

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TANJA RAMOVŠ

**VREDNOTENJE IZRAŽANJA GENOV ZA KATALITIČNE
PODENOTE PROTEASOMOV V LIMFOBLASTOIDNIH
CELIČNIH LINIJAH**

**EVALUATION OF GENE EXPRESSION OF CATALYTIC
PROTEASOME SUBUNITS IN LYMPHOBLASTOID CELL
LINES**

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TANJA RAMOVŠ

**VREDNOTENJE IZRAŽANJA GENOV ZA KATALITIČNE
PODENOTE PROTEASOMOV V LIMFOBLASTOIDNIH
CELIČNIH LINIJAH**

**EVALUATION OF GENE EXPRESSION OF CATALYTIC
PROTEASOME SUBUNITS IN LYMPHOBLASTOID CELL
LINES**

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogu sem opravljala na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Martine Gobec, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Alenke Šmid, mag. farm.

Zahvala

Zahvaljujem se svoji mentorici, doc. dr. Martini Gobec, mag. farm., in somentorici asist. dr. Alenki Šmid, mag. farm., za vodenje pri raziskovalnem delu, strokovno pomoč in nasvete. Najlepše pa se zahvaljujem vsem svojim najbližnjim, ki so verjeli vame, me vzpodbujali in podpirali pri vseh letih študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogu samostojno izdelala pod vodstvom doc. dr. Martine Gobec, mag.farm, in somentorice asist. dr. Alenke Šmid, mag. farm.

Tanja Ramovš

Ljubljana, 2018

VSEBINA

VSEBINA	III
POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1. UVOD.....	1
1.1. UBIKVITIN PROTEASOMSKI SISTEM (UPS)	1
1.1.1. Sestava 26S proteasoma	2
1.2. IMUNOPROTEASOM	4
1.2.1. Struktura imunoproteasoma in katalitična aktivnost.....	4
1.3. VLOGA IMUNOPROTEASOMA PRI IMUNSKEM ODZIVU IN OSTALIH PATOLOŠKIH STANJIH.....	5
1.3.1. IFN- γ in ROS/RNS inducirajo nastanek imunoproteasoma.....	5
1.3.2. Vloga imunoproteasoma pri antigenski predstavitev ter virusnih infekcijah	6
1.3.3. Imunoproteasom in avtoimunske bolezni	8
1.3.4. Vloga imunoproteasoma pri malignih obolenjih.....	10
1.3.5. Imunoproteasom in nevrodegenerativne bolezni	11
1.4. METODE PREUČEVANJA FUNKCIJE IMUNOPROTEASOMA	12
1.5. ZAVIRALCI PROTEASOMSKE IN IMUNOPROTEASOMSKE AKTIVNOSTI	12
1.6. LIMFOBLASTOIDNE CELIČNE LINIJE (LCL)	15
2. NAMEN DELA	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1. MATERIALI.....	17
3.1.1. Kemikalije in reagenti	17
3.1.2. Raztopine.....	17

3.1.3. Kompleti.....	17
3.1.4. Encimi	18
3.1.5. Oligonukleotidni začetniki	18
3.1.6. CELIČNE LINIJE	19
3.2. METODE	20
3.2.1. Izolacija RNA.....	20
3.2.1.1. Tekočinska ekstrakcija RNA iz celičnih linij LCL	20
3.2.2. Določanje koncentracije in čistosti izolirane RNA.....	21
3.2.3. Reverzna transkripcija.....	21
3.2.4. Redčenje vzorcev in priprava standardov za umeritveno krivuljo.....	23
3.2.5. qPCR: verižna reakcija s polimerazo v realnem času	23
3.2.6. qPCR referenčnih genov in genov, ki kodirajo katalitične proteasomske in imunoproteasomske podenote	26
3.2.7. Encimska aktivnost	30
3.2.8. Statistična analiza.....	32
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	33
4.1. DOLOČITEV REFERENČNIH GENOV	33
4.2. ANALIZA IZRAŽANJA GENOV, KI KODIRAJO KATALITIČNE PODENOTE IMUNOPROTEASOMA IN PROTEASOMA	36
4.2.1. Krajne celične linije za posamezno podenoto	37
4.2.2. Opredelitev in razvrstitev celičnih linij LCL v skupine glede na skupne značilnosti	41
4.3. ANALIZA ENCIMSKE KIMOTRIPSINU PODOBNE AKTIVNOSTI PODENOT β 5 IN β 5i	46
5. SKLEP	50
6. LITERATURA	51

POVZETEK

Imunoproteasom je multikataltični encim, ki je vpet v mnoge znotrajcelične procese in je predvsem v hematopoetskih celicah nujno potreben za njihovo nemoteno delovanje in vzdrževanje proteinskega ravnovesja. V zadnji letih je proučevanje vloge imunoproteasoma privedlo do spoznanj o njegovi vpetosti v procese akutnega imunskega in vnetnega odziva ter posledični vlogi v patogenezi nekaterih obolenj. Povečano izražanje imunoproteasoma tako korelira z mnogimi avtoimunskimi in drugimi patološkimi stanji, zaradi česar so se raziskave usmerile v odkrivanje funkcionalnih zaviralcev imunoproteasomskih podenot, za njihovo vrednotenje pa je potrebno opredeliti ustrezne modele.

V magistrski nalogi smo 39 limfoblastoidnim celičnim linijam (LCL) preko tehnike qPCR določili nivo izražanja genov, ki kodirajo katalitične podenote proteasoma ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$) in imunoproteasoma ($\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$). Po začetni izolaciji njihove RNA je sledila reverzna transkripcija v cDNA in analiza izražanja tarčnih genov z uporabo qPCR. V prvem koraku smo določili najstreznejše referenčne gene, s katerimi smo normalizirali mRNA tarčnih genov in zatem pridobili podatke o izražanju gena za posamezno podenoto. Nadalje smo določili tri celične linije z najnižjim in najvišjim izražanjem gena za posamezno podenoto. Identificirane celične linije predstavljajo potencialni model za preučevanje specifičnih zaviralcev posameznih podenot. Zatem smo s pomočjo programa Orange izvedli analizo hierarhičnega razvrščanja celičnih linij v skupine glede na skupne značilnosti izražanja vseh preučevanih katalitičnih podenot. Celotno populacijo smo razvrstili v štiri skupine, ovrednotili njihove značilnosti in morebitno uporabnost pri nadaljnjih raziskavah začetnega presajanja oz. vrednotenja zaviralcev ter vlog posameznih imunoproteasomskih podenot. Zaradi kompleksnosti procesa prenosa bioloških informacij pa zgolj ustrezno izražanje določenega gena še ne zagotavlja izgradnje biološko aktivnega proteina. Zato smo v zaključni fazi na majhnem vzorcu celic, ki so najvišje in najnižje izražale gen za podenoto $\beta 5i$, izmerili aktivnost omenjene podenote z uporabo substrata Suc-LLVY-AMC. V večini primerov je povečana aktivnost sovpadala s povečanim izražanjem, kar nakazuje na ustreznost celičnih linij za vrednotenje zaviralcev podenote $\beta 5i$.

Ključne besede: proteasom, imunoproteasom, izražanje genov, limfoblastoidne celične linije

ABSTRACT

Immunoproteasome is a multicatalytic enzyme that is involved in many intracellular processes and is essential primarily in hematopoietic cells for their smooth functioning and for maintaining protein balance. In recent years, the study of the role of immunoproteasome has led to findings of its involvement in the processes of acute immune and inflammatory response and the consequent roles in the pathogenesis of certain diseases. Increased expression of immunoproteasome correlates with many autoimmune and other pathological conditions. This led to research focusing on the identification of inhibitors of functional immunoproteasomic subunits, however appropriate models are necessary for their evaluation.

We used 39 LCL cell lines to determine the expression level of genes coding for the catalytic subunits of proteasome ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$) and immunoproteasome ($\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$) via qPCR. After initial isolation of their RNA, reverse transcription into cDNA and analysis of target gene expression with qPCR was performed. In the first step, we determined the most appropriate reference genes for normalization of gene expression and then obtained data on the expression of each subunit. Furthermore, we determined three cell lines with the lowest and highest expression of each subunit. Identified cell lines represent a potential model for the study of specific inhibitors of individual subunits. Then, using the Orange program, we analyzed the hierarchical classification of cell lines into groups according to the common characteristics of the expression of all studied catalytic subunits. We classified the entire population into four groups, evaluated their characteristics and possible applicability in further studies (e.g. evaluation of inhibitors and the role of individual immunoproteasomal subunits). Due to the complexity of information transfer in biological processes, the proper expression of a particular gene by itself does not ensure the construction of a biologically active protein. Therefore, in the final phase of the thesis, we determined the activity of the subunit $\beta 5i$ with the use of specific substrates on cells that showed the highest and lowest expression of gene coding for $\beta 5i$. In most cases, increased activity coincided with increased expression, indicating the suitability of cell lines for the evaluation of subunit $\beta 5i$ inhibitors.

Key words: proteasome, immunoproteasome, gene expression, lymphoblastoid cell lines

SEZNAM OKRAJŠAV

Ac-ANW-AMC	<i>N</i> -acil-alanin-asparagin-triptofan-7-amino-4-metilkumarin
ALS	amiotrofična lateralna skleroza
ATP	adenozin-5'-trifosfat
cDNA	komplementarna DNA
CŽS	centralni živčni sistem
DNA	deoksiribonukleinska kislina
E1	ubukvitin-aktivirajoči encim
E2	ubikvitin-konjugirajoči encim
E3	ubikvitin ligaza
FDA	zvezni urad za živila in zdravila
IFN- γ	interferon γ
IRF-1	interferon regulatorni faktor
LCL	limfoblastoidne celične linije
LMP2/-7	nizkomolekularni peptid 2/-7, <i>ang. low molecular mass polypeptide 2/-7</i>
MECL-1	multikatalizni endopeptidazni kompleks podenota 1, <i>ang. multicatalytic endopeptidase complex subunit 1</i>
MM	multipli mielom
MHC I/II	poglavitni histokompatibilnostni kompleks razreda I/II
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina
NF- κ B	jedrni faktor κ lahke verige aktiviranih celic B
qPCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času
RNA	ribonukleinska kislina
RNS	reaktivne dušikove zvrsti
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
Suc-LLVY-AMC	<i>N</i> -sukcinil-levcin-levcin-valin-tirozin-7-amino-4-metilkumarin
Th1	celica T pomagalka tipa 1
TNF- α	tumor nekrotizirajoči faktor α
UPS	ubikvitin-proteinski sistem

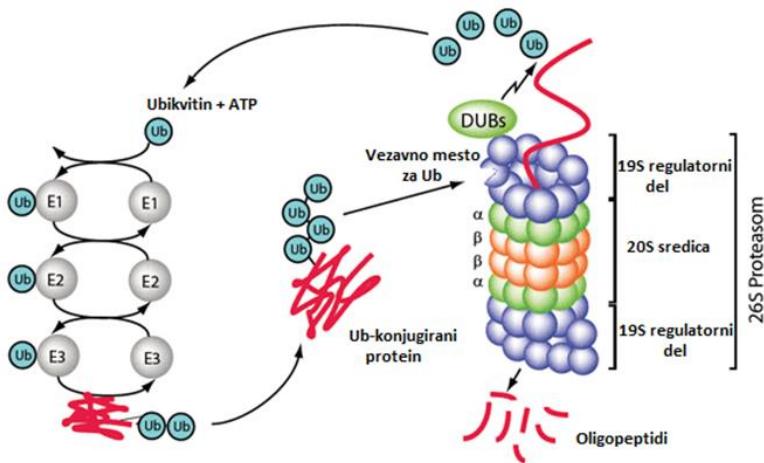
1. UVOD

1.1. UBIKVITIN PROTEASOMSKI SISTEM (UPS)

Proteini so največji makromolekulski celični elementi. Značilna sestava in zaporedje aminokislin, ki je zapisano v genih, omogočata vsakemu proteinu, da se zvije v natančno tridimenzionalno strukturo, ki jo potrebuje za svojo določeno biokemijsko vlogo. V organizmih je ključnega pomena, da je delovanje proteinov nadzorovano in uravnano. Eden izmed najpomembnejših sistemov, ki omogoča proteinsko homeostazo, je ubikvitin proteasomski sistem (UPS) (1, 2).

UPS predstavlja glavno pot razgradnje za 80-90 % regulatornih proteinov in sodeluje pri regulaciji mnogih celičnih procesov (3, 4, 5). V UPS razgradnja proteinov poteka v 26S proteasomu, ki je multikatalitični proteazni kompleks. Substrati za 26S proteasom so proteini, ki imajo pripeto ubikvitinsko verigo (2, 6).

Klasična (tako imenovana kanonična) ubikvitinacija tarčnega proteina poteka preko encimske kaskade, pri čemer reakcijo katalizirajo trije encimi: E1, E2 in E3. Encim E1 s pomočjo ATP katalizira nastanek tiolnega estra s C-terminalno karboksilno skupino glicina ubikvitina. Aktivirani ubikvitin se nato prenese z E1 na cisteinski ostanek encima E2 (ubikvitin-konjugirajoči encim). Zadnji korak izvrši ubikvitin ligaza E3, ki katalizira ligacijo oz. nastanek izopeptidne vezi med aktiviranim C-terminalnim glicinom ubikvitina in lizinom tarčnega proteina (7, 8). Na protein je lahko vezana ena ali več molekul ubikvitina. Veriga, ki lahko vsebuje različno število ubikvitinov, se tvori preko vezave sedmih notranjih lizinskih ostankov ubikvitina (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63), nato pa sledi vezava z lizinskim ostankom proteina (slika 1) (9, 2, 4).



Slika 1: Prikaz konjugacije proteina z ubikvitinom (Ub) in njegove razgradnje v 26S proteasomu (prirejeno po 59)

1.1.1. Sestava 26S proteasoma

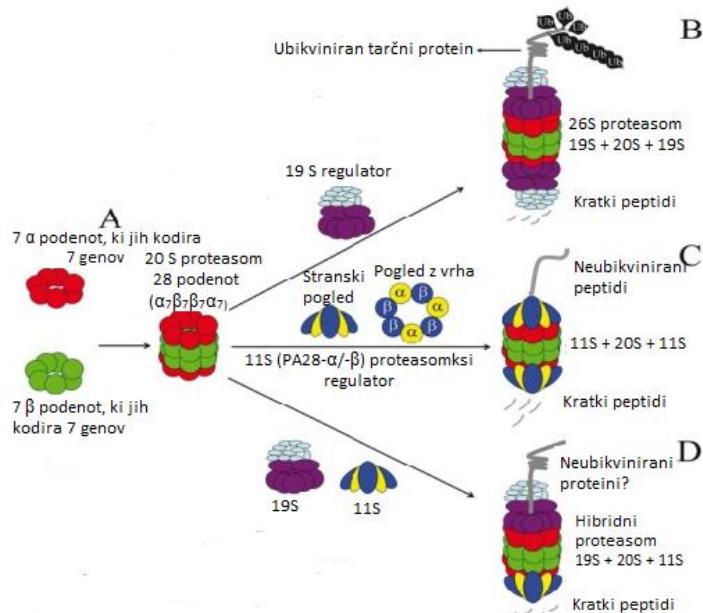
Proteasomi so večkatalitični encimi, ki jih lahko razdelimo v več podtipov. Tisti, ki se stalno izražajo v vseh tipih celic in so pomembni za njihovo delovanje, so klasični ali konstitutivni proteasomi. Odgovorni so za razgradnjo večina znotrajceličnih proteinov in tako uravnavajo njihovo ravnotežje. Njihova vloga pri metabolizmu proteinov tako vpliva na številne celične procese, kar zajema nadziranje celičnega cikla, celični stresni odziv, vnetni odziv, znotrajcelično signaliziranje, apoptozi celic in produkcijo antigenov za predstavitev na poglavitnem histokompatibilnostnem kompleksu razreda I (MHC I). Z regulacijo proteasomske aktivnosti je tako mogoče posegati v aktivnost regulatornih proteinov, zato se v zadnjem času pojavlja težnja po preizkušanju učinkovin za uravnavanje njihove aktivnosti (10, 2).

26S proteasom predstavlja proteolitično komponento UPS sistema in se v celicah lahko nahaja v različnih oblikah. Sestavljen je iz dveh kompleksov: 20S proteasoma, ki predstavlja sredico, in iz regulatornih kompleksov, ki nadzorujejo dostop do katalitične notranjosti. 20S proteasom sestavlja 28 proteinskih podenot, ki so umeščene v 4 obroča: dva zunanjega α - in dva notranja β -obroča (10). Vsak α - in β -obroč vsebuje sedem različnih podenot (slika 2A) (4, 11).

Zunanja α -obroča interagirata z regulatornimi kompleksi, kot so npr. proteasomski zaviralec PI31 (zavira nastanek imunoproteasoma), aktivator PA28 (11S) in regulator PA700 (19S). Ti kompleksi uravnavajo proteolitično aktivnost proteasoma in sodelujejo pri vezavi,

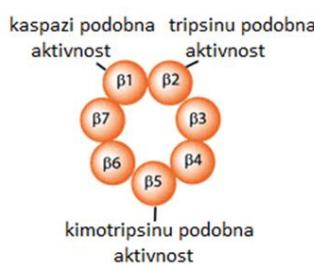
prepoznavi in razvijanju substratov, ne posedujejo pa katalitične aktivnosti (12). Npr. regulatorni kompleks PA700 po vezavi na oba konca sredice 20S in v prisotnosti ATP deubikvitinira in razvije proteinske substrate ter povzroči konformacijsko spremembo sredice 20S, kar omogoči vstop substratom v katalitično sredico, kateri sledi razgradnja (8).

Regulatorni kompleksi (19S in 11S) se lahko združijo z 20S ne glede na vrsto vsebujočih katalitičnih enot. To omogoča nastanek različnih kombinacij proteasomov in imunoproteasomov (slika 2) (13).



Slika 2: Organizacija in izgradnja proteasoma (prirejeno po 14)

Tri podenote β imajo katalitično aktivne N-terminalne nukleofilne treoninske ostanke (encimsko aktivnost), ki hidrolizirajo peptidne vezi (15). Konstitutivni proteasom vsebuje podenote $\beta 1$ (Y , kodira jo gen *PSMB6*), $\beta 2$ (Z , kodira jo gen *PSMB7*) in $\beta 5$ (X , kodira jo gen *PSMB5*), ki sodelujejo pri cepitvi peptidih vezi za kislimi (kaspazi-podobna aktivnost), bazičnimi (tripsinu-podobna aktivnost) in hidrofobnimi aminokislinskimi ostanki (kimotripsinu-podobna aktivnost) (slika 3) (3, 16). Aktivne strani proteina se nahajajo v lumnu sredice, s čimer je preprečena neželena hidroliza citosolnih proteinov (13).



Slika 3: Prikaz katalitičnih podenot (prirejeno po 59)

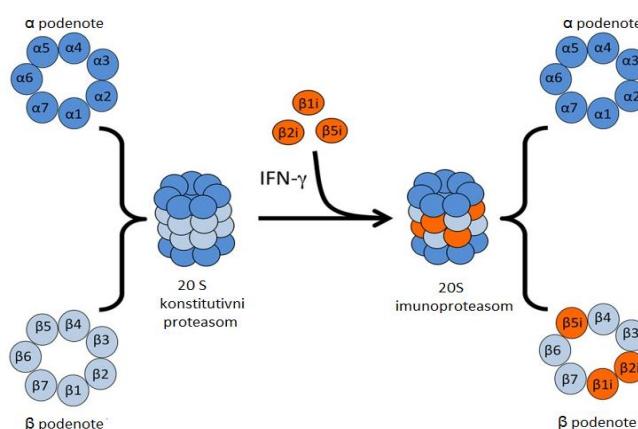
1.2. IMUNOPROTEASOM

Imunoproteasom je oblika proteasoma, ki se v nasprotju s konstitutivnim proteasomom izraža pretežno v celicah hematopoetskega izvora (npr. antigen predstavitevne celice, dendritične celice, monociti, ipd.). Izkazuje alternativno proteazno aktivnost in preferira druga cepitvena mesta kot proteasom (17). Njegovo povišano izražanje lahko sprožijo razni dejavniki (npr. vnetni citokini (IFN- γ , TNF- α) ali oksidativni stres), zato mu pravimo tudi inducibilni proteasom. V tem primeru se nivo poveča v limfocitih B in T, antigen predstavitevnih celicah in drugih vrstah celic, kjer je pristno vnetje, kar nakazuje na njegovo udeleženost pri akutnem imunskejem ali vnetnem odzivu (1, 8, 18, 19).

Prisotnost imunoproteasoma so odkrili tudi v neimunskih celicah tekom vnetja ali neoplastične transformacije, s čimer se odstira tudi njegova vpletjenost pri patogenezi avtoimunskih obolenj in neoplazem (20).

1.2.1. Struktura imunoproteasoma in katalitična aktivnost

Imunoproteasom se oblikuje tako, da se konstitutivne katalitične podenote proteasoma $\beta 1$, $\beta 2$ in $\beta 5$ zaradi izpostavitve določenim dejavnikom (npr. TNF- γ) zamenjajo z t.i. inducibilnimi imunoproteasom-specifičnimi podenotami $\beta 1i$ (znana tudi kot *LMP2* – nizkomolekularni peptid 2, *PSMB9*), $\beta 2i$ (*MECL-1* – multikatalitični endopeptidazni kompleks podenota 1, *PSMB10*) in $\beta 5i$ (*LMP7* – nizkomolekularni peptid 7, *PSMB8*) (slika 4) (3).



Slika 4: Prikaz nastanka imunoproteasoma (prirejeno po 13)

V primeru celic, kjer se izražata oba tipa katalitičnih podenot, to je v celicah imunskega sistema in celicah, ki so izpostavljeni IFN- γ , se vgradnja podenote $\beta 1i$ v imunoproteasomu

vrši hitreje kot vgradnja β 1 pri proteasomu (15). Prisotnost β 1i nato inducira vgradnjo β 2i, ki torej poteka soodvisno. Kot zadnja se vgradi katalitična podenota β 5i (12, 21).

Izpostavitev celic citokinom aktivira še vrsto drugih mehanizmov, ki prispevajo k prednostni produkciji imunoproteasomskih podenot in imunoproteasoma. Med drugim se poveča sinteza alternativnega regulatornega kompleksa, aktivatorja PA28 (8, 13, 21).

Kompleks naj bi povečal sposobnost razgradnje kratkih peptidnih substratov v sredici 20S, ki naj bi imeli vlogo pri stimulaciji celičnega odziva CD8 $^{+}$ T. Verjetno je, da kompleks s PA28 privede do povečane razgradnje oksidiranih proteinov in preprečuje pretiran citotoksični odziv proti lastnim antigenom, s čimer zmanjša možnost nastanka avtoimunskeih reakcij (13, 22).

Vgradnja imunoproteasomskih katalitičnih podenot β vpliva na cepitvene lastnosti tega multikataltičnega encima, saj se povišata kimotripsinu in tripsinu podobni aktivnosti, medtem ko se kaspazi podobna aktivnost zniža (8). Posledično je imunoproteasom sposoben hitrejše cepitve za hidrofobnimi in bazičnimi aminokislinskimi ostanki, a počasnejše za kislimi aminokislinskimi ostanki (23).

1.3. VLOGA IMUNOPROTEASOMA PRI IMUNSKEM ODZIVU IN OSTALIH PATOLOŠKIH STANJIH

1.3.1. IFN- γ in ROS/RNS inducirajo nastanek imunoproteasoma

IFN- γ predstavlja enega najbolj raziskanih faktorjev, ki vplivajo na povečano izgradnjo imunoproteasoma. Temu proteinu pripisujejo protivirusne učinke, antiproliferacijsko in protivnetno delovanje. Poleg takojšnjega zaviranja virusne replikacije je pomembna predvsem njegova imunomodulatorna vloga (24). V okviru takojšnjega imunskega odziva naravne celice T ubijalke pričnejo izločati IFN- γ , po razvoju antigen-specifične imunosti pa temu sledijo še CD4 $^{+}$ celice pomagalke tipa 1 (Th1) in CD8 $^{+}$ citotoksični limfociti T (25). Po izpostavitvi celic IFN- γ se 20S proteasom struktorno reorganizira in prednostno se vrši izgradnja imunoproteasoma tako v imunskih kot v neimunski celicah (26). To posredno prispeva tudi k večji vezavi peptidov in predstavljivi na tarčnih celicah zaradi povečane aktivnost kompleksa MHC razreda I in k okrepitevi imunskega odziva, povzročenega s strani citotoksičnih limfocitov T (24).

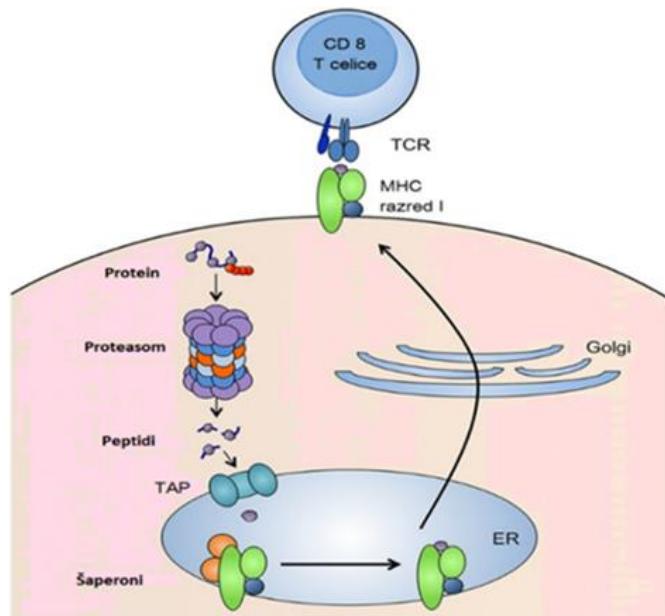
Sočasno se v primeru vnetnih procesov (miopatije, kardiovaskularna vnetja, itd.) oz. v primeru takojšnjega imunskega odziva med virusno infekcijo povečajo koncentracije

reaktivnih kisikovih (ROS) in dušikovih (RNS) zvrsti v imunskih celicah. Njihove visoke koncentracije v celicah lahko povzročijo oksidativni stres, kjer se tvorijo radikali (27). Slednje lahko vodi v povečanje nerazvitih ali oksidativno poškodovanih poliubikvitinskih proteinov. Nefunkcionalne proteine je potrebno hitro odstraniti iz telesa, zato preko aktivacije različnih mehanizmov, ki povečajo sintezo imunoproteasomov, poteče njihova razgradnja (17). V teh celicah/tkivih je torej vloga imunoproteasoma predvsem zagotavljanje celične integritete z učinkovitim odstranjevanjem nastajajočih oksidativno poškodovanih in nerazvitih poliubikvitinskih proteinov ter preprečevanje nalaganja toksičnih proteinskih agregatov, zaradi katerih so celice bolj dovetne za apoptozo (27).

1.3.2. Vloga imunoproteasoma pri antigenski predstavitevi ter virusnih infekcijah

Limfociti T so sestavni del imunskega sistema. Njihova vloga je prepoznati antigene, ki so izpostavljeni na celični površini in so predstavljeni s pomočjo produktov MHC.

MHC I neprestano veže peptide, nastale s proteolizo citosolnih proteinov, in jih predstavlja na celični površini, kar CD8+ T celicam omogoča detekcijo in uničenje nenormalnih celic, ki sintetizirajo virusne ali druge tuje proteine (slika 5) (22).



Slika 5: Antigen predstavitevna pot MHC razreda I (prirejeno po 13). Nastali peptidi se s pomočjo transporterja za antigensko predstavitev (TAP) prenesejo v endoplazmatski retikulum (ER), kjer se naložijo na MHC razreda I molekulo. Kompleks se nato prenese na celično površino, kjer T celični receptor (TCR) prepozna in veže antigen.

Za nemoteno predstavitev antigenov preko MHC I je potrebna konstitutivna znotrajcelična proteolitična pot. Večina peptidov, ki so predstavljeni na MHC I, izvira iz nefunkcionalnih citoplazemskih ribosomalnih produktov, ki predstavljajo 30% na novo sintetiziranih proteinov in so poglaviti vir telesu lastnih in tujih peptidov. Poškodovani ribosomalni produkti se preko proteasomske odvisne proteolize takoj pretvorijo v antigenske peptide, ki so na voljo za predstavitev na MHC I (13, 28, 29).

Čeprav je poglavita funkcija MHC I predstavitev znotrajceličnih proteinov citotoksičnim celicam T, lahko predstavljajo tudi peptide, nastale iz eksogenih proteinov. V primeru, ko se organizem ne bori z okužbami in so na celičnih površinah predstavljeni peptidi, ki so nastali iz normalnega procesa proteasomske proteinske razgradnje, citotoksične celice T sicer prepoznačajo peptide, vendar se ne aktivirajo. Nasprotno pa, ko celice izražajo tuje proteine (npr. v primeru virusne infekcije), se na njihovi površini preko MHC I izpostavijo peptidi, ki inducirajo aktivacijo citotoksičnih celic T (28, 29).

Med virusno infekcijo in izpostavitvijo IFN- γ ali TNF- α sledi skoraj takojšnja zamenjava proteasomov z imunoproteasomi na periferiji, s čimer se poveča njihova znotrajcelična koncentracija. To privede do omejene tvorbe peptidov iz telesu lastnih proteinov, saj je zaradi potrebe organizma po takojšnji prepoznavi in eliminaciji patogenov iz organizma proteasomsko-odvisna proteoliza prednostno in v večjem obsegu namenjena predelavi novo sintetiziranih peptidov. Imunoproteasom sicer razgrajuje proteine v enakem obsegu kot konstitutivni proteasom, vendar proizvede več antigenskih peptidov za MHC I in izboljša tako njihovo kvaliteto kot kvantitet (28, 30). Tako predstavljeni peptidi omogočijo aktivacijo citotoksičnih celic T in s tem zagotovijo učinkovit imunski odziv proti celicam, ki sintetizirajo virusne ali druge tuje proteine (28, 31, 32).

Imunoproteasom in njegovi intermediati lahko povzročijo aktivacijo celic T neodvisno od MHC I antigenske predstavitevne poti, saj prispevajo k njihovemu nastanku in dozorevanju, nakazuje pa se tudi njegov vpliv pri razširitvi in vzdrževanju T celične populacije tekom imunskega odziva. To so potrdili izsledki več raziskav, kjer so preučevali vpliv katalitičnih podenot pri generiranju epitopov v primeru okužb s citomegalovirusom (β 5i), virusom hepatitisa B (β 1i in β 5i) in virusom gripe (β 1i) (13).

Prisotnost imunoproteasoma v tkivih/celicah, ki niso posledica imunskega odziva, nakazuje tudi na njegovo neimunsko vlogo, ki ni povezana z antigensko predstavitevijo. Vse vloge imunoproteasoma še niso znane, se pa z nadaljnji raziskavami počasi odstira njegova vpletene v vse več patogenih mehanizmov.

1.3.3. Imunoproteasom in avtoimunske bolezni

V zadnjih letih je več raziskav potrdilo, da ima imunoproteasom vlogo pri patogenezi avtoimunskih bolezni, modulaciji diferenciacije T celic pomagalk in proizvodnji vnetnih citokinov. Selektivno zaviranje podenote β 5i je pokazalo izboljšanje stanja v mišjih modelih, ki so imeli inducirani revmatoidni artritis, multiplo sklerozu, sistemski lupus erimatozus, vnetno črevesno bolezen in Hashimotov tiroiditis. Omenjene bolezni imajo visoko incidenco, zaradi neželenih učinkov obstoječih zdravil ali pomanjkanja ustreznih terapevtikov pa se pojavlja težnja po novih terapevtskih pristopih.

Vse raziskave omenjenih bolezni so potekale na mišjih modelih, preučevali pa so vpliv imunoproteasomske podenote β 5i, ki je trenutno tudi najbolj okarakterizirana imunoproteasomska podenota. Bortezomib, ki je prvi klinično preizkušen, nespecifični proteasomski zaviralec, je bil učinkovit pri zdravljenju teh bolezni, vendar je njegova uporaba pokazala določene pomanjkljivosti. Pri terapiji so se soočali s pojavom rezistence in neželenih učinkov, ki naj bi bili posledica njegovega nespecifičnega delovanja, poleg tega so bili potrebni visoki odmerki za učinkovito delovanje.

Podenoto β 5i so inhibirali s specifičnim zavircem ONX 0914. V primeru revmatoidnega artritisa je njegova uporaba zmanjšala progresijo bolezni v odvisnosti od prejetega odmerka. Po aplikaciji zdravila so opazili hiter protivnetni odziv, zmanjšala pa se je tudi vnetna infiltracija in posledično erozija kosti. *In vitro* ONX 0914 zniža izločanje TNF- α in IL-23, kar vodi v omejeno delovanje celic T in monocitov (33).

Pri vnetnih črevesnih bolezni (Chronova bolezen, ulcerativni kolitis) predvidevajo, da so vnetni procesi posledica nenormalnega imunskega odziva na antigene, ki izvirajo iz črevesne flore. To prispeva k povečani aktivaciji makrofagov in celic T ter tvorbi citokinov, kar lahko vodi v povišano indukcijo vseh katalitičnih podenot imunoproteasoma zaradi izpostavitve IFN- γ ali TNF- α . Specifično zaviranje podenote β 5i je močno zmanjšalo simptome inducirane kolitise v miših in nastanek vnetnih citokinov, to pa je prispevalo k zmanjšanju vnetja in znižanju poškodb v tkivih. Kljub visokemu bazальнemu izražanju gena za podenoto β 5i v tkivu zdravega kolona, specifično zaviranje podenote predstavlja učinkovit terapevtski pristop pri zdravljenju kolitisa (33, 34).

Hashimotov tiroiditis je avtoimunska bolezen ščitnice, pri kateri igra pomembno vlogo MHC I/II in njuna antigenska predstavitev CD8+ T celicam. Specifično zaviranje podenote β 5i je pokazalo izboljšanje ščitnične funkcije in zmanjšanje produkcije IFN- γ in IL-17, kar nakazuje na inhibicijo diferenciacije celic Th1 in Th17 (33, 35).

Sistemski lupus eritematozus je kronična avtoimunska bolezen vezivnega tkiva, pri katerem je opaziti povečan nastanek IFN- α in protiteles. Plazmatke povečano proizvajajo protitelesa, zato so posebej občutljive na zaviranje proteasoma. Pristop zaviranja imunoproteasomske podenote β 5i ima potencial, saj so raziskave potrdile zmanjšanje napredovanja bolezni, izboljšanje nefritisa, zmanjšala pa se je tudi serumska koncentracija IgG protiteles in tvorba IFN- α (33).

Imunoproteasom se nakazuje kot potencialna terapevtska tarča tudi pri eksperimentalnem avtoimunskejem encefalitisu (EAE), ki je pravzaprav živalski model multiple skleroze. Selektivno zaviranje podenote β 5i je zmanjšalo napredovanje bolezni, zavrta pa je bila tudi infiltracija imunskih celic v možgane in hrbtenjačo. S tem se je zmanjšalo vnetje in tvorba številnih citokinov, ki jih proizvajajo avtoreaktivne celice T, zmanjšala pa se je tudi začetna diferenciacija CD4+ celic Th1 in Th17. V primeru aplikacije zaviralca na dan, ko so se pojavili prvi simptomi, se je preprečil začetek bolezni, medtem ko je aplikacija zaviralca po prvem valu simptomov zmanjšala ponovitev zagonov (34, 36).

Posamezne podenote imunoproteasoma se nakazujejo kot potencialne terapevtske tarče tudi pri preprečevanju kroničnih avtoimunskih reakcij po transplantaciji, ki vodijo k zavnitvi organa. V primeru presaditve ledvic imunosupresivi sicer učinkovito inhibirajo akutno zavnitev, vendar na trgu primanjkuje zdravil, ki bi preprečevali kronično zavnitev in tako prispevali k daljši življenjski dobi pacientov. Neselektivni zaviralci proteasomov so pripomogli k zmanjšanju zavnitve, vendar so obenem izkazovali veliko resnih neželenih učinkov, kar je vplivalo na omejitev njihove uporabe. Nasprotno pa uporaba selektivnih zaviralcev imunoproteasoma na predkliničnih modelih za preučevanje avtoimunskih bolezni ni pokazala očitnega pojava neželenih učinkov. Aplikacija ONX 0914 na podganje modele je pripomogla k zmanjšanju imunskega odziva, ki povzroči kronično nefropatijo in posledično zavnitev presajene ledvice. Zdravilo je povzročilo zaviranje imunoproteasomske aktivnosti tako v imunskih organih kot v ledvicah. Zmanjšalo se je število celic B, plazmatk in donorsko-specifičnih protiteles, poleg tega se je v ledvicah zmanjšala infiltracija celic T, B, makrofagov, IFN- γ , IL-17 in IgG. Posledično se je izboljšala ledvična funkcija in znižal obseg kronične nefropatije, kar je podaljšalo življenjsko dobo živalskih modelov (18).

Ta dognanja nakazujejo na patološko vlogo podenote β 5i pri razvoju naštetih obolenj in jo zaradi dejstva, da se v teh primerih povečano izraža, opredeljujejo kot potencialno terapevtsko tarčo, katere inhibicija bi pripomogla k zmanjšanju bolezenskih procesov (37).

1.3.4. Vloga imunoproteasoma pri malignih obolenjih

V primerjavi z nemalignimi celicami imajo rakave celice višjo proteasomsko aktivnost zaradi hitrejše celične proliferacije, oksidativnega stresa in povečane izpostavljenosti citokinom. Razvoj raka je večfaktorski proces, ki zaobjema mnoge genetske spremembe, kot so aktivacija onkogenov in inaktivacija tumor supresorskih genov, disregulacija celičnega cikla in apoptoze ter modifikacija imunskega odziva. Zaradi pomembne vloge proteasoma pri nadzoru mnogih od zgoraj opisanih bioloških in metaboličnih procesov (npr. proteasom je vključen pri odstranjevanju mnogih proto-onkoproteinov, ki inducirajo maligno transformacijo) ter njegove tvorbe epitopov, katerih predstavitev preko kompleksa MHC I aktivira CD8+ citotoksične celice T, je ta proteaza postala atraktivna terapevtska tarča pri zdravljenju malignih obolenj. Mnoge tumorske celice zaradi hitre proliferacije v večjem obsegu akumulirajo nefunkcionalne proteine, zato so bolj odvisne od učinkovite proteasomske aktivnosti. Zmanjšanje te aktivnosti zavre celično rast in povzroči smrt celic zaradi aktivacije apoptotičnih procesov. Poleg tega zaviranje proteasomske aktivnosti povzroči inaktivacijo NF-κB poti, ki je vpletena v vzdrževanje rezistence zdravila v rakovih celicah (37, 38). Medtem ko je proteasomska aktivnost načeloma višje izražena pri vseh vrstah raka, je nivo imunoproteasoma odvisen od tipa malignega obolenja in variira glede na vrsto tumorja. Pri npr. kožnem, ledvičnem raku in raku požiralnika je nižji, nasprotno pa se v rakavem tkivu prostate, kolona, multiplega mieloma in pljuč izraža povišano (3, 8, 39). V slednjih primerih selektivno zaviranje imunoproteasomske katalitične podenote lahko poveča učinkovitost zdravljenja in zmanjša neželene stranske učinke, ki se pojavijo pri terapiji z nespecifičnimi zaviralci. V tem primeru imunoproteasom povezujejo s patološkim procesom, torej z njegovim zaviranjem je možno doseči bolj ciljano terapijo in posledično zmanjšanje sistemsko toksičnosti (37).

Največ raziskav, kjer so vrednotili učinkovitosti specifičnih zaviralcev, je potekalo v povezavi z zaviranjem podenote β 5i, ki ima vlogo tudi pri nastanku multiplega mieloma (MM). MM je neoplastična motnja plazmatk. Terapija vključuje kombinacijo imunomodulatornih zdravil in proteasomskih zaviralcev, ki povzročijo motnje signalnih poti. Zaviranje proteasomske aktivnosti stimulira apoptotične poti zaradi indukcije stresnega odziva endoplazmatskega retikuluma in zaviranja poti NF-κB, ki zmanjšajo produkcijo angiogeneznih faktorjev. Zaradi neželenih učinkov nespecifičnih zaviralcev (bortezomib, karfilzomib in salinosporamid A) in povišanega izražanja imunoproteasoma v MM, se je razvoj usmeril v specifične zaviralce, ki so večinoma še v fazi preučevanja na živalskih

modelih. Inhibicija podenote β 5i je zavrla rast in povzročila apoptoza v MM celičnih linijah ne da bi vplivalo na zdrave celice periferne krvi (37, 38).

Podenota β 5i se povišano izraža tudi v nekaterih vrstah trdnih tumorjev. Višji nivo so opazili v celičnih linijah raka prostate (PC-3 celice) in ugotovili, da podenota vpliva na rastne značilnosti PC-3 celic. Terapija *in vitro* s specifičnim zaviralcem podenote β 5i UK-101 je pokazala povečanje akumulacije poliubikvitinskih proteinov, ki povzročijo motnje celične proteinske homeostaze in zavrejo rast PC-3 celic oz. apoptozo, ki je neodvisna od zaviranja NF- κ B poti. Te izsledke so potrdili tudi na mišjem modelu, kjer so ugotovili, da selektivno zaviranje podenote β 5i z UK-101 povzroči upad tumorske rasti prostate zaradi povečanega obsega apoptoze (39).

1.3.5. Imunoproteasom in nevrodegenerativne bolezni

Vse nevrodegenerativne bolezni zaznamuje ireverzibilna progresivna izguba strukture ali funkcije nevronov, ki posledično privede do smrti nevrona. Več skupnih dejavnikov povezuje različne nevrodegenerativne motnje med sabo, med drugimi tudi inducirana celična smrt in atipična sestava proteinov oz. njihova patološka akumulacija, ki je posledica neravnovesja med proteinsko sintezo in proteolizo. Vzrok tovrstnega neravnovesja bi lahko bilo tudi večja prisotnost imunoproteasoma, ki sicer v normalnih pogojih ni prisoten v centralnem živčnem sistemu, se pa izraža v določenih patoloških stanjih. Povišano se lahko izraža zaradi delovanja vnetnih citokinov ali genetske predispozicije. Npr. polimorfizem na kodonu 60 pri genu, ki kodira podenoto β 1i, vpliva na doveznost celic za apoptozo v prisotnosti TNF- α . Višji nivo podenot β 1i in β 2i so nadalje opazili v možganskem tkivu miši z Huntingtovo in Alzheimerjevo boleznijo, prav tako so prisotnost imunoproteasomskih podenot opazili v nevronih pacientov z ALS (8, 3). Eden izmed dejavnikov tveganja povečanega izražanja imunoproteasomskih podenot je tudi staranje, kar je v zadnjem času aktualno predvsem zaradi daljšanja življenske dobe. S starostjo organizma se poveča možnost nevrovnetja, s čimer se zmanjša aktivnost podenote β 1. ROS povzročijo povečano oksidacijo proteinov v možganih, kar privede do spremembe proteasomske kompozicije in aktivnosti v CŽS ter večjega izražanja imunoproteasoma (11).

1.4. METODE PREUČEVANJA FUNKCIJE IMUNOPROTEASOMA

Še do nedavnega je glavna metoda preučevanja funkcije imunoproteasoma temeljila na preučevanju živalskih modelov z izbitimi geni (»knock-out« modeli). Žal pa je sistem izkazoval določene pomanjkljivosti. Podenote imunoproteasoma se vgrajujejo po principu kooperativnosti, zato pomanjkanje ene podenote lahko vpliva na strukturo in izgradnjo 20S sredice ter vezavo in aktivnost regulatornih podenot. Poleg tega miši, ki jih uporabljajo za namene preučevanja imunoproteasomske aktivnosti in ki že od rojstva nimajo izraženih vseh imunoproteasomskih podenot, lahko razvijejo kompenzatorne mehanizme v pomoč pri izgradnji proteasomov in imunoproteasomov. To lahko vodi v spremenjeno kompozicijo podenot, ki se odraža v spremenjeni aktivnosti procesiranja peptidov. Večino raziskav so opravili na miših s pomanjkanjem ene ali dveh imunoproteasomskih podenot in ne vseh treh. V tem primeru obstaja možnost nadomestitve proteasomske podenote in kompenzacije pomanjkanja imunoproteasomskih podenot. V izogib zgoraj opisanim dogodkom se v zadnjem času veliko raziskav usmerja v identifikacijo in sintezo majhnih molekul s specifičnim imunoproteasomskim zaviralnim delovanjem, ki bi glede na dejstvo, da so višji nivo imunoproteasoma opazili pri določenih bolezenskih stanjih (rakava obolenja, vnetne črevesne bolezni, nevrodegenerativne bolezni), lahko predstavljale tudi učinkovit terapevtski potencial. Uporaba majhnih molekul z zaviralnim delovanjem prinaša mnogo prednosti pred tradicionalnim pristopom, povezanim z izbitjem genov. Ena glavnih vrednosti je predvsem njihova potencialna uporaba v terapevtske namene, težje pa tudi vplivajo na izgradnjo in strukturo imunoproteasoma, saj le ta poteka neodvisno od zaviranja aktivnosti (39, 13).

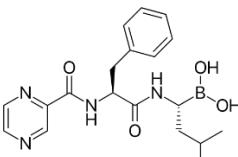
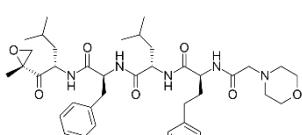
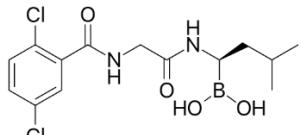
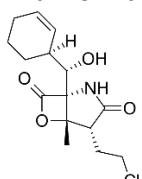
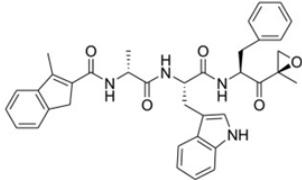
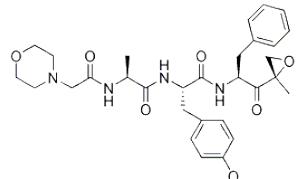
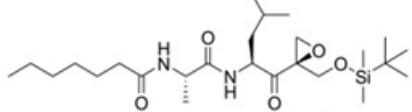
1.5. ZAVIRALCI PROTEASOMSKE IN IMUNOPROTEASOMSKE AKTIVNOSTI

V zadnjih nekaj desetletjih so proteasomski zaviralci služili kot orodje za identifikacijo proteasomskih substratov in vzpostavitev dognanj o njegovi vpletjenosti v različne biokemične, imunološke in fiziološke procese. Prvi znani zaviralec, ki nespecifično deluje na proteasomske in imunoproteasomske katalitične podenote in katerega uporabo v terapiji multiplega-mieloma je leta 2003 odobrila tudi FDA, je derivat boronske kisline bortezomib, ki so mu sledili še ostali nespecifični zaviralci, večinoma derivati boronske kisline, epoksiketoni ali salinosporamid A (karfilzomib, iksazomib, marizomib, oprozomib, itd.) (slika 6). Bortezomib izkazuje neposredno protitumorno učinkovitost proti malignim

celicam B, poleg tega pa zmanjšuje število kratko in dolgo živečih plazmatk, kar je verjetno posledica razgradnje razvitih proteinov. Ena od težav terapije je pojav rezistence in neželeni stranski učinki, zato se pojavlja težnja po novih proteasomskih zavircih.

Raziskave zadnjih let so pokazale, da so deli proteasoma s kimotripsinu podobno aktivnostjo najpomembnejši pri proteinski razgradnji. V luči tega so bili optimizirani mnogi proteasomski zavirci glede na njihovo sposobnost blokade β 5 aktivnega mesta, ki preferenčno cepi za hidrofobnimi aminokislinskimi ostanki. Vsi ti prvotni zavirci (bortezomib, epoximicin, MG-132) so učinkovito inhibirali razgradnjo proteinov, niso pa bili selektivni zgolj za kimotripsinu podobno aktivnost. Terapevtski učinek se je pokazal šele pri visoki koncentraciji, kar pa je imelo za posledico še zaviranje kaspazi in tripsinu podobne aktivnosti, kar je sicer nakazovalo tudi na vlogo preostalih podenot pri proteinski razgradnji. Uporaba nespecifičnih proteasomskih zavircov ima določene omejitve zaradi neželenih učinkov, ki so posledica nespecifičnega delovanja (npr. hematološka toksičnost in periferna nevropatija). Specifično zaviranje katalitične aktivnosti proteasomske podenote, ki jo povezujejo z določenim patološkim procesom, bi lahko povečala učinkovitost in zmanjšala neželene učinke. Vse to je vzbudilo zanimanje za razvoj specifičnih zavircov, ki bi služili kot orodje za preučevanje vlog posameznih katalitičnih podenot pri proteinski razgradnji in za opredelitev njihove individualne vloge kot tarče pri patofizioloških procesih (40).

Naslednjo generacijo (slika 6) tako predstavljajo zavirci s selektivnim delovanjem. PR-924 in PR-957 delujeta selektivno na podenoto β 5i. Strukturno se od proteasomskih zavircov razlikujeta v aromatičnih in hidrofobnih farmakoforih ter stranskih aminokislinah (37). Selektivno zaviranje so opazili tudi pri dipeptidnih aldehydih, IPSI-001 in UK-101. IPSI-001 deluje na podenoto β 1i in zavira kimotripsin in kimotripsinu podobno aktivnost v tumorskih celičnih linijah multiplega mieloma, medtem ko je uporaba UK-101 zavrla rast tumorskih celic prostate, ki so izkazovale povišan nivo podenote β 1i. S še boljšim poznavanjem natančne kristalne strukture imunoproteasoma in uvidom v njegovo kompleksno delovanje lahko v prihodnosti pričakujemo perspektivne pristope pri razvoju novih specifičnih zavircov (37, 39).

Učinkovina	Tarčna podenota	Indikacija
Nespecifični zaviralci		
Bortezomib	Dipeptid boronske kisline	β_5 , β_5i , β_1i , reverzibilno
		Multipli mielom
Karfilzomib	Tetapeptid epoksiketon	β_5 in β_5i ; ireverzibilno
		Multipli mielom, tumorji
Iksazomib	Predzdravilo boronske kisline	β_5 , tudi β_1 in β_2 (visoke konc.)
		Multipli mielom, tumorji
Marizomib	Salinosporamid A	β_5 , β_2
		Multipli mielom, levkemija, limfomi, trdni tumorji
Specifični zaviralci		
PR-924 (IPSI)	Epoksiketon	β_5i
		Multipli mielom
ONX-0914 (PR-957)	Tripeptid epoksiketon	β_5i
		Revmatoidni aritis, sistemski erimatozni lupus
UK-101	Peptid epoksiketon	β_1i
		Rak prostate

Slika 6: Pregled najpogostejših nespecifičnih in specifičnih zaviralcev proteasoma in imunoproteasoma (prirejeno po 8, 38)

1.6. LIMFOBLASTOIDNE CELIČNE LINIJE (LCL)

Z napredkom genetskih raziskav se je pokazala potreba po celičnih modelih, ki ponujajo dolgoročno zалого celic z ujemajočim genotipom in fenotipom. Velik doprinos k temu je prispevala vzpostavitev limfoblastoidnih celični linij (LCL), ki smo jih pri našem eksperimentalnem delu uporabili kot proučevani celični model. LCL so humane celične linije, ki jih pridobivajo iz periferne krvi. Izolirane limfocite B okužijo z virusom Epstein Barr (EBV) ter s tem povzročijo njihovo nesmrtnost in dvig proliferacije celične populacije. Tako pripravljene celične linije predstavljajo neskončen vir biomolekul (DNA, RNA, proteini) in so odličen *in vitro* modelni sistem za študije genskih presejalnih testov in preučevanje odzivov na učinkovine predvsem v povezavi z interindividualno variabilnostjo posameznikov. Uporabljamо se lahko za identifikacijo genov, ki imajo vlogo pri patofizioloških procesih in na katerih ekspresijo lahko vplivamo s posamezno terapevtsko učinkovino. Tako lahko služijo kot modeli za začetno presajanje učinkovin in lažjo opredelitev nove učinkovine v posamezno terapevtsko skupino. Predstavljajo tudi modelni sistem za preučevanje korelacij med genotipom in fenotipom in molekularnih/funkcionalnih lastnosti v okviru imunoloških študij ter študij na področju celične biologije. Odlikujejo jih enostavno gojenje in z njо povezani nizki stroški ter kromosomska stabilnost pri podvajjanju populacij. Čeprav izkazujejo vsestransko uporabnost, so tekom priprave podvržene signifikantni transformaciji, ki lahko vpliva na biološke lastnosti. Virusna transformacija, kontinuirano gojenje ter shranjevanje lahko vplivajo na spremembo epigenetskih lastnosti, transkripcijo in translacijo, česar se je pri njihovi uporabi potrebno zavedati (41, 42, 43). Kljub temu da celice LCL po transformaciji z EBV obdržijo večino fenotipskih lastnosti, na splošno izkazujejo zelo raznolik vzorec celičnih površinskih označevalcev, kar je lahko tudi posledica stopnje diferenciacije B celic v času transformacijskega dogodka ali pa vpliv virusa. Wroblewski in sodelavci so ugotovili, da večina LCL celic sicer izloča signifikantne količine immunoglobulinov (npr. IgG, IgM), niso pa zaznali nobenih večjih vrednosti citokinov IFN- γ , IL-4 in TGF- β (44).

2. NAMEN DELA

V zadnjih letih se vse več raziskav usmerja v preučevanje vloge proteasoma in imunoproteasoma, ki s svojim delovanjem uravnavata ravnovesje proteinov in tako vplivata na številne celične procese. Zlasti zanimivi so izsledki raziskav glede imunoproteasoma, ki odstirajo njegovo vlogo pri aktivaciji in vzdrževanju imunskega odziva ter določenih patoloških procesih, kjer so opazili spremenjeno aktivnost določenih imunoproteasomskih katalitičnih podenot. Posledično se pojavlja težnja po odkrivanju novih zaviralcev za ciljano terapijo katalitičnih imunoproteasomskih podenot, za njihovo vrednotenje v *in vitro* pogojih pa je potrebna vzpostavitev ustreznih celičnih modelov.

Naš cilj je določiti nivo in identificirati potencialne razlike v izražanju genov, ki kodirajo imunoproteasomske in proteasomske katalitične podenote v celicah LCL z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR). LCL so humane celične linije, ki jih pridobivajo iz periferne krvi zdravih donorjev z EBV transformacijo in ohranijo večino svojih fenotipskih lastnosti, zaradi česar so zanimive kot modeli za spremljanje interindividualne varibilnosti. Preko tovrstne karakterizacije želimo opredeliti njihovo morebitno ustreznost za vrednotenje proteasomskih zaviralcev, preučevanje vlog posameznih podenot in morebitnih interindividualnih razlik v delovanju imunoproteasoma. V začetni fazi bomo izolirali RNA iz 39 celičnih linij LCL. Sledil bo prepis celokupne izražene RNA v cDNA, pri čemer bomo uporabili postopek reverzne transkripcije. Z metodo qPCR bomo nadalje poiskali ustreerne referenčne gene, s katerimi bomo normalizirali izražanje preiskovanih 6 genov, ki kodirajo katalitične podenote proteasoma ($\beta 1$, $\beta 2$ in $\beta 5$) in imunoproteasoma ($\beta 1i$, $\beta 2i$ in $\beta 5i$). Nato bomo preverili nivo izražanja preučevanih genov ter identificirali celice, ki najnižje in najvišje izražajo izbrane gene znotraj posamezne podenote. Sledila bo razvrstitev celičnih linij v skupine po podobnosti glede na skupne značilnosti in vrednotenje njihove ustreznosti za posamezen eksperiment. Na manjšem izboru celičnih linij bomo izmerili še encimsko aktivnost imunoproteasomske podenote $\beta 5i$, saj nas zanima, kako le-ta sovpada z izražanjem gena za $\beta 5i$.

Preko vsega omenjenega bomo poskusili identificirati tiste celične linije LCL, ki bi lahko v prihodnje služile kot modeli za preverjanje molekularne vloge imunoproteasoma ter vrednotenje morebitnih zaviralcev.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

3.1.1. Kemikalije in reagenti

Kemikalija/reagent	Proizvajalec
Ac-ANW	Bachem, Bubendorf, Switzerland
BSA (10mg/ μ L)	
Čistilo z zaviralcem RNAs ZNaseZAP™	Sigma Aldrich
Kloroform	Merck, Whitehouse station, New York, ZDA
N-sukcinil_levcin-levcin-valin-tirozin-7-amino-4-metilkumarin	Bachem, Bubendorf, Switzerland
reagent za izolacijo proteinov: reagent A	DC™ Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, ZDA
reagent za izolacijo proteinov: reagent B	DC™ Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, ZDA
reagent za izolacijo proteinov: reagent S	DC™ Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, ZDA
ultra čista voda brez RNAs	/
70% EtOH	Merck Chemicals, Darmstadt, Nemčija

3.1.2. Raztopine

Raztopina	Proizvajalec
3% raztopina hipoklorita	/
pufer TRIS-HCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
5mM lizatni pufer EDTA, pH=8	/
50mM pufer TRIS-Cl z 0.5 mM EDTA, pH=8	/

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 Inc., Foster City, California, ZDA
Osnovna zmes za qPCR SYBR® Select Master mix	Applied Biosystems, Austin, ZDA
Osnovna zmes za qPCR EvaGreen® qPCR Supermix	Solis BioDyne, Tartu, Estonija

3.1.4. Encimi

Encimi	Proizvajalec
aktivator PA28	Boston Biochem, Inc., Cambridge, MA, ZDA
humani imunoproteasom 20S	Boston Biochem, Inc., Cambridge, MA, ZDA
humani proteasom 20S	

3.1.5. Oligonukleotidni začetniki

Referenčni geni	
Oligonukleotidni začetniki	Proizvajalec/sekvenca začetnika
Oligonukleotidna začetnika za gen <i>GUSB</i>	Sigma-Aldrich, MO, ZDA F_GGCTCCGAATCACTATGCC R_CCTTGGGATACTTGGAGGTGT
Oligonukleotidna začetnika za gen <i>RPLP0</i>	Sigma-Aldrich, MO, ZDA F_TCTACAACCCTGAAGTAAGTGCTTGAT R_GAATCTGCAGACAGACACTGG
Oligonukleotidna začetnika za gen <i>GAPDH</i>	Sigma-Aldrich, MO, ZDA F_AACTTGGCATTGTGGAAGG R_GGATGCAGGGATGATGTTCT
Oligonukleotidna začetnika za gen <i>TBP</i>	Sigma-Aldrich, MO, ZDA F_GATAAGAGAGGCCACGAACAC R_CAAGAACTTAGCTGGAAAACCC
Oligonukleotidna začetnika za gen <i>ACTB</i>	Sigma-Aldrich, MO, ZDA F_CTAAGGCCAACCGTGAAAAGAT R_CACAGCCTGGATGGCTACGT

Geni, ki kodirajo za katalitične podenote proteasoma in imunoproteasoma	
Oligonukleotidni začetniki	Proizvajalec/Sekvenca začetnika
	Sigma-Aldrich, MO, ZDA
Oligonukleotidna začetnika za gen <i>PSMB6</i>	F_TGACCAAGGACGAATGTCTG R_GATTGGTCTCCAAAAGCA
	Sigma-Aldrich, MO, ZDA
Ooligonukleotidna začetnika za gen <i>PSMB7</i>	F_CTTGCTTGGAAAGCGGATTTC R_GCAACAACCATCCCTTCAGT
	Sigma-Aldrich, MO, ZDA
Oligonukleotidna začetnika za gen <i>PSMB5</i>	F_GTGAATCAGCACGGGTTTT R_AATCCGCTGCAACAATGACT
	Sigma-Aldrich, MO, ZDA
Oligonukleotidna začetnika za gen <i>PSMB9</i>	F_CATCATGGCAGTGGAGTTG R_TGAGAGGGCACAGAAGATG
	Sigma-Aldrich, MO, ZDA
Oligonukleotidna začetnika za gen <i>PSMB10</i>	F_CAGCCAAACATGACGCTGG R_CAGTGATCACACAGGCATCCAC
	Sigma-Aldrich, MO, ZDA
Oligonukleotidna začetnika za gen <i>PSMB8</i>	F_ACCACACTCGCCTTCAAGTTC R_GCCAAGCAGGTAAGGGTTAAC

3.1.6. CELIČNE LINIJE

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili 39 humanih limfoblastoidnih celičnih liniji (LCL), pridobljene iz periferne krvi iz zdravih donorjev, iz katere so izolirali limfocite B in jih transformirali z virusom Epstein-Barr (EBV). Celice LCL so bile označene s sledečimi identifikacijskimi oznakami: 6417, 1371, 1564, LCL1, 381, LCL8, LCL7, 5876, 387, LCL10, 382, 1801, 1561, LCL9, 1131, 390, 6423, 383, 380, LCL6, 1112, 1728, 384, 1122, 1754, LCL5, 1515, 1976, 6425, 388, 385, 389, LCL3, LCL4, 1823, 386, 6037, LCL2, 6333.

3.2. METODE

3.2.1. Izolacija RNA

RNA smo izolirali iz predhodno gojenih 39 LCL celičnih linij v treh bioloških ponovitvah. Posamezni vzorec je vseboval $2,5 \times 10^6$ celic. Celicam so predhodno dodali 0,5 ml Trizola, ki ga sestavlja fenol in gvanidin izotiocianat. Dodatek Trizola povzroči lizo celic in disociacijo nukleinskih kompleksov, obenem pa ohrani integriteto RNA. Po dodatku Trizola so bile celice zamrznjene na -86 °C.

Sledila je ekstrakcija s kloroformom, kar je pogosto uporabljen tehnik za čiščenje nukleinskih kislin in odstranjevanja proteinskih lipidov v biokemiji in molekularni biologiji. Proteini, hidrofobni lipidi in DNA namreč precipitirajo v spodnjo organsko fazo, medtem ko RNA ostane v zgornji vodni fazi.

Pri nadalnjem delu smo nato s pomočjo kompleta Purelink™ Micro-to-Midi Total RNA purification Kit vezali in spirali RNA na koloni. Tako smo našo izolirano RNA očistili nečistoč.

3.2.1.1. Tekočinska ekstrakcija RNA iz celičnih linij LCL

Pred začetkom dela smo očistili RNA komoro s 70% EtOH in raztopino RNaseZap™, ki vsebuje zaviralce RNAAz, nato pa smo jo za 30 minut obsevali z UV svetlobo, s čimer smo temeljito sterilizirali komoro. Vse plastične vsebnike smo pred delom predhodno avtoklavirali. Pri pipetiranju smo uporabili sterilne nastavke za pipete, ki so deklarirano brez RNAAz in DNAAz. Zaradi velike občutljivosti RNA in njene potencialne razgradnje je bilo potrebno vse materiale pred vnosom v komoro očistiti s hipokloritom in z zaviralci RNAAz.

V prvi fazi smo celice odmrznili na sobni temperaturi, nato pa v digestoriju dodali 0,2 ml kloroform za ekstrakcijo RNA. Po 15 sekundah ročnega stresanja epic je sledila 2-3 minutna inkubacija na sobni temperaturi in centrifugiranje na 12.000 x g 15 minut pri 4 °C. Po centrifugiraju se je zmes ločila na spodnjo plast (kloroform/fenol rdeče) z DNA in proteini in zgornjo vodno plast z RNA in ostalimi kontaminanti. 200 µl zgornje brezbarvne vodne plasti smo s pipeto prenesli v sveže epice in ji dodali enaki volumen 70% EtOH. Zmes smo dobro vorteksirali in dodatno premešali z obračanjem epic.

3.2.1.2 Vezava, spiranje in elucija RNA

400 µl vzorca z RNA smo prenesli na kolono za izolacijo RNA, pod katero smo predhodno postavili zbiralno epruveto. Sledilo je centrifugiranje na 12.000 g 15 s pri sobni temperaturi

(22 °C). Eluat v zbiralni epruveti smo zavrgli in kolono ponovno vstavili v prazno epruveto. Na kolono smo dodali 700 µl spiralnega pufra I (Wash Buffer I) in nato centrifugirali na 12.000 g 15 s na sobni temperaturi. Zbrani eluat smo zopet zavrgli in kolono postavili nazaj v prazno epruveto. Dodali smo 500 µl spiralnega pufra II (Wash Buffer II), ki smo ga predhodno razredčili s 60 mL 96% EtOH. Vzorce smo ponovno centrifugirali na 12.000 g 15 s na sobni temperaturi, zavrgli vsebino zbiralne epruvete in še dvakrat ponovili postopek spiranja s spiralnim pufrom II. Po zadnjem spiranju smo vzorce še enkrat centrifugirali na 12.000 g 1 minuto pri sobni temperaturi z namenom osušitve membrane, ki je vsebovala RNA. Zbiralno epruveto smo zavrgli in jo nadomestili z novo epico RNA Recovery Tube. RNA smo nato spirali z dodatkom 60 µl vode brez RNAs. Po spiranju smo vzorce inkubirali 1 minuto pri sobni temperaturi in vse skupaj še enkrat centrifugirali na 12.000 g 2 minuti na pri sobni temperaturi. Sledila je priprava alikvotov volumna 3µL za določitev koncentracije in čistosti RNA, preostanek pa smo shranili v zamrzovalniku na -86 °C.

3.2.2. Določanje koncentracije in čistosti izolirane RNA

Z uporabo UV/VIS spektrofotometra Nanodrop® smo določili koncentracijo in ocenili čistost izolirane RNA. Koncentracijo smo določili preko merjenja absorbance pri 260 nm, saj imajo pri tej valovni dolžini purini, pirimidini in nukleinske kisline absorpcijski maksimum. Preko razmerji $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ in $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ smo ocenili čistost naših vzorcev. Pričakovane vrednosti razmerja $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ se gibljejo med 1.8-2.0, nižje vrednosti pa nakazujejo na kontaminacijo s proteini, fenolom ali drugih snovi, ki povisajo absorpcijo pri 280 nm. Vrednosti razmerja $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ naj bi bile med 2.0 in 2.2, v primeru nižjih vrednosti pa lahko sklepamo na kontaminacijo z ogljikovimi hidrati, fenolom ali EDTO.

3.2.3. Reverzna transkripcija

Za reakcijo prepisa iz izolirane RNA v komplementarno DNA (cDNA) smo uporabili encim reverzna trankriptaza. Reverzna transkriptaza je virusnega izvora in pri retrovirusih služi za prepis enoverižne RNA v dvovijačno DNA, ki se zatem lahko vgradi v gostiteljski genom. Pri našem delu smo uporabili komplet High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, ki vsebuje reverzno transkriptazo Maloney mišjega virusa levkemije. Koncentracija nastale cDNA je po končani reakciji enaka koncentraciji RNA v končni zmesi za reverzno transkripcijo.

Pred začetkom dela smo morali zagotoviti pogoje, v katerih RNAAze niso aktivne oz. čim bolj zmanjšati možnost kontaminacije in razgradnje RNA. Zato smo dno UV komore očistili s 70% etanolom, notranji material pa s 3% hipokloritom. Sledilo je 30 minutno obsevanje z UV svetlobo. Pred vnosom kakršnega koli materiala (komponente kita, epice) v komoro, smo le-te očistili z raztopino RNaseZapTM, ki vsebuje zaviralce RNAAz.

Vzorce z izolirano RNA smo pred prepisom v komplementarno DNA (cDNA) na podlagi rezultatov izmerjene koncentracije RNA redčili z vodo brez RNAAz in DNAz (HyCloneTM Water, Molecular Biology Grade). Pripravili smo 10 µL vzorca s koncentracijo RNA 100 ng/µL.

Preglednica I: Komponente reagenčnega kompleta High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit za pripravo zmesi za reakcijo prepisa RNA v cDNA in njihovi volumni

Komponenta reagenčnega kompleta	Volumen/reakcijo (µL)
10xRT Buffer	2
25xdNTP Mix (100 mM)	0.8
10xRT Random Primers	2
Multiscribe Reverse Transcriptase, 50 U/µL	1
RNase inhibitor	1
Nuclease-free H ₂ O	3.2
skupni volumen na reakcijo	10

Sledila je priprava reagentov iz kompleta High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. Komplet vsebuje reverzno transkriptazo (Multiscribe Reverse Transcriptase), začetne oligonukleotide (10xRT Random Primers), deoksinukleotid trifosfate (25xdNTP Mix (100 mM)), zaviralca RNAAz (RNase inhibitor) in pufer za reverzno transkripcijo (10xRT Buffer). Epice z izolirano RNA smo v tem času shranili na ledu in jih pred vsakimi nadaljnji postopki vorteksirali. Komponente reagenčnega kompleta za prepis RNA v cDNA smo odtalili na ledu in izračunali potrebne volumne za želeno število reakcij, ki so predstavljeni v preglednici I.

Epice z vzorcem RNA ($V=10 \mu\text{L}$, $c=100 \text{ ng}/\mu\text{L}$) smo prenesli iz ledu v komoro ter vanje odpipetirali po 10 µL pripravljene zmesi iz reagenčnega kompleta, kot je prikazano v preglednici II. Koncentracije RNA v končni zmesi za reverzno tranksripcijo je tako znašala 50 ng/µL. Po kratkem vorteksiranju smo jih centrifugirali 15 s z namenom odstranitve zračnih mehurčkov. Vzorce smo nato postavili v ciklični termostat C1000TM Thermal Cycler, kjer je potekla reverzna transkipcija pod pogoji, ki so opisani v preglednici II.

Preglednica II: Uporabljeni program za reakcijo reverzne transkripcije

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

Po končani reverzni transkripciji smo vzorce shranili v zamrzovalniku (-15 °C) do nadaljnje uporabe.

3.2.4. Redčenje vzorcev in priprava standardov za umeritveno krivuljo

Po prepisu v cDNA smo dobili vzorce s koncentracijo cDNA 50 ng/ μ L in volumnom 20 μ L. Redčili smo jih vodo HyClone brez RNAs in DNAs do želene koncentracije 20 ng/ μ L.

Za pripravo standardov smo v UV komori od vsakega prepisanega vzorca koncentracije 20 ng/ μ L odpipetirali po 2 μ L v epico. Z nadaljnjam redčenjem te zmesi smo pripravili 11 standardov, katerih koncentracije so prikazane v preglednici III.

Preglednica III: Standardi in njihove koncentracije cDNA za pripravo standardne krivulje

Št. standarda	Koncentracija cDNA [ng/ μ L]	Št. standarda	Koncentracija cDNA [ng/ μ L]
1	20	7	0.3125
2	10	8	0.156
3	5	9	0.078
4	2.5	10	0.039
5	1.25	11	0.0195
6	0.625	/	

Za qPCR smo uporabljali vzorce s koncentracijo cDNA 0,3125 ng/ μ L, zato smo jih v komori še dodatno redčili. Vzorce s koncentracijo 20 ng/ μ L smo shranili v zamrzovalnik, razredčene vzorce pa v hladilnik do nadaljnje uporabe.

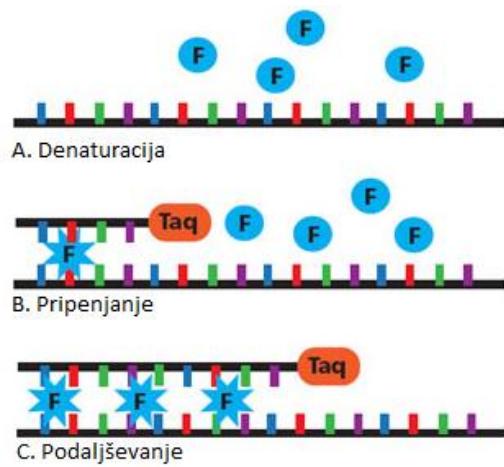
3.2.5. qPCR: verižna reakcija s polimerazo v realnem času

Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR) je zaradi praktičnosti, hitrosti, občutljivosti in specifičnosti postala pogosto uporabljena metoda izbire kvantifikacije mRNA v mnogih bioloških vzorcih. V primerjavi s standardno PCR metodo, ki omogoča kvantifikacijo produkta šele po koncu reakcije, nam qPCR preko akumulacije in meritve specifičnih fluorescenčnih signalov v vsakem ciklu ponuja možnost vpogleda v

kinetiko podvajanja v realnem času, poleg tega je metoda občutljivejša in točnejša. Visoka občutljivost metode posledično zahteva pazljivo in natančno izvedbo eksperimenta (45).

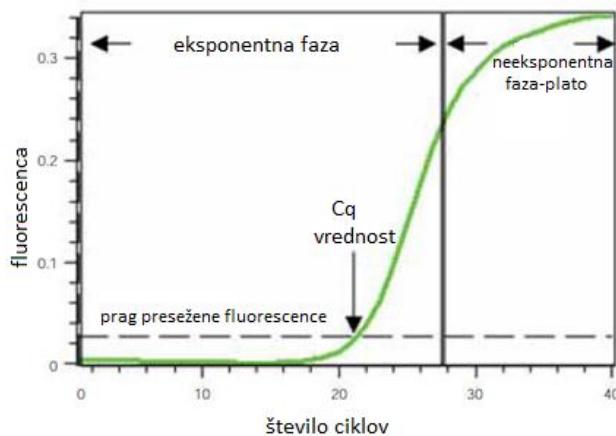
Princip pomnoževanja majhnih količin DNA pri qPCR je enak kot pri PCR: reakcijsko zmes sestavljajo matrična DNA (v našem primeru je bila to cDNA, predhodno prepisana iz začetne RNA), dva sintetična začetna oligonukleotida, vsi štirje deoksiribonukleozidtrifosfati, primeren pufer in termostabilna DNA polimeraza. Omenjene komponente se lahko kupijo v obliki osnovnih zmesi kot so npr. SYBR® Select Master Mix in EvaGreen® qPCR Supermix, ki smo jih uporabili pri našem delu.

qPCR izvajamo v ciklih s tremi stopnjami. V prvi stopnji poteka denaturacija, ki preko prekinitve vodikovih vezi loči matrični verigi DNA. V drugi stopnji z znižanjem temperature omogočimo hibridizacijo oligonukleotidnih začetnikov z ustreznimi komplementarnimi odseki na cDNA. V zadnji stopnji pa DNA-polimeraza Taq katalizira sintezo želene DNA. Pri pomnoževanju iz ene matrične dvojno vijačnice torej nastaneta dve dvojni vijačnici, ki imata eno matrično in eno novo nastalo verigo. Z vsakim ciklom količina nastalih produktov eksponentno narašča in sčasoma zaradi pomanjkanja reakcijskih komponent doseže plato. Vsak cikel, ki se ponovi 25-50 krat, lahko preprosto ponovimo s spremenjanjem temperature reakcijske mešanice v cikličnem termostatu (60). Za detekcijo produktov PCR v eksponentni fazi sta poznani dve metodi: dodatek fluorescenčnega barvila, ki nespecifično interkalira z vsako dvoverižno DNA (slika 7) ali uporaba sekvenčno specifičnega DNA odseka, ki vsebuje s fluorescenčnimi barvili označene oligonukleotide. Obe metodi omogočata meritev količine produkta (46).



Slika 7: Prikaz interkalacije barvila DNA tekom postopk podaljševanja komplementarne verige s Taq polimerazo (prirejeno po 56)

Pri našem eksperimentu smo uporabili metodo detekcije s SYBRGreen I® in EvaGreen® TM barviloma. Metodo odlikuje fleksibilnost in cenovna ugodnost. Barvili se tekom reakcije nespecifično vežeta na vse dvojnovijačne DNA in po ekscitaciji z določeno valovno dolžino flourescirata. Fluorescencija se meri v vsakem ciklu, narašča pa z naraščajočo količino DNA, kar zaradi dejstva, da je direktno sorazmerna količini podvojene DNA, omogoča kvantifikacijo njene koncentracije (47). Detekcija ni specifična, saj se barvilo veže na vse dvojnovijačne strukture, zato ustrezna izbira oligonukleotidnih začetnikov in pogoji bistveno vplivajo na specifičnost reakcije. Porast fluorescence je odvisen od števila ciklov, ki generirajo krivuljo pomnoževanja, iz katere lahko določimo cikel kvantifikacije Cq. Ta predstavlja število ciklov, pri katerem je fluorescence signifikantno višja kot fluorescence ozadja. Določimo ga v eksponentni fazi krivulje in je v direktni korelaciji z začetno koncentracijo DNA v vzorcu. Preko njegove vrednosti in primerjave s standardno krivuljo smo določili začetno koncentracijo matrične cDNA, kar predstavlja osnovo za absolutno in relativno kvantifikacijo (slika 8) (45, 47).



Slika 8: Prikaz krivulje pomnoževanja metode qPCR (prirejeno po 61)

Pri reakciji qPCR je potrebno potrditi tudi učinkovitost pomnoževanja začetnikov. Njegovo neupoštevanje zaradi vpletenosti v določanje Cq lahko signifikantno vpliva na rezultat izražanja mRNA. Obstajata dva pristopa, s katerima lahko določimo učinkovitost vsake analizirane ploščice: lahko jo določimo za vsako ploščico posebej ali pa upoštevamo povprečno vrednost učinkovitosti vseh ploščic. Pri naši nalogi smo se odločili za prvo možnost, s čimer smo s pomočjo naklona umeritvene krivulje standardnih raztopin pridobili podatke o učinkovitosti za vsak oligonukleotidni začetnik ob koncu reakcije vsake posamezne ploščice. Teoretični maksimum znaša 2.0, v praksi pa smo vrednotili vsako reakcijo, katera učinkovitost je bila med 1.8-2.2 (45, 46).

3.2.6. qPCR referenčnih genov in genov, ki kodirajo katalitične proteasomske in imunoproteasomske podenote

Referenčni geni, včasih poimenovani tudi hišni geni, so konstitutivni geni, ki so potrebni za zagotavljanje osnovnih celičnih funkcij. Z metodo qPCR v realnem času lahko občutljivo in natančno kvantificiramo produkte pomnoževanja, vendar so potrebne še korekcije z normalizacijo, s čimer zmanjšamo vpliv eksperimentalnih napak. Koncentracije izražanja katalitičnih podenot proteasoma in imunoproteasoma, ki smo jih pridobili s pomočjo programske opreme LightCycler, smo delili s koncentracijami izbranih referenčnih genov. Za izračune smo uporabili MS Excell.

Postopek

Pred začetkom smo komoro in ves material (pipete, stojala, itd.) očistili s 70% etanolom in 3% hipokloritom ter jo 30 minut obsevali z UV svetlobo. Komponente pred-pripravljenih raztopin Master Mix SYBR® Select / 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix (preglednica IV) smo medtem odtalili na ledu ter vsebnike pred vnosom v komoro očistili s hipokloritom, zatem pa smo vsebino premešali z uporabo vortexa. V svežo sterilno epico smo nato pripravili pred-pripravljeno raztopino SYBR® Select Master Mix za analizo izražanja referenčnih genov in genov, ki kodirajo imunoproteasomske podenote, v primeru analize izražanje genov, ki kodirajo proteasomske podenote, pa smo uporabili pred-pripravljeno raztopino 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix (preglednice V-IX).

Preglednica IV: Uporabljeni materiali in osnovne zmesi/spojine za verižno reakcijo s polimerazo v realnem času

Spojina/ osnovna zmes	Materiali
Osnovna zmes PCR Master Mix SYBR® Select	Pipete, pipetni nastavki
Osnovna zmes 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix	Sterilne epice
Oligonukleotidni začetniki: <i>GUSB</i> , <i>RPLP0</i> , <i>GAPDH</i> , <i>TBP</i> (100 µM)	Centrifuga, mikrotitrská ploščica s 384 vdolbinicami
ddH ₂ O	Light cycler

Preglednica V: Potrebni volumni za pripravo reakcijske zmesi za qPCR z uporabo SYBR® Select Master Mixa za izražanje referenčnih genov (c=100 nM).

Komponente reakcijske zmesi	V za eno reakcijo (µL)
SYBR®	5
Protismerni začetni oligonukleotid (R primer)	0.05
Smerni začetni oligonukleotid (F primer)	0.05
ddH2O	1.9
vzorec	3

Preglednica VI: Potrebni volumni za pripravo reakcijske zmesi za qPCR z uporabo SYBR® Select Master Mixa za izražanje genov, ki kodirajo podenote imunoproteasoma (c=200 nM)

Komponente reakcijske zmesi	V za eno reakcijo (µL)
SYBR®	5
Protismerni začetni oligonukleotid (R primer)	0.1
Smerni začetni oligonukleotid (F primer)	0.1
ddH2O	1.8
vzorec	3

Preglednica VII: Pregled volumnov za pripravo reakcijske zmesi za qPCR z uporabo 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix za analizo izražanja podenot β 2 in β 5 (c=400 nM)

Komponente reakcijske zmesi	V za eno reakcijo (µL)
EvaGreen®	2
Protismerni začetni oligonukleotid (R primer)	0.2
Smerni začetni oligonukleotid (F primer)	0.2
ddH2O	4.6
vzorec	3

Preglednica VIII: Pregled volumnov za pripravo reakcijske zmesi za qPCR z uporabo 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix za analizo izražanja podenote β 1 (c=800 nM)

Komponente reakcijske zmesi	Volumne reakcije (μ L)
EvaGreen®	2
Protismerni začetni oligonukleotid (R primer)	0.4
Smerni začetni oligonukleotid (F primer)	0.4
ddH ₂ O	4.2
vzorec	3

Preglednica IX: Pregled uporabljenih pred-pripravljenih raztopin

Pred-pripravljena raztopina	Sestava
SYBR® Select Master Mix	SYBR® GreenER™ barvilo AmpliTaq® DNA Polymerase, UP (ultra pure) toplotsko stabilna Uracil-DNA glikozilazo (UDG) referenčno barvilo ROX™ pufer dNTPji z dUTP/dTTP
5x HOT FIREPol® EvaGreen®	EvaGreen® barvilo HOT FIREPol® DNA polimeraza 12.5 mM MgCl ₂ 1x PCR solution – 2.5 mM Interna referenca, ki temelji na ROX barvilu GC-rich Enhancer Modro barvilo 5x EvaGreen® qPCR buffer dNTPji z dUTP/dTTP

Po shemi smo v mikrotitrsko ploščico s 384 vdolbinicami odpipetirali 10 μ L reakcijske zmesi. Vzorce smo pred nanosom vorteksirali ter jih v primeru nastanka zračnih mehurčkov centrifugirali. Vsak vzorec smo na mikrotitrsko ploščico nanesli v duplikatu.

Poleg vzorcev in standardov smo na ploščico v duplikatu nanesli tudi negativno kontrolo, ki je vsebovala ultra čisto vodo brez RNAAZ.

Po nanosu vseh vzorcev smo ploščico zapečatili z optično adhezivno folijo in jo centrifugirali pri 2200 g 5 minut z namenom odstranitve zračnih mehurčkov ter posedanjem vzorcev in reagentov na dno vdolbinic.

Za detekcijo pomnoževanih produktov qPCR smo uporabili Light Cycler. Izbira pogojev oz. protokola zavisi od temperature taljenja oligonukleotidnih začetnikov in uporabljenih reagentov. Uporabljeni začetniki referenčnih genov imajo $T_m \geq 60^\circ\text{C}$, zato smo izbrali pogoje, opisane v preglednic X, ki so ustreznici tudi za imunoproteasomske podenote, medtem ko smo za analizo izražanja proteasomskih podenot uporabili program, opisana v preglednicah XI in XII.

Preglednica X: Program za izražanje referenčnih in imunoproteasomskih genov z uporabo SYBR® Select Master Mixa (*RPLP0* 100 nM, *GUSB* 100 nM, *TBP* 100 nM, $\beta 1$ i 200 nM, $\beta 2$ i 200 nM, $\beta 5$ i 200 nM)

Stopnja	Temperatura	Trajanje	Št. ciklov
UDG aktivacija	50 °C	2 min	1
aktivacija AmpliTaq®Dna polimeraze	95 °C	2 min	1
denaturacija	95 °C	15 s	45
podaljševanje	60 °C	1 min	/

Preglednica XI: Pregled programa za izražanja proteasomski podenot $\beta 1$ (800 nM) in $\beta 2$ (400 nm) z uporabo 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix.

Stopnje	Temperatura	Trajanje	Cikel
začetna denaturacija	95 °C	15 min	1
denaturacija	95 °C	15 s	1
prileganje	55 °C	20 s	45
podaljševanje	72 °C	20 s	/

Preglednica XII: pregled programa za izražanje proteasomske podenote $\beta 5$ (400 nM) z uporabo 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix.

Stopnja	Temperatura	Trajanje	Št.ciklov
začetna denaturacija	95 °C	15 min	1
denaturacija	95 °C	15 s	1
prileganje	58 °C	20 s	45
podaljševanje	72 °C	20 s	/

3.2.7. Encimska aktivnost

3.2.7.1. Liza celic in izolacija proteinov

Postopek:

Za lizo transmembranskih proteinov smo uporabili 100 µL lizatnega pufra (5 mM EDTA, pH=8) na 3×10^6 celic. Po dodatku lizatnega pufra smo epice takoj postavili na led in z nizko temperaturo zavrli delovanje proteaz. Po ohladitvi smo jih rahlo premešali, nato pa vzorce 10 s pazljivo sonicirali z uporabo ultrazvočne palčke. Po soniciranju smo lizate takoj postavili na led in jih stresali 30 min na stresalniku. V naslednjem koraku smo lizate premešali in jih nato centrifugirali na 15.000 g 15 min pri 4 °C. Supernatant smo nato prenesli v sveže vsebnike in jih shranili na -80 °C.

3.2.7.2. Merjenje koncentracij proteinov z DC (detergent compatibility) metodo

Pri določanju koncentracije proteinov smo uporabili komponente kompleta DC™ Protein Assay (preglednica XIII), ki omogoča kolorimetrično določitev proteinske koncentracije z uporabo UV/VIS spektroskopije.

Reagente A, B in S smo pred uporabo 5 min inkubirali na 37 °C. Medtem smo na analitski tehnici zatehtali 10 mg reagenta BSA in ga raztopili v 10 mL vode.

Preglednica XIII: Pregled reagentov za kolorimetrično določitev koncentracije proteinov

Reagent	Uporaba
BSA (bovine serum albumin)	<ul style="list-style-type: none">• goveji serumski albumin; standard za določevanje koncentracije proteinov
DC Protein Assay reagent A	<ul style="list-style-type: none">• bazična raztopina bakrovega tartrata• za detekcijo peptidnih vezi; v prisotnosti peptidnih vezi bakrovi ioni formirajo vijolično obarvane komplekse v alkalni raztopini• za določevanje koncentracije, intenziteta barve je proporcionalna koncentraciji proteinov
DC Protein Assay reagent B	<ul style="list-style-type: none">• folinov reagent, derivatizacijski agent za merjenje količine aminov in aminokislin, po reakciji z alkalnimi raztopinami fluorescira
DC Protein Assay reagent S	<ul style="list-style-type: none">• SDS: surfaktant, detergent za ekstrakcijo proteinov. Disorganizira membranske lipidne dvošloje in solubilizira proteine

Sledila je priprava raztopine standardov v lizatnem pufru po naslednji shemi (preglednica XIV):

Preglednica XIV: Priprava standardov za določevanje koncentracije proteinov

C standarda (mg/mL)	V pufra (μ L)	V reagenta BSA (μ L)
0.2	24.50	0.50
0.5	23.75	1.25
0.8	23.00	2.00
1.0	22.50	2.50
1.5	21.25	3.75

V naslednjem koraku smo na prozorno mikrotitrsko ploščico dodali po 5 μ L standardov v treh paralelah in vzorce v duplikatih. Zatem smo v vsako luknjico dodali 25 μ L reagenta A' in 200 μ L reagenta B. Po pipetiranju smo mikrotitrsko ploščico 5 s stresali in inkubirali 15 min na sobni T. Absorbanco smo pomerili pri 750 nm na mikrotiterskem čitalcu BioTec.

3.2.7.3. Merjenje encimske kimotripsinu podobne aktivnosti podenote β 5 in β 5i

Za določanje aktivnosti podenote β 5 smo uporabili substrat Ac-ANW-AMC, ki je specifičen za določanje aktivnosti podenote β 5i, in substrat Suc-LLVY-AMC, katerega cepi tako proteasomska kot imunoproteasomska podenota β 5i.

Po predhodno izmerjeni koncentraciji proteinov smo z uporabo pufra TRIS pripravili raztopine koncentracije 0.2 μ g/ μ L. Sledilo je pipetiranje v črne mikrotitrskie ploščice. V luknjice smo najprej napisali 10 μ g proteinov posameznega vzorca in 6 nM aktivatorja PA28 ter inkubirali 30 minut pri 37 °C z rahlim stresanjem. Nato smo dodali ali 25 μ M substrata Ac-ANW-AMC ali 100 μ M substrata Suc-LLVY-AMC ter začeli z meritvami na čitalcu mikrotitrskih ploščic BioTec. Meritve smo izvedli v dveh paralelah, detekcija aktivnosti encima pa je potekala 2 h na vsakih 5 minut pri valovni dolžini ekscitacije 320 nm in emisiji 420 nm.

Naklon premice (k) smo izračunali v linearinem območju po *Enačbi 1*. Preko dobljenih naklonov smo ovrednotili aktivnost β 5i oziroma β 5 podenot. Za obdelovanje dobljenih podatkov smo uporabili Microsoft Office Excell 2013.

$$k = \Delta F / \Delta t \quad (\text{Enačba 1})$$

k: naklon premice

ΔF : fluorescenza

t: čas(min)

3.2.8. Statistična analiza

Dobljene rezultate izražanje genov smo podali kot povprečje treh bioloških ponovitev s pripadajočo standardno napako. Pred začetkom statističnih analiz smo s Shapiro-Wilkovim in D'Agostino-Pearsonovim testom preverili porazdelitev dobljenih vrednosti izražanja znotraj posameznega gena. V primeru, da se vrednosti niso normalno porazdeljevale, smo jih transformirali s pomočjo logaritmiranja in z omenjenima testoma zopet preverili normalnost porazdelitve. Pri nadalnjem vrednotenju rezultatov, kjer smo uporabili normalno porazdeljene vrednosti, smo se poslužili naslednjih statističnih testov:

- Enosmerno ANOVO in Tukeyev HSD post hoc test smo uporabili pri primerjavi rezultatov izražanja med več skupinami
- Neparni t test z Welchovo korekcijo smo uporabili pri primerjavi dveh skupin
- Za nenormalno porazdeljene spremenljivke smo uporabili neparametrične teste in sicer Mann-Whitneyev U-test za primerjavo dveh skupin.

Za statistično obdelavo smo uporabili program GraphPad Prism. Statistično značilna razlika je podana z $p < 0,05$ in je na grafu označena z * ter horizontalno linijo. Vsi grafi so prikazani kot povprečne vrednosti s standardno napako aritmetične sredine.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. DOLOČITEV REFERENČNIH GENOV

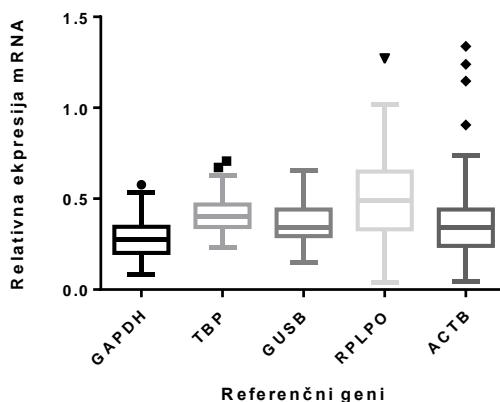
qPCR je standardna metoda za občutljivo in natančno kvantifikacijo mRNA, vendar so za doseganje optimalnih rezultatov potrebne korekcije z normalizacijo z namenom zmanjšanja eksperimentalnih napak. Te variacije, ki se tekom eksperimenta pojavljajo, so lahko posledica različne koncentracije začetnega materiala, variabilnosti ekstrakcij RNA ali različne učinkovitosti reverzne transkripcije. Za natančnost rezultatov qPCR je tako potrebna notranja kontrola, ki normalizira količino mRNA med posameznimi vzorci. Na voljo je več metod, s katerimi lahko opravimo korekcije, vendar v zadnjem času prevladuje normalizacija z uporabo referenčnih genov, predvsem zaradi njihove visoke specifičnosti z izbranim eksperimentalnim modelom (3, 48). Referenčni geni, včasih poimenovani hišni geni, so pomembni za vzdrževanje bazalnih celičnih funkcij in so posledično bistveni za obstoj celice. Do nedavnega je veljalo prepričanje, da se konstantno izražajo v različnih celičnih tipih in razvojnih fazah. Kot interni standardi so služili normalizaciji genske ekspresije. V zadnjem času pa izsledki vse več raziskav nakazujejo, da imajo različna razvojna stanja celic in spremenljivi eksperimentalni pogoji vpliv na variabilnost njihovega izražanja. Domnevajo, da v tem primeru referenčni gen ne sodeluje izključno pri osnovnih funkcijah, temveč tudi pri ostalih celičnih procesih. Posledično obstaja velika možnost variacije, zato je začetni izbor referenčnih genov, ki so podvrženi enakim postopkom priprave kot tarčni geni, nujno potreben rutinski korak za natančno in zanesljivo normalizacijo izražanja tarčnega gena (50, 51, 52, 53, 54).

Za izbiro primernih referenčnih genov smo na podlagi informacij iz literature v okviru našega eksperimentalnega dela analizirali in ovrednotili 5 referenčnih genov (preglednica XV).

Preglednica XV: Pregled analiziranih referenčnih genov

Oznaka gena	Protein, ki ga kodira gen	Biološka funkcija
<i>ACTB</i>	aktin beta	strukturni protein citoskeleta
<i>GAPDH</i>	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza	oksidoreduktaza pri metabolizmu glukoze
<i>RPLPO</i>	ribosomalni protein velike podenote PO	biosintezi protein
<i>TBP</i>	TATA box-binding protein	transkripcijski faktor
<i>GUSB</i>	beta glukuronidaza	kodiranje hidrolaz za razgradnjo glikozaminoglikanov

Žeeli smo ugotoviti, kateri od izbranih genov se na naših modelnih LCL celicah izraža najbolj stabilno. Rezultati izražanja referenčnih genov so prikazani na sliki 9.



Slika 9: Relativno izražanje mRNA analiziranih referenčnih genov. Sivi predelki predstavljajo vrednosti 25/75 percentilov, črta na sredini označuje mediano, zgornja ograja predstavlja 75th percentil + 1.5*IQR, spodnja ograja označuje vrednosti zajete med 25th percentil – 1.5*IQR (IQR-medkvartilni razmik). Točke izven ograj so izstopajoče vrednosti. Prikazane so povprečne vrednosti izražanja treh bioloških ponovitev.

Najvišje se izražata *RPLPO* (povprečna vrednost 0.51) in *TBP* (0.42), medtem ko so izražanja genov *GUSB* (0.37), *ACTB* (0.37) in *GAPDH* (0.29) nižja. Glede na prikazane rezultate smo predvideli, da bomo kot kandidate za referenčne gene iskali med *GAPDH*, *TBP* in *GUSB*, saj so izkazovali nižjo standardno deviacijo (SD) in koeficient variacije (KV) (preglednica XVI). *RPLPO* in *ACTB* sta se sicer izražala bolje, vendar sta imela tudi višje KV. Slednje lahko nakazuje na večje intraindividualne razlike in nižjo konstantnost izražanja znotraj celičnih linij.

Za potrditev identifikacije najbolj konstantno izraženega referenčnega gena v naših modelnih LCL celicah smo uporabili program Normfinder®. Program je dodatek Excela in uporablja matematični model, s katerim vrednoti stabilnost genske ekspresije. Ne omogoča le ocene celotne variacije med kandidatnimi geni, temveč tudi variacijo znotraj posameznih celičnih linij. Nižja vrednost rezultata nakazuje na večjo stabilnost izražanja preučevanega gena. Metoda omogoča direkten izračun variabilnosti med geni (48, 54).

Preglednica XVI: Prikaz stabilnostne vrednosti posameznih referenčnih genov

Oznaka gena	Povprečna vrednost mRNA bioloških ponovitev	SD povprečnih vrednosti	KV (%)	Stabilnostna vrednost Normfinder®
<i>TBP</i>	0.42	0.099	23.87	0.070
<i>GUSB</i>	0.37	0.110	30.25	0.078
<i>GAPDH</i>	0.29	0.107	37.51	0.086
<i>ACTB</i>	0.37	0.222	60.70	0.187
<i>RPLP0</i>	0.51	0.229	44.84	0.193

Stabilnostni koeficienti so podani v preglednici XVI. Glede na vrednosti stabilnostnih koeficientov vidimo, da se geni *TBP*, *GUSB* in *GAPDH* izražajo konstantno in stabilno, medtem ko so vrednosti za *ACTB* in *RPLP0* višje in nakazujejo na njihovo manj stabilno izražanje. Naša predvidevanja o primernosti kandidatov za referenčne gene so se tako izkazala za pravilna.

Kljub temu, da se je včasih količina prepisane mRNA tarčnega gena normalizirala le na en referenčni gen, se danes zaradi nepričakovane variabilnosti v izražanju priporoča uporaba vsaj dveh referenčnih genov z neodvisno funkcijo v celičnem delovanju in relativno konstantnim razmerjem izražanja (48, 53).

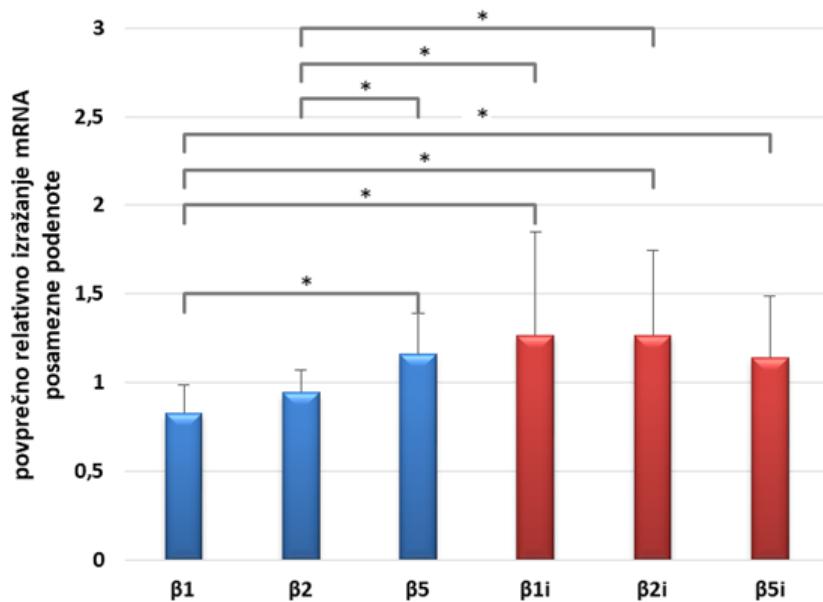
Glede na rezultate stabilnostnih vrednosti in splošna priporočila iz literature smo torej določili tri referenčne gene, na katere smo v nadaljevanju eksperimenta normalizirali izražanja tarčnih genov. To so *GUSB*, *GAPDH* in *TBP*, katerih stabilnostne vrednosti so bile najmanjše in primerljive.

4.2. ANALIZA IZRAŽANJA GENOV, KI KODIRajo KATALITIČNE PODENOTE IMUNOPROTEASOMA IN PROTEASOMA

V okviru naloge smo želeli določiti potencialne razlike v izražanju genov, ki kodirajo imunoproteasomske ($\beta 1i$, $\beta 2i$, in $\beta 5i$) in proteasomske ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$) podenote v celičnih linijah LCL. Z vrednotenjem stopnje izražanja genov smo nadalje želeli opredeliti posamezne celične linije kot modele za vrednotenje zaviralcev in interindividualnih razlik imunoproteasoma in proteasoma.

Celične linije LCL so pridobljene iz izoliranih limfocitov in transformirane z virusom Epstein Barr. Zanje smo se odločili, ker izvirajo iz različnih zdravih donorjev in ker lahko z njimi vrednotimo interindividualne razlike ter potencialno različne odzive na posamezne terapevtske pristope. Omogočajo nam, da jih preko identifikacije posameznega parametra izberemo kot ustrezni model za posamezne vrsto eksperimenta.

Z metodo qPCR smo na 39 celičnih linijah LCL analizirali izražanje šestih genov, ki kodirajo katalitične podenote proteasoma ($\beta 1/PSMB6$, $\beta 2/PSMB7$, $\beta 5/PSMB5$) in imunoproteasoma ($\beta 1i/PSMB9$, $\beta 2i/PSMB10$, $\beta 5i/PSMB8$). Rezultati povprečnega izražanja mRNA posamezne katalitične podenote so prikazani na sliki 10.



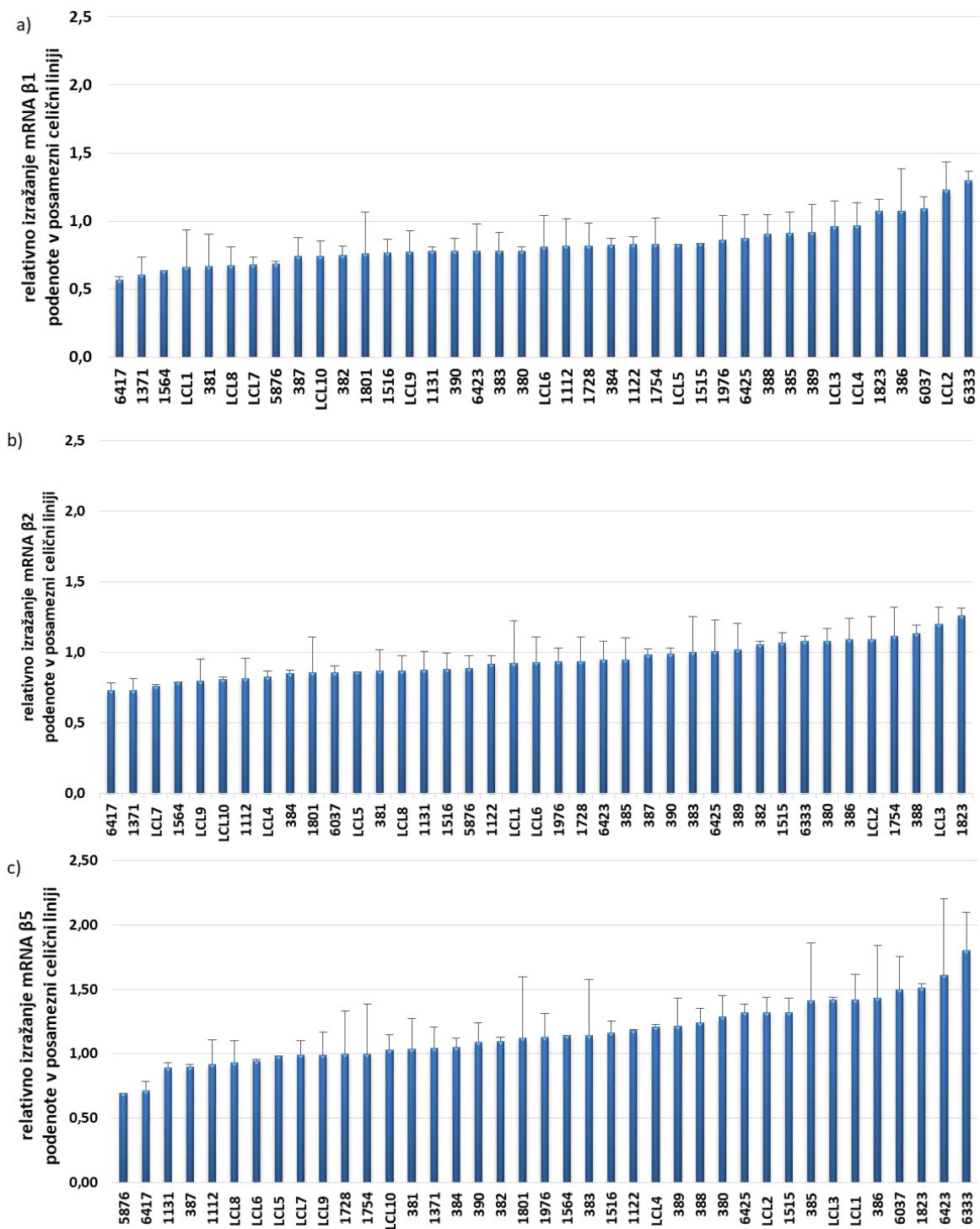
Slika 10: Prikaz povprečnega izražanja mRNA posameznih katalitičnih podenot imunoproteasoma in proteasoma v celotni preučevani populaciji LCL. Stolpiči prikazujejo povprečne vrednosti bioloških ponovitev mRNA posamezne podenote; intervali napak ponazarjajo SD povprečnih vrednosti; statistično značilne razlike so prikazane z * ($p<0,05$).

Opazimo primerljivo relativno izražanje genov, ki kodirajo za podenote $\beta 1$, $\beta 2$ in $\beta 5$ (0.829, 0.944 in 1.158), medtem ko so vrednosti pri genih, ki kodirajo $\beta 1i$ in $\beta 2i$ rahlo višje (1.266, 1.268). Relativno izražanje mRNA $\beta 5i$ je sicer večje od izražanja gena za podenoti $\beta 1$ in $\beta 2$, a manjše od $\beta 5$, $\beta 1i$ in $\beta 2i$, kar je nepričakovano, saj so naši celični modeli imunske celice, katere načeloma izražajo višjo bazalno raven imunoproteasomov (13, 55). Dokazali smo statistično značilne razlike med izražanjem genov, ki kodirajo proteasomske podenote $\beta 1$ in $\beta 5$ ter $\beta 2$ in $\beta 5$, medtem ko jih med izražanjem genov za imunoproteasomske podenote ni bilo. Povprečna vrednost izražanja genov, ki kodirajo podenoto $\beta 1$, je bila statistično značilno različna od vseh povprečnih vrednosti izražanja genov, ki kodirajo imunoproteasomske podenote, medtem ko je povprečna vrednost izražanja genov za podenoto $\beta 2$ statistično značilno različna le od izražanja genov za podenoti $\beta 1i$ in $\beta 2i$. Statistično značilnih razlik zaradi primerljivega povprečnega izražanja ni med podenoto $\beta 5$ in vsemi imunoproteasomskimi podenotami.

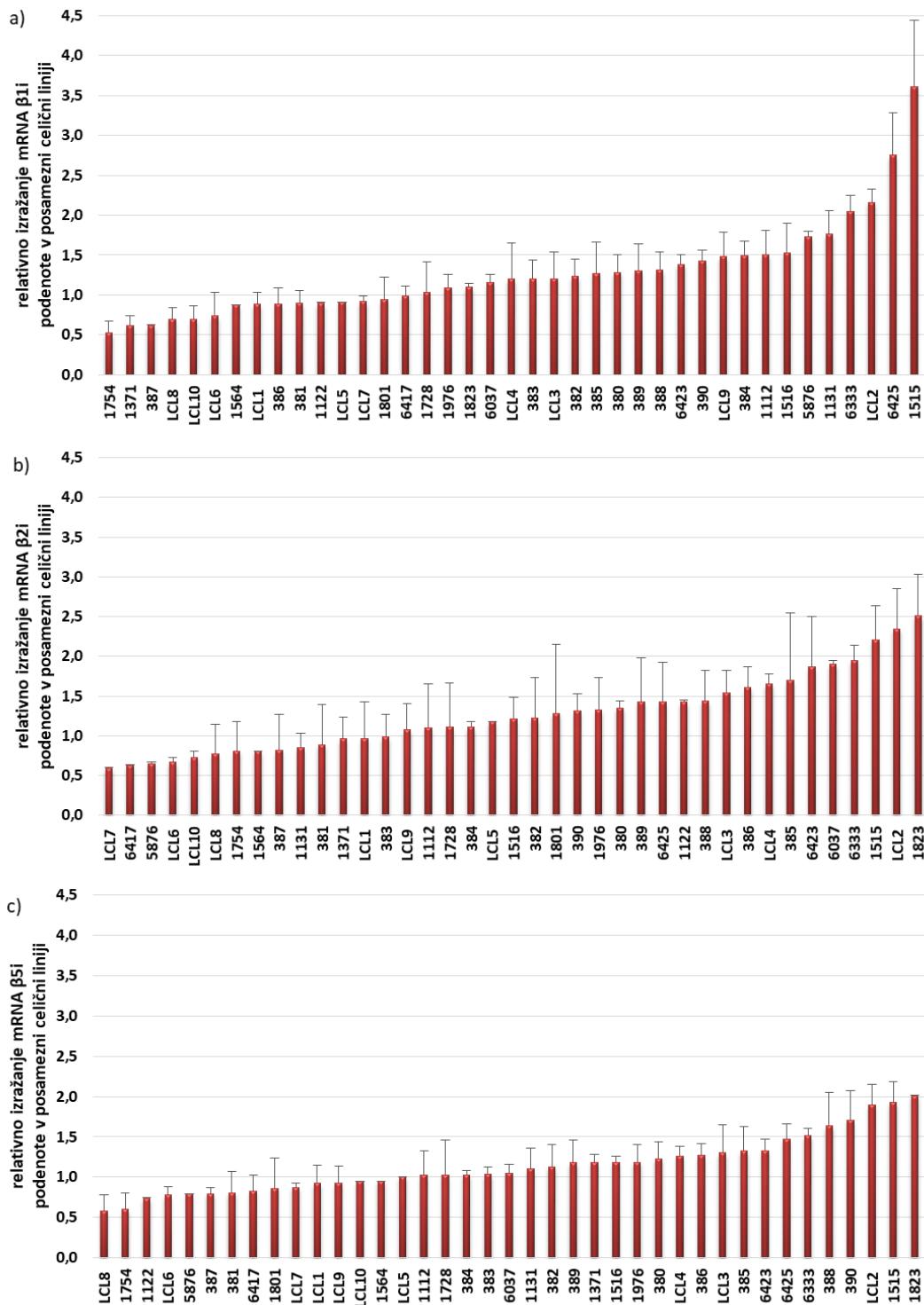
4.2.1. Krajne celične linije za posamezno podenoto

V nadaljevanju smo želeli identificirati tiste celične linije, ki predstavljajo krajne vrednosti za posamezno podenoto, kar smo ugotovili na podlagi izražanja genov za katalitične podenote v posamezni liniji LCL (sliki 11 in 12). Rezultati izražanja mRNA krajnih celičnih linij za posamezno podenoto so prikazani v preglednici XVII.

Kot krajne smo določili tri od 39 preučevanih celičnih linij. Identifikacija krajnih celičnih linij je pomembna v primeru, ko želimo postaviti model, preko katerega lahko preučujemo vpliv interindividualnih razlik in posledično odziv na posamezno učinkovino. S pomočjo tako postavljenih modelov lahko preverimo, ali se učinkovitost neke spojine, ki deluje na izbrano podenoto, razlikuje, če jo apliciramo na celice, ki višje izražajo tarčno podenoto kot na tiste z nižjim izražanjem oz. če prihaja do razlik v samem terapevtskem učinku glede na genetske značilnosti. Prav tako lahko preko teh modelov preverimo, kako njihova izpostavitev določenim snovem vpliva na izražanje genov za izbrane katalitične podenote imunoproteasoma/proteasoma glede na genetske značilnosti. Iz preglednice XVII lahko razberemo, da so nekatere celične linije kot krajne identificirane pri več podenotah.



Slika 11: Prikaz povprečnega izražanja genov, ki kodirajo proteasomske podenote. Stolpiči ponazarjajo povprečne vrednosti izražanja genov za podenote $\beta 1$ (a), $\beta 2$ (b) in $\beta 5$ (c) v celičnih linijah, intervali napak predstavljajo SD povprečnih vrednosti treh bioloških ponovitev. Na x osi so označene identifikacijske kode celičnih linij LCL.



Slika 12: Prikaz povprečnega izražanja genov, ki kodirajo imunoproteasomske podenote. Stolpiči ponazarjajo povprečne vrednosti izražanja genov za podenote $\beta 1i$ (a), $\beta 2i$ (b) in $\beta 5i$ (c) v celičnih linijah, intervali napak predstavljajo SD povprečnih vrednosti treh bioloških ponovitev. Na x osi so označene identifikacijske kode celičnih linij LCL.

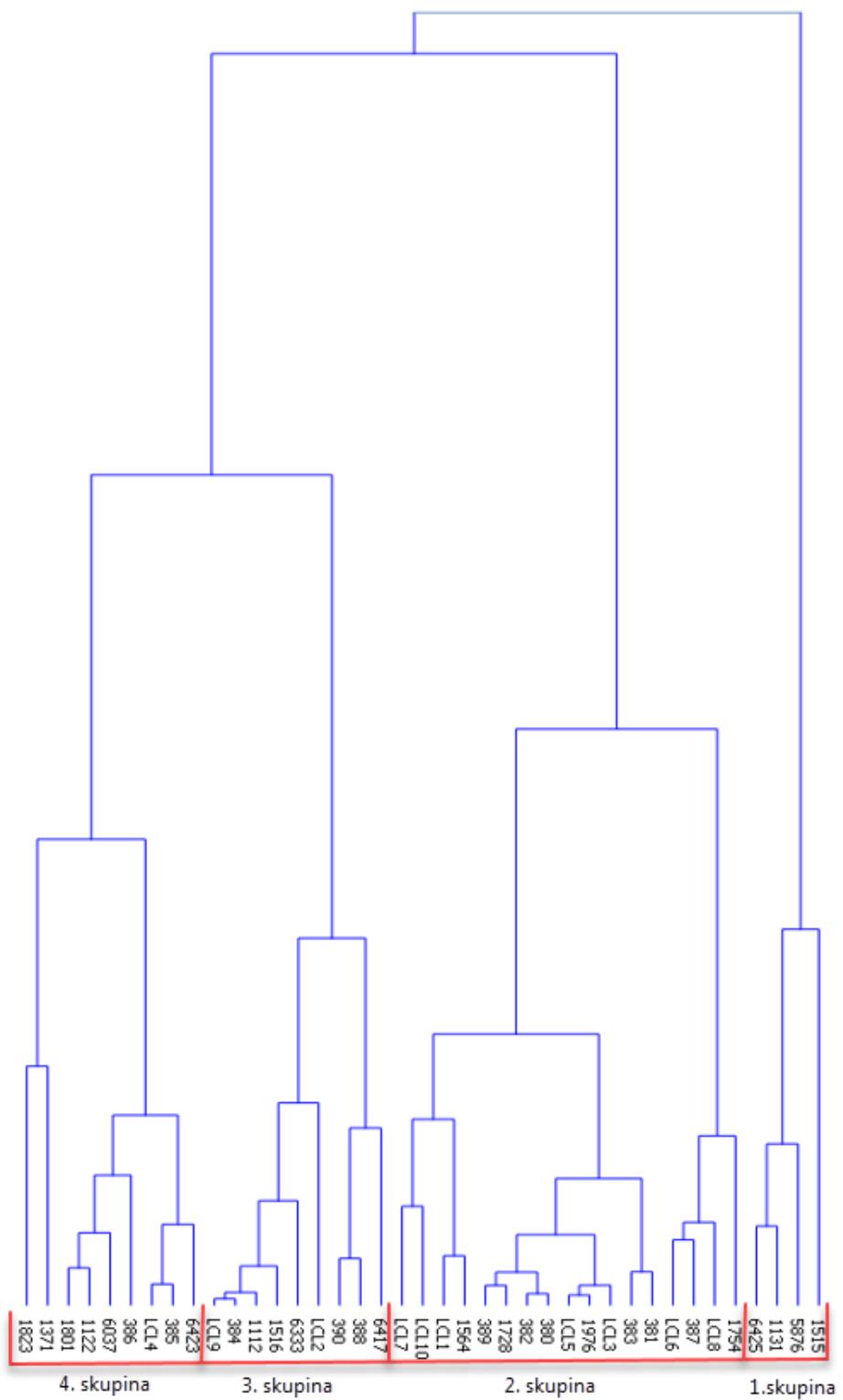
Preglednica XVII: Krajne celične linije z najnižjo in najvišjo stopnjo izražanja posamezne podenote. Statistično značilne razlike so označene z * ($p<0,05$)

Oznaka podenote	Celične linije z največjo stopnjo izražanja posamezne podenote		Celične linije z najnižjo stopnjo izražanja posamezne podenote		Razmerje med povprečno vrednostjo krajnih celičnih linij posamezne podenote
	Identifikacijska oznaka celične linije	Povprečje \pm SD	Identifikacijska oznaka celične linije	Povprečje \pm SD	
β1	6333 LCL2 6037	1,2 ± 0,09	6417 1371 1564	0,6 ± 0,03	2*
β2	1823 LCL3 388	1,2 ± 0,05	6417 1371 LCL7	0,74 ± 0,01	1,62*
β5	6333 6423 1823	1,64 ± 0,12	5876 6417 1131	0,76 ± 0,09	2,16*
β1i	1515 6425 LCL2	2,84 ± 0,59	1754 1371 387	0,58 ± 0,04	4,9*
β2i	1823 LCL2 1515	2,36 ± 0,12	LCL7 6417 5876	0,63 ± 0,02	3,7*
β5i	1823 1515 LCL2	1,94 ± 0,05	LCL8 1754 1122	0,64 ± 0,07	3*

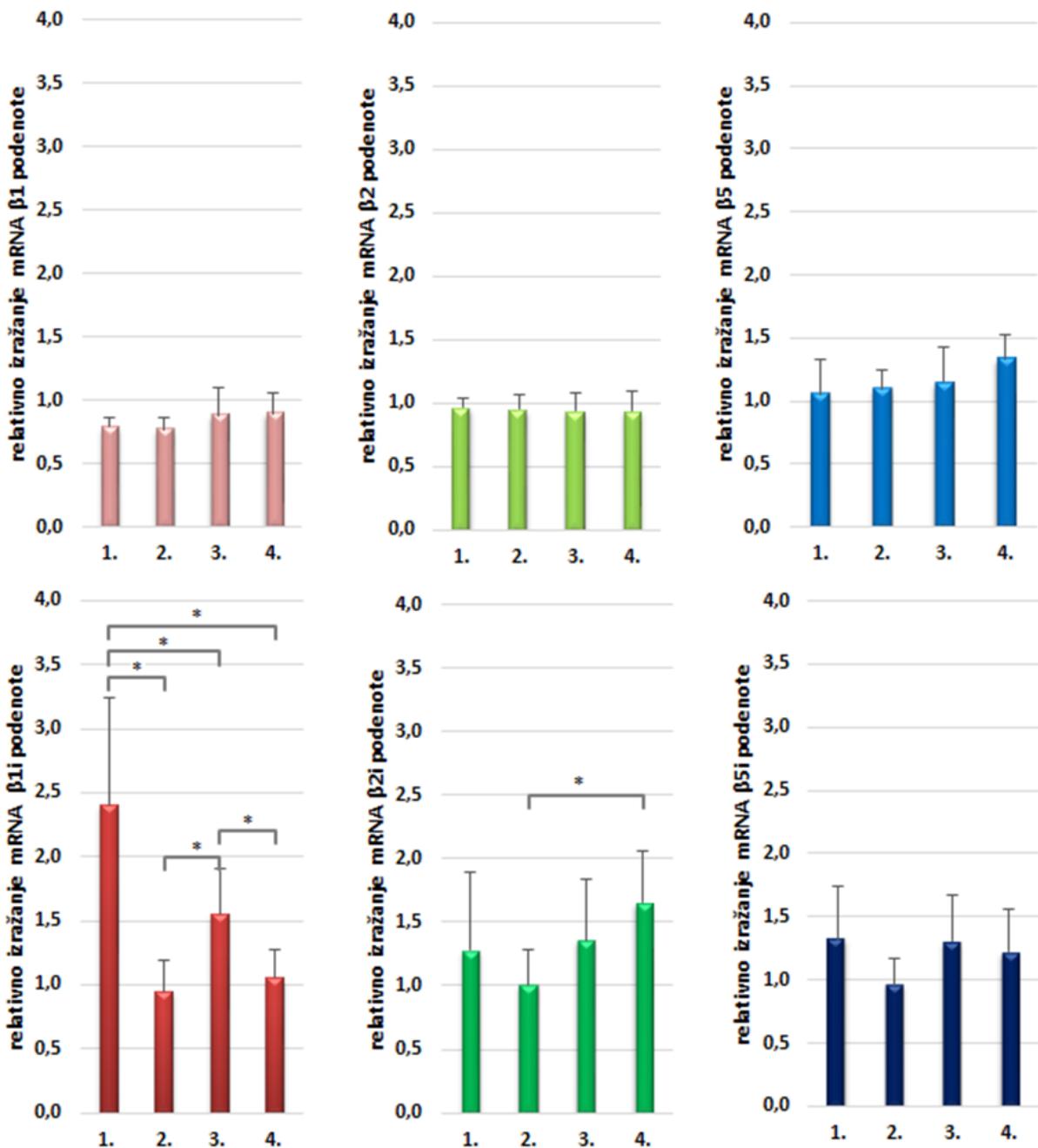
4.2.2. Opredelitev in razvrstitev celičnih linij LCL v skupine glede na skupne značilnosti

Individualni pregled izražanja genov za katalitične podenote nam omogoča vrednotenje le na podlagi posameznega opazovanega dejavnika. Tak pristop za bolj podrobno opredelitev morebitnih skupnih značilnosti na podlagi vseh proučevanih genov ni zadosten, saj je težko ovrednotiti tolikšno število podatkov. Zato smo v programu Orange izvedli analizo hierarhičnega razvrščanja v skupine. S tem smo pridobili vpogled v širšo sliko našega eksperimenta in celične linije opredelili glede na skupne značilnosti vzorcev na podlagi podobnosti izražanja vseh katalitičnih podenot imunoproteasoma in proteasoma (izražanje vseh šestih genov). Grafični prikaz rezultatov je prikazan na sliki 13. Celične linije, ki so s črto bližje povezane, izkazujejo večjo medsebojno podobnost. Na podlagi rezultatov tega hierarhičnega drevesa smo se odločili celotno populacijo razdeliti v štiri skupine in opredeliti njihove značilnosti. Na podlagi prikazane medsebojne razdalje bi celične linije lahko razvrstili v več skupin, vendar bi bile v tem primeru skupine premajhne za statistično vrednotenje.

Glede na to, da smo celične linije razvrstili v skupine glede na podobnost izražanja genov za vse katalitične podenote, lahko preko tega opredelimo njihovo sorodnost. Pričakujemo lahko, da bodo celične linije znotraj iste skupine prikazovale podobne odzive pri nadalnjem vrednotenju imunoproteasomskih katalitičnih podenot. Omenjeni pristop razvrščanja v skupine je potreben, če želimo celične linije uporabiti kot modele za vrednotenje pato/fizioloških lastnosti posamezne podenote ali vednotenje potencialnih novih zaviralcev. Zato smo preko grafične uprizoritve izražanja šestih proučevanih genov žeeli ugotoviti, kako se v posamezni skupini izraža določena podenota in kakšne so značilnosti posameznih skupin oz. kako se skupine razlikujejo med seboj (slika 14). Za vse skupine je značilno, da primerljivo izražajo proteasomske podenote, medtem ko se ključne razlike kažejo v izražanju imunoproteasomskih podenot. Tako je za prvo skupino značilno, da izraža v večjem obsegu gen za podenoto $\beta 1i$ in najmanj za podenoto $\beta 2i$, medtem ko pri četrti skupini zasledimo ravno obratno situacijo, poleg tega je izražanje gena za podenoto $\beta 2i$ v četrti skupini najvišje v primerjavi z drugimi skupinami. V drugi skupini se vse tri imunoproteasomske podenote izražajo primerljivo in v nizkem obsegu napram ostalim skupinam, medtem ko v tretji skupini vidimo ravno obratno t.j. izražanje genov za vse tri imunoproteasomske podenote je sicer primerljivo, a višje kot v drugi skupini, vendar posebnega izstopanja glede določene podenote v primerjavi z drugimi skupinami ni opaziti.



Slika 13: Rezultati razvrstitev celičnih linij v skupine po podobnosti glede na izražanje katalitičnih podenot proteasoma in imunoproteasoma s hierarhičnim razvrščanjem v programu Orange.



Slika 14: Prikaz povprečnega izražanja posameznega gena, ki kodira katalitične podenote v izbrani skupini. Stolpiči ponazarjajo povprečne vrednosti izražanja mRNA bioloških ponovitev posameznega gena znotraj skupine; x-os prikazuje skupine; intervali napak prikazujejo SD povprečnih vrednosti; statistično značilne razlike so prikazane z * ($p < 0,05$).

Najbolj izstopajoči skupini glede izražanja genov za imunoproteasomske podenote sta torej prva skupina z visokim izražanjem gena za podenoto β 1i in četrta skupina z visokim izražanjem gena za podenoto β 2i.

Za podenoto β 1i so ugotovili, da je njena povečana aktivnost prisotna pri mnogih patoloških procesih, zato je podenota postala zanimiva za preučevanje in predstavlja potencialno terapevtsko tarčo. V rakavih celicah nekaterih vrst tumorjev so ugotovili povišano prisotnost te podenote imunoproteasoma, zato so se študije usmerile v učinek zaviranja le-te na sam potek bolezni. Prva znana učinkovina s tovrstnim specifičnim zaviralnim delovanjem se imenuje UK-101. V nasprotju z nespecifičnimi proteasomskimi zaviralci, ki učinkujejo preko zaviranja NF- κ B poti, protitumorno delovanje UK-101 poteka preko NF- κ B neodvisne poti. V celični liniji PC-3 (pridobljene iz metastaz IV stopnje raka prostate) je zaviranje podenote β 1i povzročilo aktivacijo intrinzične in ekstrinzične poti apoptoze kot tudi akumulacijo poliubikvitinskih proteinov, kar se odraža v sprožanju procesa apoptoze in posledično zavrtju rasti tumorjev (56). Na podlagi naših izsledkov preučevanja celičnih linij prve skupine, ki izkazujejo izrazito povečanje gena, ki kodira podenoto β 1i, bi te celice lahko potencialno služile kot modelni sistem pri nadaljnji raziskavah vrednotenja tovrstnih specifičnih zaviralcev.

Uporabnost celic prve skupine ne bi omejili zgolj v raziskovalne namene vrednotenja zaviralcev v povezavi z rakavimi obolenji, temveč bi jo lahko razširili tudi na vrednotenje specifičnih zaviralcev kot terapevtski pristop za druga patološka stanja, pri katerih so odkrili povezave s podenoto β 1i. To so razne vnetne ali imunske bolezni, kot sta npr. Hashimotov in kronični tiroiditis. Kronično vnetje in sočasno povečano izražanje gena, ki kodira podenoto β 1i, povzročita povečano število ščitničnih onkocitov, ki jih povezujejo z nastankom omenjenih bolezni ščitnice. Raziskava, opravljena na miših z izbitim genom za podenoto β 1i, je pokazala zmanjšanje obsega vnetja in izboljšanje funkcije ščitnice v primerjavi z navadnimi mišmi (20, 57).

Celične linije četrte skupine bi lahko služile za ugotavljanje molekularne vloge imunoproteasomske podenote β 2i v celici in vrednotenje njenih specifičnih zaviralcev. Ta podenota je sicer v literaturi proučevana v veliko manjši meri kot npr. podenota β 5i, zato je njena vpleteneost biološke procese še dokaj neznana. V raziskavi, ki je bila opravljena na podganah z inducirano hipertenzijo, so preučevali vpliv podenote β 2i na nastanek srčne fibrose in vnetja. Rezultati so pokazali povečano izražanje omenjene podenote v srčnem tkivu, kar nakazuje njen vpleteneost pri patogenezi bolezni.

Slednje so potrdili na živalskih modelih z izbitim genom za podenoto β 2i, saj so pokazali da to vodi v zmanjšalno srčno fibrozo, vnetje in izražanje citokinovo (57). Posledično bi potencialno zaviranje podenote β 2i lahko predstavljal ustrezen terapevtski pristop za zdravljenje hipertenzivne srčne fibroze. Tej podenoti pripisujejo tudi pomembno biološko funkcijo pri nadziranju celične rasti in preživetja pri difuznem velikoceličnim B limfomom, kar zopet predstavlja potencial za ciljano terapijo (62).

Pogosto oviro pri razvoju in začetnih presejalnih testih potencialnih novih učinkovin, ki delujejo na proteasomske in imunoproteasomske podenote, velikokrat predstavlja pomanjkanje enostavnih celičnih modelov. Določene primarne celice je težko izolirati iz tkiv zaradi njihove narave in lokacije, pri redkih bolezni pa je izliv pridobiti dovolj veliko populacijo, na kateri bi se študije lahko izvedle. Poleg tega lahko velika variabilnost v genetskih in epigenetskih značilnosti pri pacientih s specifičnimi boleznimi vpliva na rezultate študij, ki niso opravljene na dovolj veliki populaciji (58). Zato se kaže potreba po postavitvi velikega števila dobro okarakteriziranih in dostopnih celic, ki bi jih pridobili tako iz zdravih oseb kot tudi iz pacientov. Tako postavljen model bi prispeval k hitrejšemu razvoju potencialnih terapeutikov in preučevanju molekularnih vlog. S tega vidika bi bila uporaba celičnih linij LCL za vrednotenje specifičnih zaviralcev ustrezena, saj zajema variabilnost med posamezniki in omogoča pripravo velikega nabora linij, ki ponazarjajo večjo populacijo, sama metoda priprave linij pa je relativno enostavna in neinvazivna.

Nadalje bi lahko preko takoj postavljenih celičnih modelov preverjali, ali z zavirci vplivamo na določene parametre, ki dokazano korelirajo s potekom specifične bolezni. Ti parametri so nekakšni biomarkerji in lahko predstavljajo sproščanje določenih citokinov, izražanje specifičnih genov, proliferacijo določenih celic ipd. V primeru da specifični citokini dokazano korelirajo z določeno bolezensko sliko, bi lahko na celičnem nivoju preverili, ali z modifikacijo imunoproteasoma oz. zaviranjem določene imunoproteasomske podenote dosežemo znižanje sproščanja citokinov. Na podlagi farmakološkega odziva delovanja zaviralca *in vitro* bi tako lahko sklepali na ustreznost uporabe zaviralca pri določenih osebah oziroma bolezenskih stanjih.

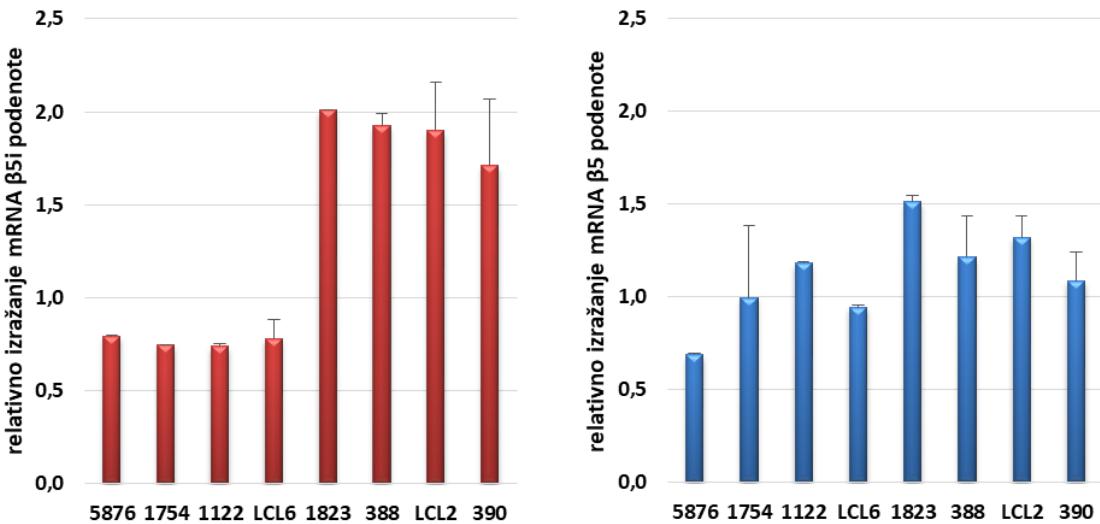
4.3. ANALIZA ENCIMSKE KIMOTRIPSINU PODOBNE AKTIVNOSTI PODENOT β 5 IN β 5i

Izsledki eksperimentalnega dela se navezujejo na izražanje genov na nivoju mRNA, na katerega ima največji vpliv genetsko ozadje posamezne celične linije. Iz samega izražanja določenega gena še ne moremo zagotovo sklepati na koncentracijo ali aktivnost funkcionalnega proteina. Višje izražanje določenega gena sicer nakazuje na povišano izražanje proteina, ki ga kodira, vendar zaradi kompleksnosti biološkega procesa tega ne moremo zagotovo trditi. Pri prenosu informacij od DNA do sinteze funkcionalnega proteina je udeleženih več stopenj, preko katerih poteka uravnavanje in kjer lahko iščemo vzroke za morebitno nizko aktivnosti proteina kljub povečanemu izražanju genov, ki kodirajo določeno podenoto. V tem primeru lahko pomislimo na napake na stopnji transkripcije, zorenja mRNA, translacije, post-translacijskih procesov proteina ali njegove razgradnje. Za potrditev naših predvidevanj o uporabnosti celičnih linij posameznih skupin je zato potrebno preučiti še encimsko aktivnost posamezne podenote in primerjati njihovo korelacijo z izražanjem genov.

Podenota β 5i je ena bolj preučevanih podenot imunoproteasoma in posledično jo tudi na Fakulteti za farmacijo najbolj vrednotijo. To in dejstvo, da smo se soočali s pomanjkanjem specifičnih substratov za ostale podenote proteasoma in imunoproteasoma, je prispevalo k odločitvi, da preverimo encimsko aktivnost le osmim celičnim linijam, pri katerih smo ugotovili najvišjo in najnižjo stopnjo izražanja β 5i kodirajočega gena. Preko tega smo želeli ugotoviti, kako povečano/zmanjšano izražanje gena za podenoto β 5i sovpada s povečano/zmanjšano aktivnostjo proteina.

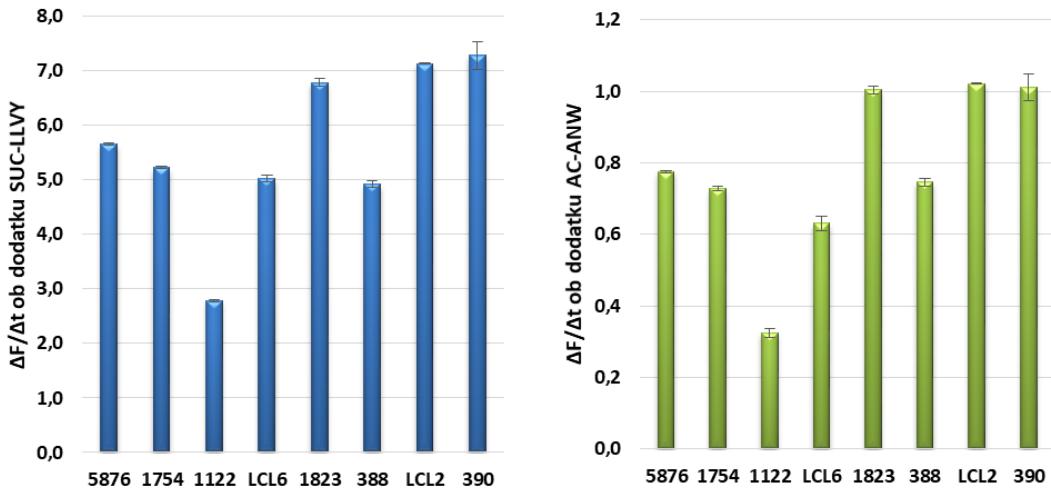
Pri eksperimentu smo uporabili dva substrata: Suc-LLVY-AMC, ki ga cepijo tako proteasomske kot imunoproteasomske podenote β 5 in β 5i ter Ac-ANW-AMC, ki je selektiven za aktivno mesto imunoproteasomske podenote β 5i.

Celične linije 5876, 1754, 1122 in LCL6 smo opredelili kot krajne celične linije z najnižjim izražanjem gena (slika 15), ki kodira podenoto β 5i. Pri njih smo posledično pričakovali nizko encimsko aktivnost. Nasprotno pa smo pri celičnih linijah 1823, 388, LCL2 in 390, ki smo jih identificirali kot krajne celične linije z najvišjim izražanjem gena omenjene podenote, pričakovali višjo encimsko aktivnost. Povprečno izražanje gena za podenoto β 5i pri celičnih linijah, ki izkazujejo višje izražanje tega gena, je 2,5-krat više kot povprečno izražanje gena za isto podenoto pri celičnih linijah 5876, 1754, 1122 in LCL6.



Slika 15: Prikaz povprečnega izražanja mRNA podenot $\beta 5i$ (leva slika) in $\beta 5$ (desna slika) osmih celičnih linij, ki smo jih opredelili kot krajne za podenoto $\beta 5i$. Intervali napak predstavljajo SD povprečnega izražanja treh bioloških ponovitev.

Iz grafičnih rezultatov, ki so predstavljeni na sliki 16, lahko sicer opazimo trend, da imajo celične linije, ki višje izražajo gen za podenoto $\beta 5i$, tudi višjo katalitično aktivnost, medtem ko imajo celične linije z nižjim izražanjem gena za isto podenoto, nižjo katalitično aktivnost, čeprav je bila razlika le mejno statistično značilna ($p = 0,057$).



Slika 16: Prikaz encimske aktivnosti po dodatku substratov Suc-LLVY-AMC in Ac-ANW-AMC; stolpiči prikazujejo encimsko aktivnost po dodatku substrata, x os ponazarja celične linije, ki smo jih glede na njihovo izražanje podenote $\beta 5i$ opredelili kot krajne, intervali napak predstavljajo SD povprečnega izražanja bioloških ponovitev

Celično linijo 388 smo opredelili kot eno izmed krajnih celic z najvišjo stopnjo izražanja gena za podenoto β 5i, vendar je izmerjena aktivnost same podenote nižja v primerjavi z aktivnostmi, ki smo jih izmerili na preostalih treh krajnih celičnih linijah z najvišjim izražanjem. Njena aktivnost je na nivoju encimske aktivnosti celičnih linij, ki izkazujejo najmanjšo stopnjo izražanje podenote β 5i.

Nizko vrednost encimske aktivnosti opazimo tudi pri celični liniji 1122, ki je 2,2-krat nižja od povprečja encimske aktivnosti celičnih linij 5876, 1754 in LCL6, čeprav je izražanje podenote β 5i pri vseh štirih celičnih linijah primerljivo (slika 15). Za opažana odstopanja je možnih več vzrokov.

Pri prenosu informacij od DNA do proteina je več stopenj in napake se lahko pojavijo že v zgodnjih fazah sinteze proteinov. Sam proces translacije, kjer pride do prepisa RNA baz v zapis za proteinsko molekulo, je zapleten proces, ki zahteva ustrezno in pravilno izvedeno iniciacijo, elongacijo in terminacijo. V nasprotnem primeru lahko pride do izgradnje nepravilnega ali poškodovanega proteina s posledično zmanjšano encimsko aktivnostjo. Celoten proces tudi določa primarno strukturo proteina oz. aminokislinsko zaporedje. Ta določa končno terciarno strukturo in s tem funkcionalnost proteina. Novo-sintetizirani proteini namreč še niso v biološko aktivni obliki in se morajo po sintezi zviti v nativno konformacijo. Neustrezno aminokislinsko zaporedje lahko torej privede do neustreznega zvitja proteinov in posledično manjše encimske aktivnosti (58).

Manjša katalitična aktivnost je lahko posledica tudi drugih dejavnikov, ki ne izvirajo iz genetskih sprememb. To vključuje na primer prisotnost utiševalne RNA (siRNA), ki lahko zavre prepis in zniža samo sintezo proteina, kljub začetno prisotnemu signalu za povišan prepis genov. Nižja aktivnost je prav tako lahko posledica v napakah pri sami izgradnji imunoproteasoma in delovanja nekaterih ostalih faktorjev, ki vplivajo na funkcionalnost proteina. Že komaj zaznavne spremembe v strukturi, ki se zgodijo na enem mestu, se lahko prenesejo na oddaljene dele v proteinu, kar lahko sproži spremembe v strukturi celotnega imunoproteasoma in tudi spremembe v njegovi encimski reaktivnosti.

Glede na višje izražanje gena, ki kodira podenoto β 5i in posledično višjo encimsko aktivnost, imajo celične linije 1823, LCL2 in 390 potencial pri vrednotenju učinkovitosti β 5i zaviralcev. Celice z nizko encimsko aktivnostjo pa lahko služijo za nadaljnje raziskave primerjav fenotipov, vrednotenja specifičnosti zaviralcev ali pa vrednotenja vloge podenote β 5i.

S pomočjo občutljive tehnike qPCR lahko dobro ovrednotimo izražanje posameznih genov pri posamezniku, vendar to razkriva šele začetek zelo kompleksnega biološkega sistema, katerega končni rezultati so odvisni od mnogih pravilno izvedenih vmesnih stopenj in številnih soodvisnih dejavnikov. V nalogi smo v 39 celičnih linijah LCL, pridobljenih iz zdravih prostovoljcev, okarakterizirali izražanje genov, ki kodirajo imunoproteasomske in proteasomske katalitične podenote. Iz zgornjih grafov je razvidno, da se ti geni izražajo zelo raznoliko, kar je še bolj izrazito pri genih, ki kodirajo podenote $\beta 5i$, $\beta 1i$ in $\beta 2i$. To sicer nakazuje na veliko biološko variabilnost, ne smemo pa zanemariti morebitnega vpliva metodologije. Velike razlike v izražanju med posameznimi biološkimi ponovitvami so lahko posledice tega, da so se celične linije v času transformacije z EB virusom nahajale v različnih razvojnih stopnjah diferenciacije, nekaj pa lahko k temu doprinese tudi sam virus.

Na primeru celične linije 388 vidimo, da povečano izražanje ni vedno sorazmerno s povečano aktivnostjo. Kot omenjeno, smo pri primerjavi skupine celičnih linij z nizkim in tiste z visokim izražanjem gena za podenoto $\beta 5i$ sicer lahko opazili razliko v katalitični aktivnosti, vendar je bila ta le mejno statistično značilna, kar je verjetno tudi posledica majhnega vzorca, ki ni reprezentativen. Trend sicer nakazuje večjo aktivnost, vendar bi bilo potrebno za potrditev korelacije analizirati večje število celičnih linij, s čimer bi dobili bolj reprezentativno velikost populacije za statistično vrednotenje. Poleg tega bi bilo smiselno izmeriti nivo izražanja proteina kot tudi katalitično aktivnost vseh preučevanih podenot, s čimer bi dobili boljši vpogled v samo aktivnost proteasoma in imunoproteasoma ter primernost posameznih celičnih linij za nadaljnje raziskave.

5. SKLEP

V sklopu naloge smo okarakterizirali humane celične linije LCL na osnovi njihovega izražanja genov, ki kodirajo katalitične podenote imunoproteasoma ($\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$) in proteasoma ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$). Najprej smo določili ustrezne referenčne gene, temu pa je sledila analiza izražanja tarčnih genov. Zaključki same analize podatkov so sledeči:

- Na podlagi izražanja petih referenčnih genov, standardne deviacije in koeficiente variacije, smo s pomočjo programa Normfinder identificirali tri gene, ki so izkazovali najstabilnejše izražanje v celicah LCL: *TBP*, *GUSB* in *GAPDH*. Izbera primernih referenčnih genov je predstavljala nujno potreben korak, saj smo z njihovo pomočjo normalizirali količino mRNA med posameznimi vzorci in s to korekcijo zmanjšali morebitne variacije med tarčnimi geni, ki se lahko pojavijo tekom izvedbe eksperimenta.
- Celične linije na podlagi rezultatov analize hierarhičnega razvrščanja v programu Orange smo razdelili v štiri skupine glede na skupne značilnosti izražanja genov, ki kodirajo katalitične podenote imunoproteasoma in proteasoma. Preko tega lahko opredelimo njihovo sorodnost in posledično pričakujemo podobne odzive celičnih linij znotraj skupine pri morebitnem nadalnjem vrednotenju v primeru, da bi jih uporabili kot modele za vrednotenje fizioloških lastnosti posamezne podenote ali vrednotenje novih zaviralcev.
- Največje razlike v izražanju mRNA opazimo pri imunoproteasomskih podenotah, medtem ko se proteasomske podenote izražajo primerljivo. Izstopajoči skupini celičnih linij z vidika izražanja imunoproteasomskih podenot sta prva skupina, ki najvišje izraža gen za podenoto $\beta 1i$ in četrta skupina z najvišjim izražanjem gena za podenoto $\beta 2i$. Razlike v izražanju podenot nakazujejo na njihovo potencialno uporabo kot modelni sistem pri raziskavah vrednotenja specifičnih imunoproteasomskih zaviralcev, ki bo omogočal proučevanje dejavnika interindividualne variabilnosti.

6. LITERATURA

1. Yewdell JW: Immunoproteasomes: regulating the regulator. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 2005; 102 (26): 9089–9090.
2. Hjerpe R, Rodriguez M: Alternative UPS drug targets upstream the 26S proteasome. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 1126–1140.
3. Miller Z, Ao L, Bo Kim K, Lee W: Inhibitors of the immunoproteasome: current status and future directions. *Curr Pharm Des* 2013; 19 (22): 4140–4151.
4. Chen Y-J, Wu H, Shen X-Z: The ubiquitin–proteasome system and its potential application in hepatocellular carcinoma therapy. *Cancer Lett* 2016; 379 (2): 245–252.
5. Gallastegui N, Groll M: The 26S proteasome: assembly and function of a destructive machine. *Trends Biochem Sci* 2010; 35 (11): 634–642.
6. McDowell GS, Philpott A: Non-canonical ubiquitylation: Mechanisms and consequences. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; 45 (8): 1833–1842.
7. Hegde AN, Upadhyaya SC: The ubiquitin–proteasome pathway in health and disease of the nervous system. *Trends Neurosci* 2007; 30 (11): 587–595.
8. Lee W, Kim KB: The Immunoproteasome: An emerging Therapeutic target. *Curr Top in Med Chem* 2011; 11: 2923-2930.
9. Skaar JR, Pagano M: Control of cell growth by the SCF and APC/C ubiquitin ligases. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21: 816–824.
10. Groll M, Berkers CR, Ploegh HL, Ova H: Crystal Structure of the Boronic Acid-Based Proteasome Inhibitor Bortezomib in Complex with the Yeast 20S Proteasome. *Structure* 2006; 14: 451–456.
11. Mishto M, Bellavista E, Santoro A, Stolzing A, Ligorio C, Nacmias B, Spazzafumo L, Chiappelli M, Licastro F, Sorbi S, Pession A, Ohm T, Grune T, Franceschi C: Immunoproteasome and LMP2 polymorphism in aged and Alzheimer's disease brains. *Neurobiol Aging* 2006; 27: 54–66.

12. Dahlmann B, Ruppert T, Kuehn L, Merforth S, Kloetzel P-M: Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymatic properties. *J Mol Biol.* 2000; 303: 643–653.
13. McCarthy MK, Weinberg JB: The immunoproteasome and viral infection: a complex regulator of inflammation. *Front Microbiol* 2015; 6: 21
14. Aghdam SY, Sheibani N: The ubiquitin-proteasome system and microvascular complications of diabetes. *J Ophthalmic Vis Res* 2013; 8: 244-256.
15. De M, Jayarapu K, Elenich L, Monaco J. J, Colbert R. A, Griffin T. A.: β 2 Subunit Propeptides Influence Cooperative Proteasome Assembly. *J Biol Chem* 2003; 278: 6153–6159.
16. Eleftheriadis T: The existence of two types of proteasome, the constitutive proteasome and the immunoproteasome, may serve as another layer of protection against autoimmunity. *Med Hypotheses* 2012; 78: 138–141.
17. Seifert U, Bialy LP, Ebstein F, Bech-Otschir D, Voigt A, Schröter F, Lange N, Steffen J, Rieger M, Kuckelkorn U, Aktas O, Kloetzel PM, Krüger E: Immunoproteasomes Preserve Protein Homeostasis upon Interferon-Induced Oxidative Stress. *Cell* 2010; 142: 613–624.
18. Li J, Basler M, Alvarez G, Brunner T, Kirk CJ, Groettrup M: Immunoproteasome inhibition prevents chronic antibody-mediated allograft rejection in renal transplantation. *Kidney Int* 2018; 93: 670-680.
19. Tacchi L, Misra M, Salinas I: Anti-viral immune responses in a primitive lung: Characterization and expression analysis of interferon-inducible immunoproteasome subunits LMP2, LMP7 and MECL-1 in a sarcopterygian fish, the Nigerian spotted lungfish (*Protopterus dolloi*). *Dev Comp Immunol* 2013; 41: 657–665.
20. Kimura H, Caturegli P, Takahashi M, Suzuki K: New Insights into the Function of the Immunoproteasome in Immune and Nonimmune Cells. *J Immunol Res* 2015; 2015: 541984.
21. Ferrington DA, Gregerson DS: Immunoproteasomes: structure, function and antigen presentation. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 2012; 109: 75–112.

22. Tanaka K, Kasahara M: The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-4gMY-inducible proteasome activator PA28. *Immunol Rev* 1998; 163: 161–176.
23. Driscoll J, Brown MG, Finley D, Monaco JJ: MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome. *Nature* 1993; 365: 262-264.
24. Zhou F: Molecular Mechanisms of IFN- γ to Up-Regulate MHC Class I Antigen Processing and Presentation. *Int Rev Immunol* 2009; 28: 239–260.
25. Schoenborn JR, Wilson CB: Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* 2007; 96: 41-101.
26. Chatterjee-Kishore M, Wright KL, Ting JP, Stark GR: How stat1 mediates constitutive gene expression. *The EMBO Journal* 2009; 19: 4111-4112.
27. Krüger E, Kloetzel PM: Immunoproteasomes at the interface of innate and adaptive immune responses: two faces of one enzyme. *Curr Opin Immunol* 2012; 24: 77–83.
28. Yang Y: Generation of major histocompatibility complex class I antigens. *Microbes and Infection* 2003; 5: 39–47.
29. Hang LY, Lieu PT, Peterson PA, Yang Y: Functional regulation of immunoproteasomes and transport associate with antigen processing. *Immunologic Research* 2001; 24, 245-272.
30. Basler M, Kirk CJ, Groettrup M: The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions. *Curr Opin Immunol* 2013; 25: 74–80.
31. Heemels M, Ploegh H: Generation, translocation and presentation of MHC classI-restricted peptides. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 463-491.
32. Monaco JJ, Nandi D: The genetics of proteasomes and antigen processing. *Annu Rev Genet* 1995; 29: 729–754.
33. Basler M, Mundt S, Bitzer A, Schmidt C, Groettrup M: The immunoproteasome: a novel drug target for autoimmune diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2015; 33: 74–79.
34. Basler M, Dajee M, Moll C, Groettrup M, Kirk CJ: Prevention of Experimental Colitis by a selective Inhibitor of the immunoproteasome. *J Immunol* 2010; 185: 634–641.

35. Nagayama Y, Nakahara M, Shimamura M, Horie I, Arima K, Abiru N: Prophylactic and therapeutic efficacies of a selective inhibitor of the immunoproteasome for Hashimoto's thyroiditis, but not for Graves' hyperthyroidism, in mice. *Clin Exp Immunol* 2012; 168: 268–273.
36. Basler M, Mundt S, Muchamuel T, Moll C, Jiang J, Groettrup M, Kirk CJ: Inhibition of the immunoproteasome ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *EMBO Mol Med* 2014; 6: 226-238.
37. Bellavista E, Andreoli F, Parenti MC, Martucci M, Santoro A, Salvioli S, Capri M, Baruzzi A, Del Rio A, Franceschi C, Mishto M: Immunoproteasome in Cancer and Neuropathologies: A new Therapeutic Target? *Current Pharmaceutical Design* 2013; 19: 702-718.
38. Ettari R, Zappalà M, Grasso S, Musolino C, Innao V, Allegra A: Immunoproteasome-selective and non-selective inhibitors: A promising approach for the treatment of multiple myeloma. *Pharmacol Ther* 2018; 182: 176-192
39. Wehenkel M, Ban JO, Ho YK, Carmony KC, Hong JT, Kim KB: A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP2 induces apoptosis in PC-3 cells and suppresses tumour growth in nude mice. *Br J Cancer* 2012; 107: 53–62.
40. Kisseelev AF, Groettrup M: Subunit specific inhibitors of proteasomes and their potential for immunomodulation. *Curr Opin Chem Biol* 2014; 23: 16–22.
41. Hussain T, Mulherkar R: Lymphoblastoid Cell lines: a Continuous in Vitro Source of Cells to Study Carcinogen Sensitivity and DNA Repair. *Int J Mol Cell Med* 2012; 1: 75–87.
42. Marković T, Gobec M, Gurwitz D, Mlinarić-Raščan I: Characterization of human lymphoblastoid cell lines as a novel in vitro test system to predict the immunotoxicity of xenobiotics. *Toxicol Lett* 2015; 233: 8–15.
43. Zhang Z, Liu J, Kraur M, Krantz ID: Characterization of DNA methylation and its association with other biological systems in LCL cells. *Genomics* 2012; 99: 209-219.
44. Wroblewski JM, Copple A, Batson LP, Landers CD, Yannelli JR: Cell surface phenotyping and cytokine production of Epstein–Barr virus (EBV)-transformed lymphoblastoid cell lines (LCLs). *J Immunol Methods* 2002; 264: 19–28.

45. Schefe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H: Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel ‘gene expression’s C T difference’ formula. *J Mol Med* 2006; 84: 901–910.
46. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT: The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem* 2009; 55, 611–622.
47. Postollec F, Falentin H, Pavan S, Combrisson J, Sohier D: Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiol* 2011; 28: 848–861.
48. De Boever S, Vangestel C, De Backer P, Croubels S, Sys SU: Identification and validation of housekeeping genes as internal control for gene expression in an intravenous LPS inflammation model in chickens. *Vet Immunol Immunopathol* 2008; 122: 312–317.
49. Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL: Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol Biol* 2006; 7: 33.
50. Jarczak J, Kaba J, Bagnicka E: The validation of housekeeping genes as a reference in quantitative Real Time PCR analysis. *Gene* 2014; 549, 280–285.
51. Eisenberg E, Levanon EY: Human housekeeping genes, revisited. *Trends Genet* 2013; 29: 569–574.
52. Hamalainen HK, Tubman JC, Vikman S, Kyrölä T, Ylikoski E, Warrington JA, Lahesmaa R: Identification and Validation of Endogenous Reference Genes for Expression Profiling of T Helper Cell Differentiation by Quantitative Real-Time RT-PCR. *Anal Biochem* 2001; 299: 63–70.
53. Bär M, Bär D, Lehmann B: Selection and Validation of Candidate Housekeeping Genes for Studies of Human Keratinocytes—Review and Recommendations. *J Invest Dermatol*: 129: 535–537.
54. Frisan T, Levitsky V, Masucci MG: Variations in proteasome subunit composition and enzymatic activity in B-lymphoma lines and normal B cells. *International Journal of Cancer* 2000; 88: 881–888.

55. Wehenkel M, Ban JO, Ho YK, Carmony KC, Hong JT, Kim KB: A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP2 induces apoptosis in PC-3 cells and suppresses tumour growth in nude mice. *Br J Cancer* 2012; 107: 53–62.
56. Kimura HJ, Chen CY, Tzou SC, Rocchi R, Landek-Salgado MA, Suzuki K, Kimura M, Rose NR, Caturegli P: Immunoproteasome Overexpression Underlies the Pathogenesis of Thyroid Oncocytes and Primary Hypothyroidism: Studies in Humans and Mice. *PLoS One* 2009; 4: e7857.
57. Yan, W, Bi HL, Liu LX, Li NN, Liu Y, Du J, Wang HX, Li HH: Knockout of immunoproteasome subunit β 2i ameliorates cardiac fibrosis and inflammation in DOCA/Salt hypertensive mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 490: 84-90.
58. Jones TI, Himeda CL, Perez DP, Jones PL: Large family cohorts of lymphoblastoid cells provide a new cellular model for investigating facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 2017; 27: 221–238.
59. Ubiquitin and Proteasome Research [internet]. [citirano 2017 jul 02]. Pridobljeno na: <https://www.biomol.com/ubiquitin-and-proteasome-research.html?id=1374>
60. Boyer R: Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 349-351
61. What is Real-Time PCR (qPCR)? [internet]. [citirano 2017 jul 04]. Pridobljeno na: <http://www.bio-rad.com/en-us/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr>
62. Pham LV, Rollo A, Tamayo AT, Lee J, Zuo Z, Sun L, Zhang L, Ou Z, Fayad LE, Wang M, Ford RJ: Biological significance of the immunoproteasome subunits Mecl-1 and LMP-2 in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2012; 120: 2717