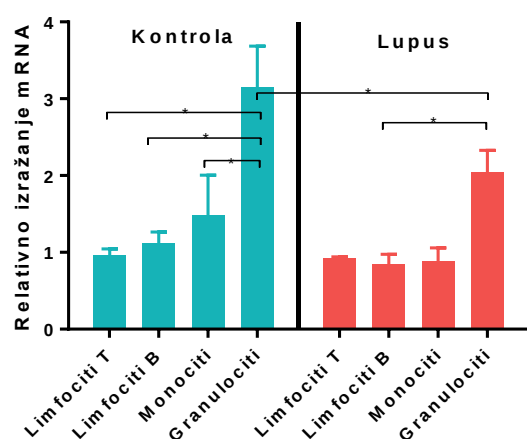
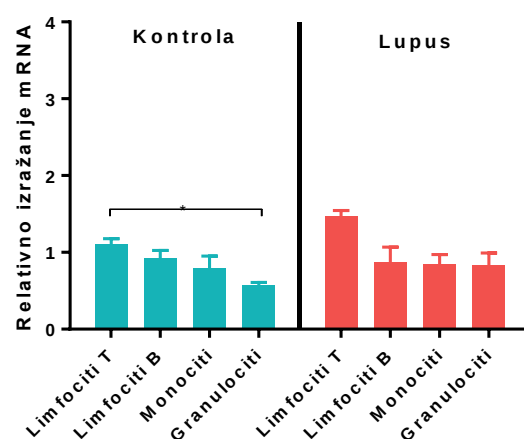
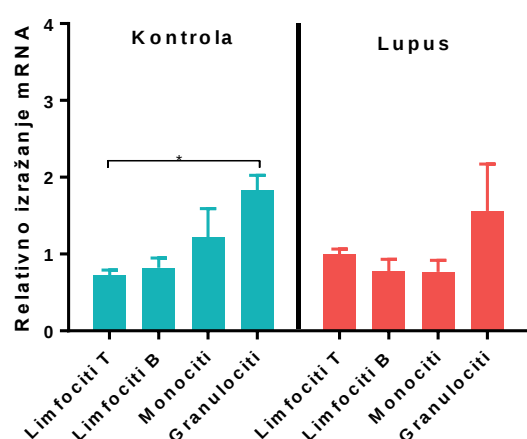
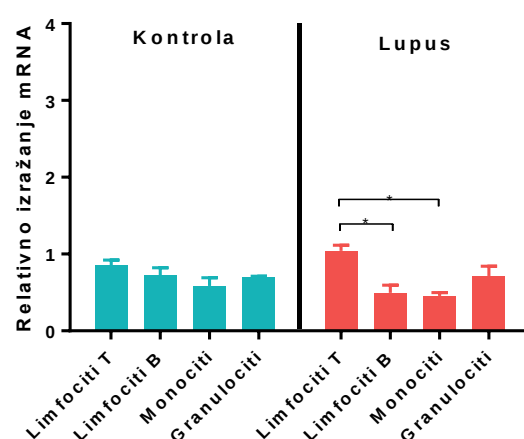
Pri analizi izražanja gena za podenoto proteasoma $\beta 1$ (Slika 16 a) smo ugotovili statistično značilno razliko v izražanju te podenote v različnih tipih celic ($p = 0,0003$; ANOVA). S Tukeyevim testom smo dokazali, da je statistično značilno največje izražanje pri kontrolni skupini v granulocitih v primerjavi z ostalimi tremi tipi celic. Pri miših z lupusom je bilo statistično značilno najvišje izražanje v granulocitih v primerjavi z monociti in limfociti B.

Statistično značilno razliko v izražanju gena za podenoto $\beta 2$ smo ugotovili v različnih tipih celic ($p = 0,0004$; ANOVA) (Slika 16 c). Tukeyev test je v kontrolni skupini potrdil statistično značilno največje izražanje v granulocitih v primerjavi z ostalimi tremi tipi celic. Martinez-Gamboa in sodelavci (2013) so pri preučevanju izražanja podenote $\beta 2$ v limfocitih T, limfocitih B in monocitih v kontrolni skupini ugotovili statistično značilno največje izražanje v monocitih (49), kar potrjujejo tudi naši rezultati. Pri miših z lupusom smo ugotovili statistično značilno razliko med granulociti in limfociti B. Dokazali smo tudi statistično razliko pri izražanju gena za podenoto $\beta 2$ v granulocitih med kontrolno skupino in lupusom ($p = 0,0490$).

V kontrolni skupini se je izražanje gena za podenoto proteasoma $\beta 5$ statistično značilno razlikovalo med različnimi tipi celic ($p = 0,0249$; ANOVA) (Slika 16 d). Statistično značilna razlika je po Tukeyevem testu pri kontrolni skupini med granulociti in limfociti T.

Statistično značilne razlike v izražanju med različnimi tipi celic so bile prisotne tudi pri vseh treh podenotah imunoproteasoma. Podenota $\beta 1i$ (Slika 16 b) se je v preučevanih celicah statistično značilno različno izražala ($p = 0,0011$; ANOVA). Sledeči *post-hoc* Tukeyev test nam je v kontrolni skupini podal statistično značilno najmanjše izražanje pri monocitih izmed vseh preučevanih tipov celic. Najnižje izražanje podenote $\beta 1i$ v monocitih izmed limfocitov T, limfocitov B in monocitov so odkrili tudi Martinez-Gamboa in sodelavci (2013) (49) ter Ghannam in sodelavci (2014) (50). Naši rezultati, da ni razlike v izražanju gena za podenoto $\beta 1i$ med skupino z lupusom in kontrolno skupino, sovpadajo s predhodnimi študijami, kjer so izmerili gensko ekspresijo podenote $\beta 1i$ na PBMC pacientov z lupusom (51).

Druga preučevana podenota imunoproteasoma je bila $\beta 2i$ (Slika 16 č). Tu smo statistično značilno razliko v izražanju podenote $\beta 2i$ dokazali med različnimi tipi celic ($p = 0,0128$; ANOVA), kot tudi med lupusom in kontrolo ($p = 0,0162$; ANOVA). Tukeyev test je pri kontrolni skupini pokazal statistično značilno višje izražanje v limfocitih T v primerjavi z granulociti. Izražanje podenote $\beta 2i$ je preučeval tudi Lesemann (2010) v svojem doktorskem delu (46). V kontrolni skupini med limfociti T, limfociti B in monociti ni zaznal statistično značilnih razlik v izražanju podenote $\beta 2i$, prav tako jih nismo zaznali pri našem eksperimentu.

a) podenota $\beta 1$ b) podenota $\beta 1i$ c) podenota $\beta 2$ č) podenota $\beta 2i$ d) podenota $\beta 5$ e) podenota $\beta 5i$ 

Slika 16: Izražanje genov za podenote proteasoma in imunoproteasoma pri miših z lupusom in kontrolnih miših v limfocitih T, limfocitih B, monocitih in granulocitih. Relativno izražanje podenote a) $\beta 1$, b) $\beta 1i$, c) $\beta 2$, č) $\beta 2i$, d) $\beta 5$ in e) $\beta 5i$ pri miših z lupusom in kontrolnih miših v različnih tipih celic glede na referenčna gena HPRT in Mrpl46. Horizontalna linija z zvezdo (*) na grafu prikazuje statistično značilno razliko ($p < 0,05$) ugotovljeno s pomočjo ANOVE in sledečega *post-hoc* Sidakovega testa.

Zadnja preiskovana podenota imunoproteasoma $\beta 5i$ se izraža statistično značilno različno v preiskovanih tipih celic ($p = 0,0004$; ANOVA) (Slika 16 e). Izražanje podenote $\beta 5i$ je statistično značilno višje v limfocitih T v primerjavi z limfociti B in monociti. Razlik v izražanju gena za podenoto $\beta 5i$ med lupusom in kontrolno skupino v našem delu nismo zaznali, kar potrjujejo tudi raziskave narejene pri pacientih z lupusom v PBMC (51).

Pri naši statistični obdelavi podatkov, je bilo število vzorcev majhno (7 miši za analizo limfocitov T, limfocitov B, granulocitov in monocitov ter 5 miši pri analizi dendritičnih celic), kar zmanjša moč testa in s tem detekcijo statistično signifikantnih razlik, kjer so te vendar le prisotne. Za zanesljivejše rezultate statistične obdelave bi bilo zato smiselno povečati število vzorcev.

Poudariti je potrebno, da se spremembe v izražanju podenot proteasoma in imunoproteasoma na mRNA nivoju ne odražajo vedno kot spremenjena koncentracija proteinov (proteasoma in imunoproteasoma). Kot primer so se z izražanjem mRNA v PBMC in sintezo proteinov za podenote proteasoma in imunoproteasoma ukvarjali Krause in sodelavci (2006) (52). Ugotovili so, da je ekspresija na nivoju mRNA pri pacientih z lupusom v primerjavi s kontrolo nespremenjena, na proteinski ravni pa lahko pride do povečane ekspresije podenot $\beta 1i$ in $\beta 5i$ pri lupusu. Za razliko pa so Meiners in sodelavci (2003) pri preučevanju inhibitorjev proteasoma MG132 ter laktacistina ugotovili, da je povečana ekspresija na nivoju mRNA vodila tudi v povečano *de novo* biogenezo proteasoma (47). Pri proteasomu so zato predpostavljali obstoj povratne zanke, ki kompenzira zmanjšano aktivost proteasoma. Nivo mRNA tako ne korelira vedno s koncentracijo proteinov, vendar študije na mRNA nivoju predstavljajo dobro izhodišče za nadaljnjo preučevanje izražanja na ravni proteinov, ki je zahtevnejše.

5 SKLEP

Namen magistrskega dela je bil ovrednotiti izražanje genov za podenote proteasoma $\beta 1$, $\beta 2$ in $\beta 5$ in podenot imunoproteasoma $\beta 1i$, $\beta 2i$ in $\beta 5i$ v mišjem modelu lupusa v primerjavi s kontrolno skupino. Zanimal nas je vpliv treh izbranih selektivnih zaviralcev podenote imunoproteasoma $\beta 5i$ na izražanje genov za opazovane podenote v mišjih dendritičnih celicah po izpostavljenosti inhibitorjem *in vitro*. Preučili pa smo tudi razlike v izražanju genov izbranih podenot v različnih tipih mišjih imunskih celic v mišjem modelu lupusa in v kontrolni skupini. Naši hipotezi sta bili:

- Inkubacija dendritičnih celic s selektivnimi zaviralci podenote $\beta 5i$ vpliva na izražanje proteasomskih in imunoproteasomskih podenot na nivoju mRNA.
- Geni za podenote proteasoma in imunoproteasoma se na nivoju mRNA pri mišjem modelu lupusa različno izražajo v različnih tipih celic.

Znižanje ekspresije podenote $\beta 5i$ na nivoju mRNA po inkubaciji dendritičnih celic s selektivnima zaviralcema podenote $\beta 5i$ **37** in **75** je prisotno pri miših z lupusom in s trendom tudi pri kontrolni skupini. Hkrati opazimo trend kompenzacije ekspresije podenote $\beta 5$ pri inkubaciji s spojinama **37** in **75**, tako pri kontrolni skupini kot pri miših z lupusom, vendar je miš z lupusom zmožna manjše kompenzacije kot miš iz kontrolne skupine. Trend kompenzacije ekspresije je opazen tudi pri ekspresiji podenote $\beta 2$ v kontrolni skupini.

V drugem delu naloge smo z eksperimenti potrdili različen nivo izražanja genov za podenote proteasoma in imunoproteasoma pri mišjem modelu lupusa v preučevanih tipih celic. Izražanje genov za podenote proteasoma $\beta 1$, $\beta 2$ in $\beta 5$ je tako pri miših z lupusom kot pri kontrolni skupini najvišje v granulocitih izmed preučevanih tipov celic (limfociti T, limfociti B, monociti in granulociti). Pri lupusu je v granulocitih opazen trend nižjega izražanja v primerjavi s kontrolno skupino v vseh opazovanih podenotah proteasoma (s statistično značilno nižjim izražanjem podenote $\beta 2$ pri lupusu v primerjavi s kontrolo v granulocitih). Nasprotno pa smo v dendritičnih celicah opazili pri miših z lupusom višje izražanje genov za proteasomske podenote v primerjavi s kontrolno skupino (statistično značilno višje izražanje podenote $\beta 2$ pri lupusu v primerjavi s kontrolno skupino v dendritičnih celicah). Pri izražanju genov za podenote imunoproteasoma v različnih tipih celic (limfociti T, limfociti B, monociti in granulociti) ni bilo opaziti enotnega višjega

oziroma nižjega izražanja imunoproteasomskih podenot pri kontrolni skupini ali miših z lupusom.

Poudariti je potrebno, da odražajo rezultati te naloge izražanje genov za podenote na nivoju mRNA, kar ne odraža vedno tudi izražanja na nivoju proteinov. V nadaljnjih raziskavah bi bilo zato smiselno meriti tudi izražanje na ravni proteinov ali aktivnost proteasoma in imunoproteasoma. Tako bi lahko še podrobneje preučili razlike pri vpletenosti proteasoma in imunoproteasoma pri lupusu.

6 LITERATURA

1. Chernajovsky Y in Robbins P D [ured.]: Gene Therapy for Autoimmune and Inflammatory Diseases, Springer, Basel, 2010: 127-139.
2. Hughes G in Sangle S [ured.]: Clinician's Manual on Lupus, Springer, 2012: 5-14, 33-38, 46-52.
3. Huges D: The London Lupus Centre, Book of Lupus: A Patients' Guide, Springer, London, 2009: 1-2.
4. Wallance D J: Lupus - The Essential Clinician's Guide, Oxford University Press, New York, 2014: 5-22, 75-79.
5. Wallance D J in Hannahs H B [ured.]: DUBOIS' Lupus Erythematosus and Related Syndromes, 8. izdaja, Elsevier Saunders, Philadelphia, 2013: 1, 8-24, 46-56.
6. Roccatello D in Emmi L [ured.]: Connective Tissue Disease, Springer, Cham, 2016: 51, 214, 241.
7. Ramos P S et al.: Genetic Factors Predisposing to Systemic Lupus Erythematosus and Lupus Nephritis. *Seminars in Nephrology* 2010; 30(2): 164-176.
8. Smith C K in Kaplan M J: The role of neutrophils in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 2015; 27(5): 448-453.
9. Thomas D E: The Lupus Encyclopedia: A Comprehensive Guide for Patients and Families, Hohn Hopkins University Press, Baltimore, 2014: 42-50.
10. Munoz L E et al.: Apoptosis in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2008; 17(5): 371-375.
11. Ohl K in Tenbrock K: Inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus. *Biomed Res Int* 2011: doi:10.1155/2011/432595.
12. Horwitz D A: Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus: past, present and future. *Arthritis Res Ther* 2008; 10(6): 227.
13. Elkon K B in Stone V V: Type I interferon and systemic lupus erythematosus. *J Interferon Cytokine Res* 2011; 31(11): 803-812.

14. Pieterse E in Van der Vlag E: Breaking immunological tolerance in systemic lupus erythematosus. *Front Immunol* 2014; 5: doi: 10.3389/fimmu.2014.00164.
15. Lee S J et al.: The role of antimalarial agents in the treatment of SLE and lupus nephritis. *Nat Rev Nephrol* 2011; 7(12): 718-729.
16. Kim S S et al.: Belimumab in systemic lupus erythematosus: an update for clinicians. *Therapeutic Ther Adv Chronic Dis* 2012; 3(1): 11-23.
17. Celhar T in Fairhurst A-M: *Modelling Clinical Systemic Lupus Erythematosus: Similarities, Differences and Success Stories. Rheumatology (Oxford)* 2016; kew400.
18. Morel L et al.: Genetic reconstitution of systemic lupus erythematosus immunopathology with polycongenic murine strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(12): 6670-6675.
19. Morel L et al.: The major murine systemic lupus erythematosus susceptibility locus, Sle1, is a cluster of functionally related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 98(4): 1787-1792.
20. Perry D et al.: Murine Models of Systemic Lupus Erythematosus. *J Biomed Biotechnol* 2011: 271694.
21. Hwang S-H et al.: B cell TLR7 expression drives anti-RNA autoantibody production and exacerbates disease in systemic lupus erythematosus-prone mice. *J Immunol* 2012; 189(12): 5786-5796.
22. Dohmen J R in Scheffner M [ured.]: *Ubiquitin Family Modifiers and the Proteasome. Reviews and Protocols, Humana Press, New York, 2012: 318-328.*
23. Huber E M: *Structural and Functional Characterization of the Immunoproteasome, Springer, Cham, 2013: 2-8.*
24. Sorokin A V et al.: *Proteasome System of Protein Degradation and Processing. Biochemistry (Mosc)* 2009; 74(13): 1411-1442.
25. Miller Z et al.: Inhibitors of the Immunoproteasome: Current Status and Future Directions. *Curr Pharm Des* 2013; 19(22): 4140-4151.

26. Meiners S et al.: Regulation of the proteasome: evaluating the lung proteasome as a new therapeutic target. *Antioxid Redox Signal* 2014; 21(17): 2364-2382.
27. Verbrugge S E et al.: Proteasome inhibitors as experimental therapeutics of autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther* 2015; 17(1): 17.
28. Ebstein F et al.: Emerging roles of immunoproteasomes beyond MHC class I antigen processing. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69(15): 2543-2558.
29. Zubair A in Frieri M: NF- κ B and systemic lupus erythematosus: examining the link. *J Nephrol* 2013; 26(6): 953-959.
30. Oeckinghaus A et al.: Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat Immunol* 2011; 12(8): 695-708.
31. Zhou X et al.: Emerging View of Autophagy in Systemic Lupus Erythematosus. *Int Rev of Immunol* 2014; 34(3): 280-292.
32. Liu X et al.: The role of autophagy in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Int Immunopharmacol* 2016; 40: 351-361.
33. Levine B in Kroemer G: Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell* 2008; 132(1): 27-42.
34. Kisselev A F in Groettrop M: Subunit specific inhibitors of proteasomes and their potential for immunomodulation. *Curr Opin Chem Biol* 2014; 23: 16-22.
35. Ichikawa H T et al.: Novel Proteasome Inhibitors Have a Beneficial Effect in Murine Lupus via the dual inhibition of Type I Interferon and autoantibody secreting cells. *Arthritis Rheum* 2012; 64(2): 493-503.
36. Sosic I et al.: Nonpeptidic Selective Inhibitors of the Chymotrypsin-Like (β 5i) Subunit of the Immunoproteasome. *Angew Chem Int Ed Engl* 2016; 55(19): 5745-4748.
37. Huber E M in Groll M: Inhibitoren für das konstitutive Proteasom und das Immunoproteasom: aktuelle und zukünftige Tendenzen in der Medikamentenentwicklung. *Angewandte Aufsätze* 2012; 124(35): 8838-8850.
38. Desjardins P in Deborah C: NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *J Vis Exp* 2010; (45): 2565.

39. Hu P, Hedge M in Lennon P A [ured.]: Modern Clinical Molecular Techniques, Springer, New York, 2012: 49-51.
40. Pestana E A et al.: Early, Rapid and Sensitive Veterinary Molecular Diagnostics - Real Time PCR Applications, Springer, Dordrecht, 2010: 27-43, 260-261, 256-257.
41. LightCycler® 480 Instrumet, Operator's Manual, Software Version 1.5, Roche. http://icob.sinica.edu.tw/pubweb/bio-chem/Core%20Facilities/Data/R401-core/LightCycler480%20II_Manual_V1.5.pdf. Dostopano: 12.01.2017.
42. McPherson M J in Moller S G: PCR, Taylor & Francis Group, Abingdon, 2006: 9-11, 224-225.
43. Van Pelt-Verkuil E et al.: Principles and Technical Aspects of PCR Amplification, Springer, Dordrecht, 2008: 132-133, 146-148, 200-201.
44. Documentation for NormFinder, Version 20, MDL, Maj 2010. <https://moma.dk/files/Normfinder%20documentation-v20.pdf>. Dostopano: 12.01.2017.
45. D'haene B in Hellemans J: The Importance of Quality Control During qPCR Data Analysis, Int Drug Disc 2010: 18-24.
46. Lesemann K: Genexpression der katalytischen Untereinheiten des Proteasoms in unterschiedlichen Zellpopulationen des Immunsystems beim Sjögren-Syndrom, doktorsko delo, Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin 2010: dostopno na: http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_000000018069
47. Meiners S et al.: Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of Mammalian proteasomes. J Biol Chem 2003; 278(24): 21517-21525.
48. Kaplan M J: Neutrophils in the pathogenesis and manifestations of SLE. Nat Rev Rheumatol 2011; 7(12): 691-699.
49. Martinez-Gamboa L et al.: Gene expression of catalytic proteasome subunits and resistance toward proteasome inhibition of B lymphocytes from patients with primary Sjögren syndrome. Journal Rheumatol 2013; 40(5): 663-673.

50. Ghannam K et al.: Upregulation of immunoproteasome subunits in myositis indicates active inflammation with involvement of antigen presenting cells, CD8 T-cells and IFN γ . PLoS One 2014; 9(8): e104048.
51. Krause S: Proteasom-Expression bei Autoimmunerkrankungen, doktorsko delo, Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin 2008: dostopno na: http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_000000005646.
52. Krause S et al.: Immunoproteasome subunit LMP2 expression is deregulated in Sjögren's syndrome but not in other autoimmune disorders. Ann Rheum Dis 2006; 65(8): 1021-1027.