

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA VOZELJ

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA VOZELJ

**ANALIZA IZRAŽANJA KATALITIČNO AKTIVNIH
PROTEASOMSKIH PODENOT V LIMFOBLASTOIDNIH
CELIČNIH LINIJAH NA NIVOJU DOLOČANJA PROTEINOV**

**THE ANALYSIS OF PROTEIN LEVELS OF THE PROTEASOME
CATALYTICALLY ACTIVE SUBUNITS IN LYMPHOBLASTOID
CELL LINES**

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo 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

Za vse strokovne nasvete, potrpežljivost in spodbudo pri nastajanju magistrske naloge se zahvaljujem mentorici doc. dr. Martini Gobec, mag. farm. in somentorici asist. dr. Alenki Šmid, mag. farm.

Zahvaljujem se tudi prijateljem in vsem mojim najbližjim, ker so verjeli vame in me med celotnim študijem podpirali. Posebna zahvala gre partnerju, hčerki in sinu, ki so bili pripravljeni potrpeti ves tisti čas, ki sem ga v preteklih letih morala nameniti študiju.

Izjava

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

Katja Vozelj

Ljubljana, 2018

VSEBINA

VSEBINA.....	I
SLIKOVNO KAZALO	III
KAZALO PREGLEDNIC.....	III
POVZETEK	IV
ABSTRACT	V
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VI
1. UVOD	1
1.1. UBIKVITIN-PROTEASOMSKA POT	1
1.2. ZGRADBA PROTEASOMA IN IMUNOPROTEASOMA.....	2
1.2.1. 20S proteasom.....	2
1.2.2. Regulatorni kompleksi	4
1.3. BIOLOŠKA VLOGA PROTEASOMOV	5
1.3.1. Oksidativni stres.....	5
1.3.2. Antigenska predstavitev	5
1.3.3. Signalna pot jedrnega dejavnika κB (NF- κB) in proteasom.....	6
1.3.4. Virusne infekcije	7
1.3.5. Avtoimunske bolezni	8
1.3.6. Maligna obolenja	10
1.3.7. Nevrodegenerativne bolezni	11
1.4. ZAVIRALCI PROTEASOMOV	12
1.5. LIMFOBLASTOIDNE CELIČNE LINIJE (LCL).....	14
2. NAMEN	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1. MATERIALI	17
3.1.1. Reagenti	17
3.1.2. Laboratorijska oprema	18
3.1.3. Raztopine	19
3.1.4. Protitelesa.....	20
3.1.5. Celične linije	21
3.2. METODE.....	22
3.2.1. Gojenje celičnih kultur.....	22

3.2.1.1. Odmrzovanje celic	22
3.2.1.2. Gojenje celic	22
3.2.1.3. Štetje celic	22
3.2.2. Liza celic in izolacija proteinov	23
3.2.3. Določanje koncentracije proteinov (DC metoda)	23
3.2.4. Ločevanje proteinov z denaturacijsko poliakrilamidno gelsko elektroforezo (SDS PAGE).....	24
3.2.4.1. Priprava poliakrilamidnih gelov	25
3.2.4.2. Priprava vzorcev in denaturacija proteinov	26
3.2.4.3. Pogoji in potek elektroforeze	26
3.2.5. Prenos proteinov iz gela na nitrocelulozno membrano (prenos western)	26
3.2.6. Detekcija proteinov na membrani	27
3.2.7. Statistična analiza.....	28
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	29
4.1. RAZNOLIKO PROTEINSKO IZRAŽANJE KATALITIČNIH PODENOT (IMUNO)PROTEASOMA V LCL	29
4.1.1. Identifikacija krajnih celičnih linij glede na nivo izražanja posamezne podenote (imuno)proteasoma	34
4.1.2. Hierarhično razvrščanje LCL celičnih linij glede na sorodnost.....	38
5. SKLEP	43
6. VIRI IN LITERATURA	44

SLIKOVNO KAZALO

Slika 1: Shematski prikaz ubikvitinacije proteina in njegove razgradnje v 26S proteasomu....	1
Slika 2: Shematski prikaz mehanizma katalitične razgradnje substrata v proteasomu.....	2
Slika 3: Struktura 20S proteasoma in imunoproteasoma.....	3
Slika 4: Prikaz namestitve regulatornih proteinov.....	4
Slika 5: Direktna in navzkrižna pot predstavitve antigenov na molekuli poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa 1	6
Slika 6: Kemijske strukture nekaterih neselektivnih (bortezomib, karfilzomib, marizomib) in selektivnih (ONX-0914, UK-101) zaviralcev proteasoma.....	13
Slika 7: Shema aparata za vertikalno elektroforezo (A) in prikaz ločevanja makromolekul glede na velikost (B)	25
Slika 8: Shematski prikaz prenosa proteinov (iBlot).....	27
Slika 9: Prikaz proteinskega nivoja izražanja katalitičnih podenot ($\beta 1$, $\beta 2$ in $\beta 5$) proteasoma v LCL celičnih linijah po prenosu western in detekciji s specifičnimi protitelesi. Membrane (A, B, C, D in E) prikazujejo posamezno LCL celično linijo v dveh bioloških ponovitvah (označene s številko 1 in 2). <i>Ip</i> ; izoliran encim imunoproteasom.	30
Slika 10: Prikaz proteinskega nivoja izražanja katalitičnih podenot ($\beta 1i$, $\beta 2i$ in $\beta 5i$) imunoproteasoma v LCL celičnih linijah po prenosu western in detekciji s specifičnimi protitelesi. Membrane (A, B, C, D in E) prikazujejo posamezno LCL celično linijo v dveh bioloških ponovitvah (označene s številko 1 in 2). <i>Ip</i> ; izoliran encim imunoproteasom.....	31
Slika 11: Povprečno relativno izražanje posameznih katalitičnih podenot proteasoma in imunoproteasoma v celotni proučevani populaciji LCL	32
Slika 12: Relativno izražanje katalitičnih podenot proteasoma: $\beta 1$ (a), $\beta 2$ (b) in $\beta 5$ (c).....	36
Slika 13: Relativno izražanje katalitičnih podenot imunoproteasoma: $\beta 1i$ (a), $\beta 2i$ (b) in $\beta 5i$ (c)	37
Slika 14: Hierarhična razvrstitev preučevanih LCL celičnih linij v skupine (dendrogram) glede na izražanje katalitičnih podenot imunoproteasoma in proteasoma	38
Slika 15: Povprečne relativne vrednosti izražanja posamezne podenote znotraj skupine	39
Slika 16: Prikaz razmerja $\beta 1i/\beta 1$, $\beta 2i/\beta 2$ in $\beta 5i/\beta 5$	40

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Seznam uporabljenih reagentov z navedenim proizvajalcem	17
Preglednica II: Seznam uporabljene laboratorijske opreme z navedenim proizvajalcem	18
Preglednica III: Uporabljene raztopine in njihova sestava.....	19
Preglednica IV: Seznam uporabljenih primarnih in sekundarnih protiteles z navedenim proizvajalcem	21
Preglednica V: Sestava gelov, ki smo jih uporabili pri izvedbi SDS PAGE	25
Preglednica VI: Korelacije med posameznimi pari podenot.	33
Preglednica VII: Celične linije z najnižjo in najvišjo ekspresijo posamezne katalitične podenote s podanim povprečjem in SD.....	35

POVZETEK

Proteasomi so večkatalitični kompleksi, ki katalizirajo razgradnjo večine proteinov v celicah sesalcev. Njihova funkcija je zato ključna pri vzdrževanju proteinskega ravnotežja in regulaciji številnih celičnih procesov. Poznamo več vrst proteasomov, pri čemer sta najbolj proučevana konstitutivni proteasom (prisoten v vseh celicah) in imunoproteasom, ki se nahaja predvsem v celicah imunskega sistema. V zadnjih dveh desetletjih je raziskovanje vloge imunoproteasoma privedlo do osvetlitve procesov, v katere je vpet. Tako je, zaradi tvorbe antigenskih peptidov, pomemben pri omejevanju virusnih okužb. Povišano izražanje imunoproteasomskih podenot v neimunskih celicah med vnetjem in neoplastično transformacijo nakazuje na njegovo vlogo v patogenezi avtoimunskih, nevrodegenerativnih in rakavih obolenj. Uspehu neselektivnih zaviralcev proteasoma je sledil razvoj selektivnih zaviralcev imunoproteasoma, za vrednotenje njihovih učinkov pa je potrebno opredeliti ustrezne celične modele.

V sklopu magistrske naloge smo devetindvajsetim limfoblastoidnim celičnim linijam (LCL) določili proteinski nivo katalitičnih podenot proteasoma ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$) in imunoproteasoma ($\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$). V ta namen smo iz omenjenih celičnih linij izolirali proteine ter le-te nato ločili z metodo denaturacijske poliakrilamidne gelske elektroforeze (SDS PAGE). Temu je sledil prenos western in določanje relativne količine posamezne katalitične podenote z uporabo specifičnih protiteles. Z analizo podatkov smo nato identificirali po tri celične linije z najvišjim in najnižjim nivojem izražanja posamezne podenote (imuno)proteasoma, ki bi v prihodnosti lahko služile kot modeli za vrednotenje novih specifičnih zaviralcev $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$, $\beta 1i$, $\beta 2i$ in/ali $\beta 5i$. Da bi opredelili skupne značilnosti na podlagi vseh šestih katalitičnih podenot, smo s programom Orange izrisali hierarhično drevo. Populacijo 29-ih LCL smo lahko, glede na skupne značilnosti in ohranjanje statistične moči, razdelili v štiri skupine. Za 1. skupino je značilno nizko izražanje podenote $\beta 1i$, medtem ko so v 4. skupini LCL, ki imajo nizko stopnjo izražanja podenote $\beta 5i$. V 2. skupini se visoko izražata podenoti $\beta 2i$ in $\beta 5i$, medtem ko je za 3. skupino značilno povišano izražanje podenote $\beta 1i$. Posamezne skupine LCL lahko v prihodnosti po potrebi uporabimo kot orodja za proučevanje vloge katalitičnih podenot proteasomov v celicah kot tudi za vrednotenje morebitnih novih zaviralcev.

Ključne besede: imunoproteasom, proteasom, proteinski nivo, limfoblastoidne celične linije

ABSTRACT

Proteasomes are multicatalytic enzymes that catalyse the great majority of protein degradation in mammalian cells. Their function is therefore essential for protein homeostasis and regulation of most cellular processes. There are various types of proteasomes, two of which are the most investigated: constitutive proteasome (present in all cells) and immunoproteasome, found in cells of the immune system. In last two decades, the study of immunoproteasome has led to findings of its involvement in pathophysiological processes. Immunoproteasome is important in controlling virus infections by the generation of antigenic peptides. Increased expression of immunoproteasome subunits in nonimmune cell types during inflammation and neoplastic transformation supports its involvement in the pathogenesis of autoimmune, neurodegenerative and malignant diseases. Following the success of unselective inhibitors, compounds that selectively inhibit the immunoproteasome are under investigation. Thus, it is necessary to define appropriate cell models for their evaluation.

In our work we analysed the protein levels of the catalytically active subunits of the proteasome ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$) and immunoproteasome ($\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$) in 29 lymphoblastoid cell lines (LCL). We isolated proteins from LCL and separated them with denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE). After western blotting we determined the relative expression of each catalytically active subunit with specific primary and secondary antibodies. During the data analysis we identified three cell lines with the highest and the lowest expression of each catalytically active subunit of (immuno)proteasome, which could be suitable models for evaluating new specific (immuno)proteasome inhibitors. With the use of the programme Orange, we performed a hierarchical clustering of the LCL cell lines based on their common characteristics in regards to the protein expression of the catalytically subunits. Based on the common characteristics we classified the entire population of LCL cell lines into four groups, to maintain the statistical power. LCLs of the 1st group possess a low protein level of the subunit $\beta 1i$. On the other hand, the cell lines ranked into the 3rd group have a high protein expression level of that subunit. In 4th group LCLs with low level of subunit $\beta 5i$ are clustered, while the common characteristic of cell line in the 2nd group are high levels of subunits $\beta 2i$ in $\beta 5i$. In the future, we can choose the appropriate cell line based on its characteristic as a model for the investigation and evaluation of individual (immuno)proteasome subunits.

Key words: immunoproteasome, proteasome, protein level, lymphoblastoid cell lines

SEZNAM OKRAJŠAV

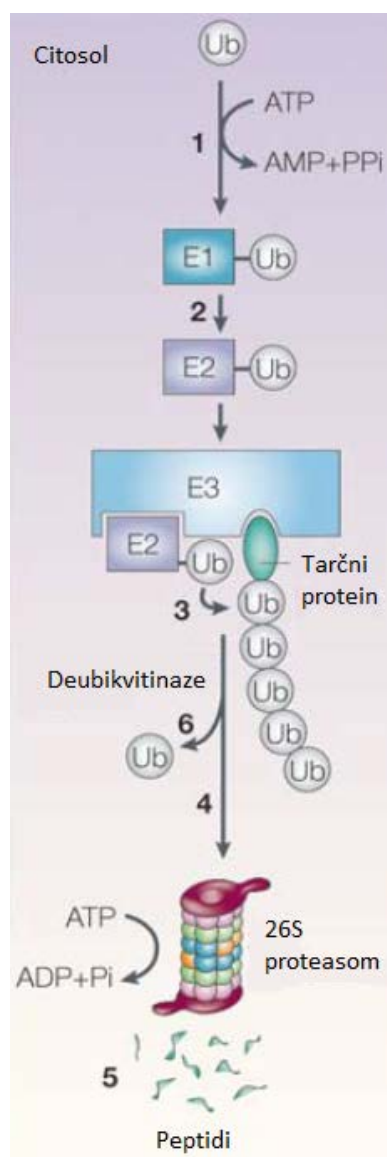
ATP	adenozin trifosfat (angl. a denosine t riphosphate)
BA	bisakrilamid
CTL	citolitični T limfociti
E3	ubikvitin-ligaza
EBV	Epstein-Barr virus
ER	e ndoplazemski r etikulum
I κ B	zaviralni protein NF- κ B (angl. i nhibitor of k appa b eta)
LAF komora	komora z laminarnim pretokom zraka (angl. l aminar f low cabinet)
LCL	limfoblastoidne celične linije (angl. l ymphoblastoid c ell l ines)
MHC I	poglavitni kompleks tkivne skladnosti razreda I (angl. m ajor h istocompatibility complex I)
NF- κ B	jedrni transkripcijski element kapa beta (angl. n uclear f actor- k appa B)
PA	p roteasomski a ktivator (angl. p roteasome a ctivator)
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza (angl. p oly a crylamide g el e lectrophoresis)
PBS	fosfatni pufer v fiziološki raztopini (angl. p hosphate b uffer s aline)
PSMB	podenota proteasoma beta (angl. proteasome subunit beta)
RPMI	medij za celice, ki so ga razvili v Inštitutu Roswell Park (angl. R oswell P ark M emorial I nstitute)
SDS	natrijev dodecil sulfat (angl. s odium d odecyl sulfate)
Th celice	T celice pomagalke (angl. T h elper cells)

1. UVOD

1.1. UBIKVITIN-PROTEASOMSKA POT

Ubikvitin-proteasomska pot je nepogrešljiva pri zagotavljanju proteinske homeostaze. Preko te poti se namreč razgradijo proteini, ki regulirajo širok spekter celičnih procesov, npr.: celični cikel, apoptozo, diferenciacijo, imunski odgovor in maligne transformacije [1,2,3,4]. V jedru tega procesa je proteasom, večkatalitični encim, ki omogoča nadzorovano razgradnjo proteinov. Slednji morajo biti predhodno označeni s poliubikvitinsko verigo.

Ubikvitin je majhen, regulatoren protein, ki ga lahko najdemo v vseh evkariontskih celicah. Ubikvitinacija poteka v treh korakih s pomočjo treh vrst encimov: ubikvitin-aktivirajočim encimom (E1), ubikvitin-konjugirajočim encimom (E2) in ubikvitin-ligazo (E3). Po hidrolizi adenozin trifosfata (ATP) se adenzin monofosfat veže na C-terminalni glicinski ostanek ubikvitina, kar omogoči vezavo te molekule na cisteinski ostanek ubikvitin-aktivirajočega encima. Nato se aktivirani ubikvitin s transesterifikacijo prenese na aktivno mesto ubikvitin-konjugirajočega encima. Na koncu E3 prepozna tarčni protein in katalizira prenos ubikvitina nanj. Nastane izopeptidna vez med glicinom ubikvitina in lizinom proteina [1,2,3]. Ubikvitin vsebuje sedem lizinov, na katere se lahko še naprej vežejo molekule ubikvitina in tako nastane poliubikvitiniran protein. Encim E3 določa tip vezave in s tem nadaljnjo funkcijo ubikvitiniranega proteina. Proteasom prepozna proteine, na katere so vezane vsaj 4 molekule ubikvitina [2]. Pred razgradnjo označenega proteina se ubikvitinske molekule odcepijo in tako reciklirajo [3] (slika 1).

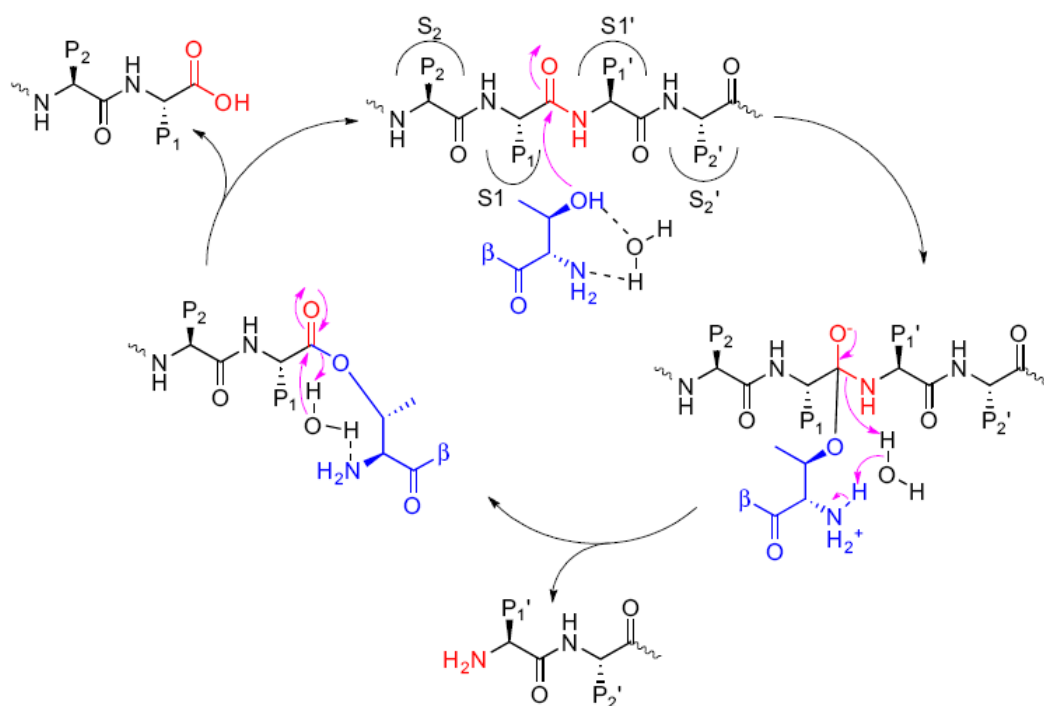


Slika 1: Shematski prikaz ubikvitinacije proteina in njegove razgradnje v 26S proteasomu (prirejeno po 5).

1.2. ZGRADBA PROTEASOMA IN IMUNOPROTEASOMA

1.2.1. 20S proteasom

Vsem proteasomom je skupen osrednji cilindrično oblikovan del (20S proteasom), ki je velik približno 700 kDa in je sestavljen iz štirih heptamernih obročev: dveh zunanjih α -obročev in dveh notranjih β -obročev [4,6]. Dva identična zunanja α -obroča sodelujeta pri povezavi z regulatornimi kompleksi in nadzorujeta translokacijo substratov v katalitično aktivno jedro. Notranja obroča 20S proteasoma vsebujeta vsak sedem β -podenot. Tri izmed njih vsebujejo aktivne nukleofilne N-terminalne treoninske ostanke in tvorijo katalitično mesto na luminalni strani proteasoma. Nukleofilni napad hidroksilne skupine treonina na karbonilno skupino peptidne vezi vodi do tvorbe acil-encimskega intermediata, v katerem peptidni del ostane s proteasomom povezan z estrsko vezjo. Vodne molekule, ki so prisotne v katalitični votlini hidrolizirajo to vez, da nastane peptidni fragment, ki je potem izločen v citosol [7] (slika 2).

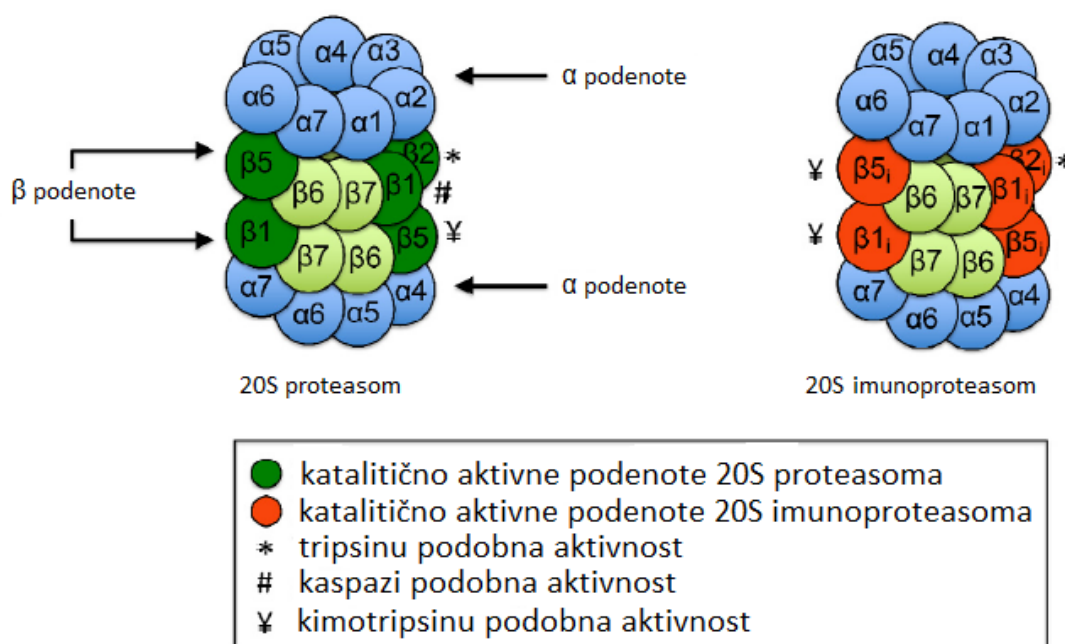


Slika 2: Shematski prikaz mehanizma katalitične razgradnje substrata v proteasomu. Proteasom je obarvan modro, substrat pa črno razen peptidne vezi in njenih ostankov, ki so rdeči (prirejeno po 7).

Konstitutiven proteasom, ki je normalno izražen v vseh celicah, vsebuje $\beta 1$ (PSMB6), $\beta 2$ (PSMB7) in $\beta 5$ (PSMB5) katalitično aktivno podenoto. Imunoproteasom je v nasprotju z njim

prisoten le v celicah imunskega sistema (npr.: dendritične celice, limfociti, makrofagi) in celicah, ki so bile izpostavljene določenim mediatorjem vnetja (interferon- γ ali dejavnik tumorske nekroze- α) ali nekaterim drugim stresnim pogojem (npr. reaktivne kisikove zvrsti). Pod vplivom teh dejavnikov se poveča izražanje proteina za zorenje proteasoma, ki posredno vodi v zamenjavo $\beta 1$, $\beta 2$ in $\beta 5$ podenot z inducibilno $\beta 1i$ (PSMB9), $\beta 2i$ (PSMB10) in $\beta 5i$ (PSMB8) podenoto, ki se vgrajuje soodvisno [4,8]. Struktura proteasoma in imunoproteasoma je prikazana na sliki 3.

Proteasom in imunoproteasom se razlikujeta tudi v katalitični aktivnosti. $\beta 1$ podenota izkazuje kaspazi-podobno aktivnost (cepi za kislimi AK ostanki), $\beta 2$ in $\beta 2i$ tripsinu-podobno aktivnost (cepita za bazičnimi AK ostanki), $\beta 5$, $\beta 5i$ in $\beta 1i$ pa kimotripsinu podobno aktivnost (cepijo za hidrofobnimi AK ostanki) [9]. Imunoproteasom tako poseduje nižjo kaspazi-podobno aktivnost in višjo tripsinu-podobno ter kimotripsinu-podobno aktivnost, zato je tudi dobljeni nabor peptidov drugačen od tistega pri konstitutivnem proteasomu [10].



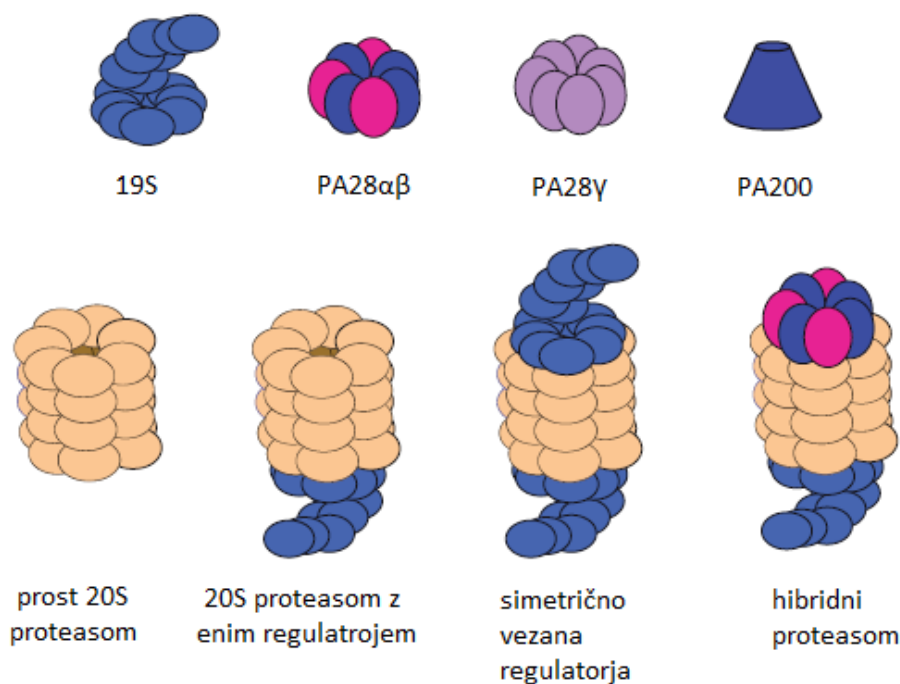
Slika 3: Struktura 20S proteasoma in imunoproteasoma (prirejeno po 8).

Poleg konstitutivnega proteasoma in imunoproteasoma poznamo še timoproteasom. Izražen je v epitelijskih celicah skorje timusa in poleg $\beta 1i$ in $\beta 2i$ podenote vsebuje tudi $\beta 5t$ podenoto. V primerjavi z $\beta 5$ podenoto izkazuje zmanjšano kimotripsinu podobno aktivnost [9]. Timoproteasom ima pomembno vlogo pri razvoju $CD8^+$ T limfocitov, saj je odgovoren za

njihovo pozitivno selekcijo. Študije na miših so pokazale, da primanjkljaj $\beta 5t$ podenote dramatično zmanjša raznolikost $CD8^+$ T limfocitov in sposobnost odgovora organizma na virusne infekcije [11, 12].

1.2.2. Regulatorni kompleksi

Proteolitično aktivnost proteasoma 20S lahko modulirajo reverzibilno vezani regulatorni kompleksi. Do danes so identificirali tri različne proteasomske aktivatorje (PA): PA200, PA28 (11S) in PA700 (19S) [8,13]. Povezava z regulatorji povzroči konformacijsko spremembo zunanjih obročev in substratom omogoči dostop do katalitičnega mesta v lumnu proteasoma. Na proteasom 20S se regulatorji lahko vežejo simetrično ali asimetrično (na vsak konec proteasoma 20S drugi regulator) in s tem tvorijo različne hibridne proteasome [9,14,15] (slika 4).



Slika 4: Prikaz namestitve regulatornih proteinov (prirejeno po 10).

Izmed vseh aktivatorjev, se na 20S proteasom v od ATP odvisni reakciji veže le 19S. Skupaj tvorita t.i. 26S proteasom, ki ima najpomembnejšo vlogo pri razgradnji proteinov označenih s poliubikvitinskimi verigami. Osnovo regulatornega proteina 19S tvorijo podenote, ki vsebujejo več ATP-az (razvitje in translokacija proteina sta energijsko potratna procesa) in vezavnih mest za ubikvitinirane proteine, medtem ko pokrov tvori več strukturnih proteinov

in ena deubikvitinaza. 19S igra pomembno vlogo pri vezavi, razvitju, deubikvitinaciji in translokaciji proteinov v katalitično odprtino [14,16,17].

1.3. BIOLOŠKA VLOGA PROTEASOMOV

Proteasom 26S katalizira vsaj 80 % razgradnje proteinov, med katerimi so napačno zviti, poškodovani in regulatorni proteini. Posledično je vloga proteasoma ključna za proteinsko homeostazo in regulacijo večine celičnih procesov [14]. Njegovo delovanje je pomembno pri obvladovanju oksidativnega stresa, antigenski predstavitvi, virusnih infekcijah, malignih obolenjih in nevrodegenerativnih boleznih.

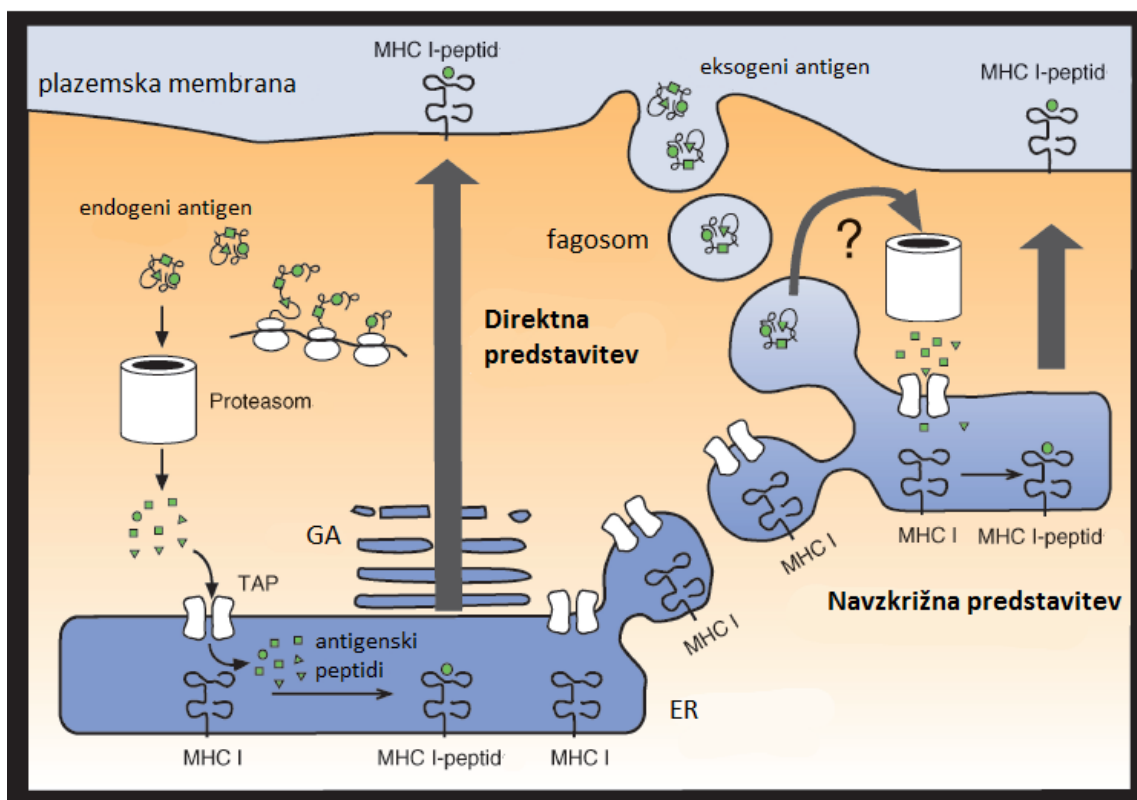
1.3.1. Oksidativni stres

Fagociti med imunskim odgovorom preko aktivacije nikotinamid adenin dinukleotid fosfatne oksidaze 2 in inducibilne sintaze dušikovega oksida proizvajajo veliko kisikovih in dušikovih reaktivnih zvrsti. Slednji ne poškodujejo samo tujih patogenov temveč tudi celici lastne proteine, ki so ireverzibilno poškodovani in so podvrženi agregaciji ter so potencialno toksični za celico. Iz teh razlogov je ubikvitin-proteasomska pot, poleg indukcije antioksidativnih encimov, pomemben zaščitni mehanizem celice pred škodljivimi učinki oksidativnega stresa (npr. kopičenje poškodovanih proteinov) [18].

1.3.2. Antigenska predstavitev

Nekateri izmed peptidov nastalih po razgradnji s proteasomom služijo kot antigeni. Celica jih preko molekul poglobitnega histokompatibilnega kompleksa razreda 1 (MHC I) predstavi imunskemu sistemu, kar omogoči aktivacijo citotoksičnih $CD8^+$ limfocitov T (CTL) [9]. CTL z receptorji na svoji površini prepoznavajo antigene, ki so s pomočjo MHC I vezani na antigen predstavitvene celice. Med razvojem CTL v timusu limfociti T z receptorji, ki prepoznavajo MHC I komplekse s tujimi peptidi, dozorevajo naprej, medtem ko so limfociti T, ki prepoznavajo komplekse z avtolognimi peptidi, eliminirani. Kot rezultat tega procesa so zreli CTL visoko specifični za tuje peptide vezane na MHC I. Če pride do nepravilnosti (npr. okužene celice, rakavo spremenjene celice), se ob ujemanju T-celičnega receptorja in epitopa na MHC I po principu ključa in ključavnice, CTL aktivirajo [19,20].

Poznamo dva glavna mehanizma tvorbe kompleksa peptid-MHC I – direktnega in navzkrižnega (slika 5).



Slika 5: Direktna in navzkrižna pot predavitve antigenov na molekuli poglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa 1 (povzeto po 21).

Na molekulo MHC I se lažje vežejo peptidi z bazičnimi ali hidrofobnimi AK ostanki na C-terminalnem koncu, ki so glavni produkt razgradnje z imunoproteasomom. Domnevo, da je imunoproteasom bolj učinkovit pri generiranju peptidov z visoko afiniteto do molekul MHC I so potrdili v študiji na miših, ki so jim izbili gene za vse tri katalitične podenote imunoproteasoma. Dendritične celice teh miši so predstavljale manj epitopov, poleg tega pa je bil nabor peptidov približno 50 % drugačen od tistega pri divjem tipu miši [22]. Znano je tudi, da nekatere antigenske peptide v večji meri generira konstitutivni proteasom. Primanjkljaj predavitve določenega antigena je ponavadi posledica njegove razgradnje v proteasomu oz. imunoproteasomu [23].

1.3.3. Signalna pot jedrnega dejavnika κB (NF- κB) in proteasom

Družina transkripcijskih faktorjev NF- κB je pomembna pri uravnavanju izražanja številnih genov, ki zapisujejo vnetne citokine, rastne faktorje in regulatorje apoptoze [24]. Njihova nekontrolirana aktivacija lahko vodi v avtoimunske in vnetne bolezni, nastanek rakavih celic ter rezistenco le-teh na mnoga zdravila [25].

Proteasomska razgradnja je pomemben korak pri kanonični (klasični) poti aktivacije NF- κ B. Ta pot ima pomembno vlogo pri uravnavanju vnetja in prirojene imunosti. V mirujočih celicah so NF- κ B dimeri zavirani preko vezave z zaviralci NF- κ B (I κ B). Aktivirani kompleks kinaze I κ B (IKK) fosforilira I κ B, kar vodi v pripenjanje molekul ubikvitina na I κ B in njegovo proteasomsko razgradnjo. Po aktivaciji lahko NF- κ B potuje v jedro, se tam veže na tarčni gen in omogoči njegovo transkripcijo. Hkrati se aktivira tudi gen za I κ B, ki z inhibicijo NF- κ B ustvari negativno povratno zanko [25].

Študije so pokazale, da je bilo višje izražanje imunoproteasoma v intestinalnem tkivu pacientov s Chronovo boleznijo ali ulcerativnim kolitisom povezano s povečano aktivacijo poti NF- κ B. Prav tako so dokazali, da je imunoproteasom v primerjavi s konstitutivnim proteasomom učinkovitejši pri razgradnji I κ B in s tem bolj aktivira pot NF- κ B [26]. Posledično inhibicija imunoproteasoma zaradi močnejšega zaviranja signalne poti NF- κ B lahko privede do boljših izidov zdravljenja kot zaviranje konstitutivnega proteasoma. Raziskovanje vpliva proteasoma na pot NF- κ B je pomembno, saj bomo le s pomočjo razumevanja mehanizmov, prek katerih proteasom vpliva na procese v celicah, lahko v prihodnosti načrtovali učinkovitejša zdravila za zdravljenje mnogih bolezni.

1.3.4. Virusne infekcije

Imunoproteasom sodeluje pri omejevanju okužb najverjetneje preko treh mehanizmov: (i) predstavitve antigenov na MHC I, (ii) obvladovanja oksidativnega stresa in (iii) aktivacije NF- κ B signalne poti [27]. Pri predstavitvi virusnih antigenov je proteasom pomemben za tvorbo antigenskih peptidov, ki se vežejo na MHC I molekulo in aktivirajo CTL. S tem proteasom omogoča imunskemu sistemu prepoznavo in uničenje okuženih celic. Med miokarditisom, induciranim z virusom Cocksackie B so miši z izbitim genom za podenoto β 5i razvile hujšo poškodbo miokardnega tkiva v primerjavi z mišmi divjega tipa. Raziskovalci so dokazali, da je do tega prišlo zaradi učinkovitejšega odstranjevanja proteinov, ki so imeli oksidativne poškodbe, s pomočjo imunoproteasoma v primerjavi s proteasomom [27]. Imunoproteasom prav tako bolj aktivira signalno pot NF- κ B v primerjavi s proteasomom in s tem sproži prepisovanje genov za različne citokine, kemokine in receptorje, ki so potrebni za adhezijo nevtrofilcev in različne proteine vključene v antigensko predstavitev. Aktivacija NF- κ B med virusno okužbo prek različnih mehanizmov omogoča obrambo pred infekcijo, po drugi strani pa so nekateri virusi to signalno pot izkoristili sebi v prid in NF- κ B uporabili za

podaljšanje preživetja gostiteljske celice, da bi s tem pridobili čas za replikacijo. Učinek aktivacije NF- κ B signalne poti je odvisen od vrste virusne infekcije [28].

V študijah na miših, okuženih z virusom hepatitisa B (HBV) je bilo ugotovljeno, da je povečana ekspresija imunoproteasoma doprinesla k lažji prepoznavi okuženih hepatocitov s strani limfocitov T. Miši, ki so jim izbili gen za podenoto β 5i, so se zaradi okrnjenega imunskega odgovora težje obranile pred okužbo. Glavni razlog za to razliko v imunskem odgovoru je najverjetneje v kvalitetnejši tvorbi peptidnih epitopov HBV z imunoproteasomi [29]. Odsotnost ali zmanjšana aktivnost imunoproteasoma pri miših zmanjša aktivacijo CTL tudi pri okužbi z virusom limfocitnega koriomeningitisa in z virusom gripe [30]. O podobnih rezultatih so poročali tudi v študijah na miših okuženih z bakterijami, paraziti in glivami [4, 31]. Zmanjšana aktivnost podenote β 5i je vplivala tudi na zmanjšano produkcijo vnetnih mediatorjev med okužbo z virusom gripe [30].

Po drugi strani pa je bilo v raziskovanju vpliva zaviralcev proteasoma na z virusno okužbo povzročenem miokarditisu ugotovljeno, da ti zmanjšujejo pomnoževanje virusa in vnetni odziv. Postavlja se še veliko vprašanj o interakcijah med virusno infekcijo in ubikvitin-proteasomskim sistemom, a podatki kažejo, da je lahko imunoproteasom pomembna tarča v razvijanju novih terapevtskih pristopov za bolezni, ki jih povzročajo okužbe z virusi [32].

1.3.5. Avtoimunske bolezni

Glavni način terapije avtoimunskih bolezni je še vedno uporaba imunosupresivnih zdravil. Čeprav so ta učinkovita, je za nadzorovanje bolezni večkrat potrebna dolgoročna uporaba visokih odmerkov. To pa lahko vodi celo do življenjsko-ogrožajočih oportunističnih infekcij in tveganja za razvoj malignih obolenj [33]. Potreba po terapevtskih pristopih, ki bi delovala bolj specifično in posledično izkazovala manj stranskih učinkov, je zato velika. Potencialna tarča za zdravljenje avtoimunskih bolezni je imunoproteasom. V patogenezo avtoimunskih bolezni je vpleten prek vpliva na diferenciacijo limfocitov T (razvoj naivnih CD4⁺ limfocitov T v celice T pomagalke (Th) 17 in Th1), signaliziranja prek NF- κ B poti in produkcije vnetnih citokinov [34]. Da bi bolje razumeli vlogo proteasoma pri avtoimunskih obolenjih, je bilo izvedenih veliko študij na živalskih modelih. Bortezomib, ki je prvi klinično uporabljen zaviralec proteasoma, se zaradi svojega neselektivnega delovanja ni izkazal kot najbolj primerno zdravilo, saj so se ob njegovi uporabi pojavili resni neželeni učinki (trombocitopenija, periferne nevropatije) in rezistenca [35]. Boljše rezultate so v predkliničnih študijah dosegli z uporabo selektivnega zaviralca podenote β 5i - ONX-0914. Proučevali so

bolezni kot so: revmatoidni artritis, vnetne bolezni črevesja, tiroiditis, sistemski eritromatozni lupus in multipla skleroza [34].

Pri eksperimentalnem revmatoidnem artritisu je ONX-0914 zmanjšal predstavitev antigenov prek MHC I, proliferacijo in aktivacijo CTL in celic T pomagalk ter znižal produkcijo vnetnih citokinov. Ti spremenjeni procesi so se kazali v upočasnjem napredovanju bolezni. Protivnetni učinki so bili hitri in dolgo trajajoči [34].

Pozitivni učinki zdravljenja s proteasomskimi zaviralci so se pokazali tudi pri vnetnih boleznih črevesja. V miših z induciranim kolitisom (z natrijevim dekstran sulfatom) so se v kolonu dvignile ravni vnetnih citokinov in s tem tudi izražanje podenote $\beta 5i$ imunoproteasoma. V miših, ki so jim izbili gen za $\beta 5i$, je bila akutna faza inducirane kolitisa veliko blažja in napredovanje bolezni počasnejše. Opazili so zmanjšano infiltracijo nevtrofilcev in celic T pomagalk, kar je doprineslo k manjši poškodbi tkiva. Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da podenota $\beta 5i$ igra pomembno vlogo pri patogenezi kolitisa [34, 30].

V naslednji študiji so mišim s pomočjo joda inducirali nastanek tiroiditisa. Aplikacija ONX 0914 je zavirala napredovanje tiroiditisa v od odmerka odvisnem načinu. Na mišjih modelih so dokazali tudi pozitiven učinek takega zdravljenja pri avtoimunski bolezni ščitnice, ki je posredovana s Th1 celicami (Hašimotova bolezen), medtem ko pri bolezni, kjer so vpletene Th2 celice (Gravesova bolezen) ni bilo sprememb. Pri Gravesovi bolezni očitno poleg antigenske predstavitve igrajo pomembnejšo vlogo tudi drugi procesi, kot sta diferenciacija Th celic in sproščanje citokinov [34, 36].

Plazmatke pacientov s sistemskim eritromatoznim lupusom tvorijo veliko protiteles, zato so še posebej občutljive na zaviralce proteasoma. Oba, ONX 0914 in bortezomib, sta na živalskih modelih preprečila razvoj bolezni, pri miših z že napredovalo boleznijo pa sta zmanjšala vnetje ledvic [34].

Eksperimentalni avtoimuni encefalomyelitis predstavlja živalski model za multiplo sklerozo. Zaviranje imunoproteasoma z ONX 0914 je imelo pozitivne učinke tudi v tem modelu bolezni, saj se je po njegovi aplikaciji zmanjšal delež $CD4^+$ limfocitov T in s tem nastanek citokinov. Zavrtje je bilo tudi dozorevanje Th1 in Th17 celic T. Pri miših, ki so jim aplicirali ONX 0914, takoj ob pojavu prvih simptomov bolezni so le-to zaustavili, aplikacija zaviralca pri že razviti bolezni pa je zmanjšala ponovitev zagonov [37].

Zaviralci proteasomov so potencialno učinkovita zdravila tudi pri pacientih s presajenimi organi. Medtem ko so imunosupresivi učinkoviti pri preprečevanju akutnih zavrnitev presajenega organa, pa še vedno pogosto prihaja do kroničnih avtoimunskih reakcij po presaditvi. Bortezomib je kot prvi izmed zaviralcev proteasoma izkazal zmanjšano število s protitelesi posredovanih zavrnitev presajenih ledvic. V študiji so dokazali, da je aplikacija bortezomiba preko indukcije apoptoze plazmatk vodila do manjše koncentracije donorsko-specifičnih protiteles. Najpogostejši stranski učinki so vključevali vplive na gastrointestinalni sistem (npr.: slabost, bruhanje), trombocitopenijo in redko paresteze [38]. Želja po selektivnejšemu delovanju in manj izraženih neželenih učinkih je vodila do proučevanja uporabe selektivnega zaviralca imunoproteasoma - ONX 0914. V študiji na podganah je ONX 0914 zmanjšal število plazmatk, celic B in donorsko-specifičnih protiteles, poleg tega pa je zmanjšal tudi obseg kronične nefropatije in izboljšal ledvično funkcijo [39].

1.3.6. Maligna obolenja

Rast nekaterih tipov malignih obolenj (multipli mielom, rak prostate, kolona in pljuč) je odvisna od izrazito povečanega izražanja proteasoma, ki lahko pri teh obolenjih postane zanimiva tarča za zdravljenje, saj z njegovim zaviranjem preprečimo proliferacijo malignih celic [4]. Leta 2003 je FDA odobrila uporabo prvega zaviralca proteasoma – bortezomiba za terapijo multiplega mieloma. Čeprav je ta bolezen še vedno v splošnem neozdravljiva, pa se je terapija v zadnjih 10 letih izpopolnila, saj predvsem zaviralci proteasoma podaljšujejo preživetje pacientov z multiplim mielomom. V študiji, kjer so paciente z multiplim mielomom po predhodnih terapijah z drugimi zdravili, zdravili z bortezomibom, se je čas do ponovnega napredovanja bolezni podaljšal za faktor 2-4 v primerjavi z zadnjo terapijo [40]. Posebna občutljivost malignih plazmatk na zaviralce proteasoma je posledica tvorbe ogromnih količin imunoglobulinov in s tem velike odvisnosti od proteasomske razgradnje proteinov [9]. Zaviralci proteasoma pri zdravljenju multiplega mieloma učinkujejo tudi prek zaviranja NF- κ B signalne poti z zmanjšano razgradnjo I κ B [40].

Po drugi strani lahko pri nekaterih tipih malignih obolenj (npr.: rak požiralnika, ledvic in kožni rak) opazimo zmanjšano aktivnost imunoproteasoma, zato uporaba zaviralcev proteasomov kot terapevtski pristop v zdravljenju teh rakavih obolenj ne bi bila primerna [41]. Potrebne so dodatne študije, ki bi raziskale funkcionalne posledice nižje ravni imunoproteasoma v teh celicah.

Kronične vnetne bolezni črevesja (npr.: ulcerozni kolitis, Chronova bolezen) predstavljajo visoko tveganje za razvoj kolorektalnega raka. Njegov nastanek in rast omogočajo predvsem procesi vnetja in vnetni citokini, ki jih posredujejo celice Th1 in Th17. V študiji na miših s kolorektalnim rakom so pokazali, da ONX 0914 učinkovito preprečuje nadaljnjo rast tumorja. Zmanjšala se je izguba telesne teže povezane z boleznijo, znatno pa se je tudi povečalo preživetje bolnih miši. Miši z izbitim genom za $\beta 5i$ niso razvile bolezni, kar dokazuje pomembnost vloge $\beta 5i$ v nastanku in razvoju raka debelega črevesja in jo identificira kot potencialno tarčo za zdravljenje te bolezni [42].

1.3.7. Nevrodegenerativne bolezni

Zaradi neuravnoteženosti razgradnje in tvorbe proteinov lahko pride do kopičenja ubikvitiniranih proteinov, ki so med drugim znak nekaterih nevrodegenerativnih bolezni (npr.: Parkinsonova, Huntingtonova, Alzheimerjeva bolezen, amiotrofična lateralna skleroza). To je vodilo do hipoteze, da zmanjšana aktivnost konstitutivnega proteasoma lahko prispeva k nastanku in razvoju bolezni. Celice glije so pomembne za normalno funkcijo nevronov in imajo pri nevrodegenerativnih boleznih reaktiven fenotip, kar prispeva k vnetnem odgovoru. Med vnetno reakcijo je v glia celicah povečano izražanje imunoproteasoma, ki lahko pomaga pri razgradnji proteinov povezanih z boleznijo. Ni še jasno ali povečano izražanje imunoproteasoma na dolgi rok pomaga obvladovati bolezen ali pa celo doprinese k razvoju bolezni (posledica povečane koncentracije citokinov in kroničnega vnetja). Zaviranje proteasoma povzroči večje število oksidiranih nukleinskih kislin v nevronih kot v glia celicah, kar pomeni, da so nevroni bolj dovzetni za oksidativni stres, ki je povezan z degenerativnimi boleznimi. Zmanjšana aktivnost proteasoma v mišjih nevronih je vodila do signifikantne nevrodegeneracije in tvorbe raznih proteinskih agregatov ter reaktivne glioze [43,44]. Študij na tem področju ni veliko, zato bodo potrebne dodatne raziskave, ki bodo osvetlile vlogo proteasomov v sami patofiziologiji bolezni. Izražanje podenot imunoproteasoma je na primer v starosti večje, vendar še ni jasno ali je to posledica povečanega celičnega stresa in nastanka proteinskih agregatov ali dejansko povišanje vodi v nastanek in razvoj nevrodegenerativnih bolezni [4].

1.4. ZAVIRALCI PROTEASOMOV

Zaviralce proteasomov, ki so trenutno v različnih fazah kliničnih študij, lahko razdelimo v tri glavne strukturne razrede: peptidi borove kisline, peptidi epoksiketonov in β -laktoni [7]. Ti zaviralci se vežejo reverzibilno ali pa ireverzibilno na katalitično mesto znotraj proteasoma.

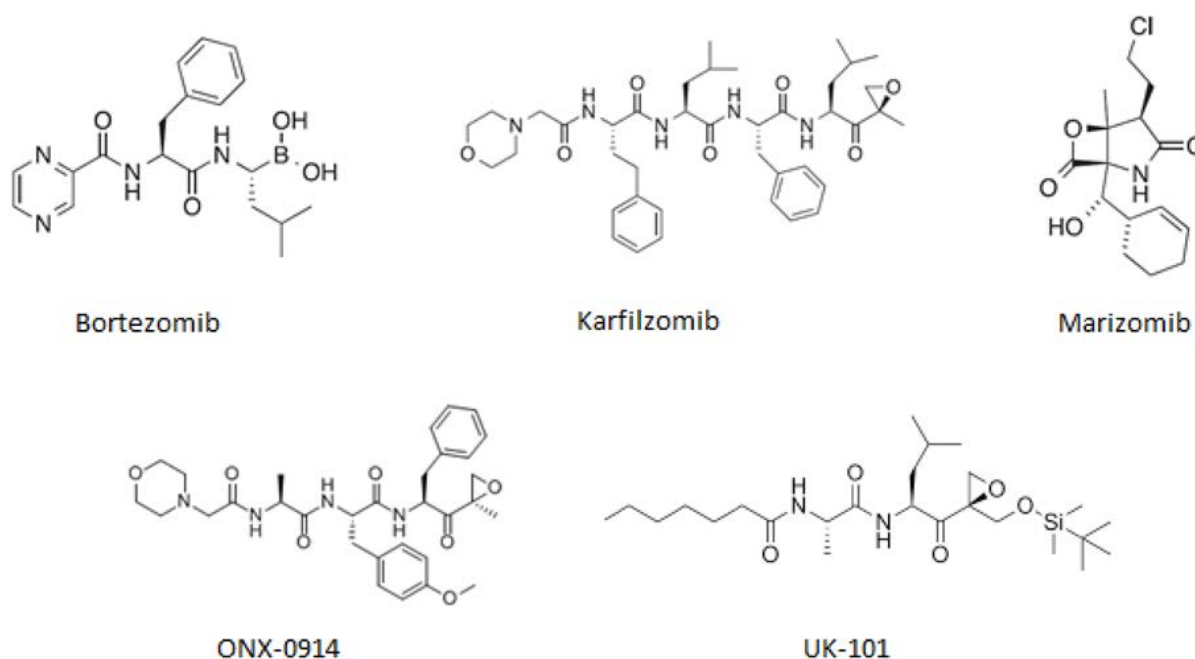
Bortezomib je prvi klinično uporabljen zaviralec proteasoma. Spada v skupino peptidnih boronatov in je sestavljen iz pirazinojske kisline, fenilalanina in leucina z borovo kislino namesto karboksilne. Borov atom se veže na katalitično mesto 26S proteasoma z visoko afiniteto in specifičnostjo. Tvori se tetraedralen adukt s treoninom, ki je stabiliziran z vodikovo vezjo med N-terminalno amino skupino treonina in hidroksilno skupino borove kisline [7]. Za zdravilo tretjega izbora zdravljenja multiplega mieloma je bil bortezomib odobren že leta 2003, 5 let kasneje pa so ga z novimi rezultati odobrili za prvo izbiro zdravljenja. Uspešno se uporablja v kombinacijah z drugimi kemoterapevtiki (doksorubicin, talidomid, deksametazon, lenalidomid) brez povečane toksičnosti [41]. Kljub dobrim rezultatom pa bortezomib velikokrat vodi do hujših stranskih učinkov (periferni nevropatije, trombocitopenija) in v razvoj rezistence. Izvedenih je bilo več študij, kjer so celične linije izpostavljali vedno večjim odmerkom bortezomiba in na koncu okarakterizirali celice, ki so bile nanj rezistentne. Ugotovili so, da obstaja nekaj glavnih mehanizmov rezistence: povečano izražanje podenot proteasoma, mutacije podenote $\beta 5$, alternativne poti odstranjevanja poškodovanih proteinov, inhibicija pro-apoptotičnih poti (npr.: NF- κ B) in aktivno črpanje zdravila iz celic [45].

Učinkovitost in varnost bortezomiba sta predstavljala osnovo za razvoj druge generacije zaviralcev proteasoma, z drugačno jakostjo in varnostnim profilom. Leta 2012 je bil za terapijo multiplega mieloma odobren še karfilzomib, ki je učinkovit tudi pri nekaterih pacientih rezistentnih na bortezomib [45]. Spada med ireverzibilne epoksiketonske zaviralce proteasoma. V primerjavi z bortezomibom ima enako jakost, a je bolj selektiven za podenoto $\beta 5$, poleg tega pa inhibicija kimotripsinu-podobne aktivnosti traja dlje zaradi tvorbe kovalentne vezi [7, 40].

Marizomib je strukturno in farmakološko poseben zaviralec proteasoma iz razreda β -laktonov. Medtem ko je pri bortezomibu in karfilzomibu potrebna intravenska aplikacija, je marizomib bioaktiven tudi po peroralni aplikaciji. Trenutno je v kliničnih študijah za multipli mielom in maligni gliom [40].

Rešena kristalna struktura imunoproteasoma je omogočila razvoj zaviralcev proteasoma, ki selektivneje delujejo na podenote imunoproteasoma. Selektivni zaviralci za zdaj še niso del kliničnih študij, poteka pa več predkliničnih testiranj. Imunoproteasomi so v neimunskih celicah izraženi v veliko manjši meri kot v imunskih celicah in na mestih vnetja, zato bi selektivnost lahko omogočila terapije z manj izraženimi stranskimi učinki. Tripeptidni epoksiketon - ONX 0914 je eden izmed selektivnih zaviralcev imunoproteasoma, ki izkazuje 20-40 krat večjo selektivnost do podenote $\beta 5i$ kot do podenote $\beta 5$. Pri nekaterih modelih avtoimunskih bolezni (kolitis, sistemski lupus eritematosus) je zmanjšal izločanje vnetnih citokinov, izboljšal nekatere znake bolezni in izkazoval manj stranskih učinkov kot neselektivni zaviralci proteasoma. Prvi odkriti zaviralec, ki selektivno zavira podenoto $\beta 1i$ je peptidni epoksiketon UK-101. Na mišjih modelih so dokazali, da lahko zavre proliferacijo raka prostate [41].

Kemijske strukture vseh omenjenih zaviralcev proteasoma so prikazane na sliki 6.



Slika 6: Kemijske strukture nekaterih neselektivnih (bortezomib, karfilzomib, marizomib) in selektivnih (ONX-0914, UK-101) zaviralcev proteasoma (prirejeno po 41).

Znanstveniki se bodo v prihodnosti najverjetneje osredotočili na zaviralce, ki specifično zavirajo posamezne podenote. Razvoj zaviralcev za terapevtsko uporabo izven onkologije se

bo nadaljeval in mogoče bomo že kmalu priča odobritvi uporabe takih zdravil. Pričakujemo, da se bo z novimi raziskavami še razširil terapevtski potencial zaviralcev proteasoma.

1.5. LIMFOBLASTOIDNE CELIČNE LINIJE (LCL)

Kot model proučevanja vloge proteasomov, so znanstveniki najpogosteje uporabili mišje modele, ki so jim izbili gen za eno ali več podenot proteasoma (t.i. 'knock-out' modeli). Omenjeni način raziskovanja izkazuje več pomanjkljivosti, saj fenotip, ki ga opazujemo ni nujno samo posledica odsotnosti določenega gena. Ob izbitju posamezne podenote proteasoma lahko pride do napačne izgradnje proteasoma zaradi kooperativnosti vgradnje podenot in s tem do spremenjene aktivnosti. Poleg tega so dobljeni rezultati lahko posledica kompenzatornih mehanizmov. To so ugotovili v študiji, kjer so proučevali navadne in transgene miši. Po aplikaciji selektivnega zaviralca podenote $\beta 5i$ mišim so ugotovili bistveno bolj zmanjšano produkcijo citokinov, kot v miših z izbitim genom za podenoto $\beta 5i$. To so raziskovalci pripisali kompenzatornemu vgrajevanju podenote $\beta 5$ v imunoproteasome transgenih miši [46].

Zaviralci proteasoma po drugi strani ne vplivajo na izgradnjo in strukturo proteasoma, prav tako ne prihaja do kompenzatornih mehanizmov v takem obsegu. Še ena velika prednost je, da so potencialno uporabni tudi v terapiji različnih bolezni. (Imuno)proteasome danes pogosto proučujejo s pomočjo zaviralcev proteasoma na živalskih modelih ali pa na celičnih linijah. Slednje so v primerjavi z živalskimi modeli cenejše, hitreje pridemo do rezultatov in omogočajo bolj nadzorovane okoliščine. Tekom magistrske naloge smo se zaradi potrebe po opredelitvi novih celičnih modelov za preučevanje morebitnih novih zaviralcev proteasoma, odločili za preučevanje limfoblastoidnih celičnih linij (LCL).

Dostopnost LCL kot nadomestilo za izolirane in krioprezervirane limfocite iz periferne krvi je olajšala mnoge biološke preiskave. Pridobivajo jih tako, da limfocite B iz periferne krvi transformirajo s pomočjo virusa Epstein-Barr (EBV), da postanejo nesmrtni. Dobljene celice ohranijo večino lastnosti limfocitov, vključno z nespremenjenim DNA zapisom. Zaradi nizke somatske stopnje mutacij (0,3 %) in enostavnega gojenja, ostajajo celice izbora za shranjevanje genetskega materiala. Metabolične poti LCL so individualno specifične, zato so primerne za genetske in funkcionalne študije. Z njimi lahko pridobimo neomejene količine DNA, RNA ali proteinov. Cilj genetskih študij je identifikacija genetskih variacij, kar bi lahko pomagalo pri diagnozi in terapiji patoloških procesov. LCL lahko uporabimo tudi pri analizi izražanja genov na nivoju RNA ali proteinov. Na ekspresijo določenega gena lahko

potencialno vplivamo z določeno terapevtsko učinkovino, zato lahko LCL uporabimo tudi za presajanje učinkovin in identifikacijo njihovega učinka [47, 48].

Kljub veliki uporabnosti LCL se moramo zavedati tudi nekaterih omejitev in jih upoštevati pri njihovi uporabi. Transformacija z virusom Epstein-Barr in kontinuirano gojenje imajo vpliv na epigenetske lastnosti celic in izražanje genov. Pri preučevanju različnih bolezni moramo biti pozorni na tkivno specifično izražanje genov (npr.: patološki protein pri Huntingtonovi bolezni ima različen vpliv v nevronskih celicah kot v LCL). Znano je tudi, da imajo LCL različne površinske označevalce, kar je najverjetneje posledica različnih stopenj diferenciacije limfocitov B v času transformacije [48]. Ob zavedanju teh pomanjkljivosti so človeške LCL pomembno orodje za predvidevanje odzivov na zdravila, morebitnih stranskih učinkov in za raziskovanje interindividualne variabilnosti.

2. NAMEN

Proteasom in imunoproteasom sta v zadnjih letih postala zelo zanimiva kot tarči pri širokem spektru patoloških procesov. Sta nenavadni tarči, saj vsebujeta več katalitičnih mest in s tem omogočata kompleksno uravnavanje farmakološkega odgovora. Uspeh bortezomiba, prvega zaviralca proteasoma, je vodil v razvoj novih učinkovin z večjo jakostjo in selektivnostjo. Zaradi specifično povečanega izražanja imunoproteasoma pri nekaterih obolenjih so selektivni zaviralci le-tega potencialno primernejši za zdravljenje, saj se z njihovo uporabo zmanjša resnost neželenih učinkov. Pojavlja se potreba po odkrivanju učinkovitejših novih zaviralcev in vzpostavitvi primernih celičnih modelov za njihovo vrednotenje.

Naš cilj je ovrednotiti nivo izražanja katalitično aktivnih podenot proteasomov v limfoblastoidnih celičnih linijah (LCL), kar bo omogočilo nadaljnjo uporabo le-teh kot modelov za vrednotenje novih zaviralcev proteasomov in njihovih učinkov. Določili bomo proteinski nivo omenjenih podenot z metodo ločevanja proteinov z denaturacijsko poliakrilamidno gelsko elektroforezo (SDS PAGE). Lastnosti celic LCL so na molekulski in funkcijski ravni zelo podobne starševskim limfocitom, zato so primerni celični modeli za preučevanje interindividualnih variabilnosti, ki potencialno vplivajo na odziv zdravljenja z zaviralci. Po lizi celic bomo iz lizata izolirali proteine. Proteine bomo ločili z SDS PAGE in membrano inkubirali v ustreznih primarnih in sekundarnih protitelesih. Po vrednotenju intenzitet lis bo sledila identifikacija celičnih linij, ki najvišje in najnižje izražajo posamezno podenoto proteasoma in imunoproteasoma. Celice bomo po podobnosti s pomočjo hierarhičnega drevesa in računalniškega programa Orange razvrstili v skupine in ovrednotili njihovo primernost za izvajanje nadaljnjih eksperimentov. Dobljene vrednosti bomo tudi statistično analizirali z računalniškim programom GraphPad Prism.

Preko navedenih postopkov bomo tekom eksperimentalnega dela magistrske naloge poskusili opredeliti lastnosti celičnih linij LCL na nivoju proteasomov in tako ovrednotiti njihovo ustreznost za nadaljnje raziskovanje delovanja (imuno)proteasoma in vrednotenje novih zaviralcev.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

3.1.1. Reagenti

Reagenti, ki smo jih uporabili pri izvajanju eksperimentalnega dela magistrske naloge, so navedeni v Preglednici I.

Preglednica I: Seznam uporabljenih reagentov z navedenim proizvajalcem

Reagent	Proizvajalec, država
2-merkaptotanol	Sigma-Aldrich, ZDA
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, ZDA
Trypan Blue Solution	Sigma-Aldrich, ZDA
RPMI (medij za celice, ki so ga razvili v Inštitutu Roswell Park) 1640	Sigma-Aldrich, ZDA
fetalni goveji serum (FBS)	ThermoFischer Scientific, ZDA
L-glutamin	ThermoFischer Scientific, ZDA
fiziološka raztopina v fosfatnem pufru (PBS)	Sigma-Aldrich, ZDA
goveji serumski albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, ZDA
reagent A	BioRad, ZDA
reagent B	BioRad, ZDA
reagent S	BioRad, ZDA
akrilamid (AA)	Sigma-Aldrich, ZDA
bisakrilamid (BA)	Sigma-Aldrich, ZDA
amonijev persulfat (APS)	Sigma-Aldrich, ZDA
TEMED	Sigma-Aldrich, ZDA
Seablue Plus2 Pre-stained Standard	Invitrogen, ZDA
SuperSignal West Femto Solution	ThermoFischer Scientific
Mleko v prahu	Pomurske mlekarne, Slovenija
Tween 20	Sigma-Aldrich, ZDA
dimetil sulfoksid	Gibco, ZDA
etilendiaminotetraocetna kislina (EDTA)	Serva, Nemčija

NaDS	Sigma-Aldrich, ZDA
NaCl	Merc KGaA, Nemčija
KCl	Merc KGaA, Nemčija
glicerol	Sigma-Aldrich, ZDA
bromfenol modro	Merck Millipore, ZDA
NP-40	Thermo Fischer Scientific
proteazni inhibitor	Thermo Fischer Scientific
imunoproteasom	R&d systems, ZDA

3.1.2. Laboratorijska oprema

V preglednici II so navedeni laboratorijski material ter naprave, ki smo jih potrebovali za izvedbo eksperimentalnega dela magistrske naloge.

Preglednica II: Seznam uporabljene laboratorijske opreme z navedenim proizvajalcem

Aparatura/material	Proizvajalec
avtoklav LABOKLAV 25 Steriltechnik AG	Magdeburg, Nemčija
centrifuge	Tehtnica CENTRIC 322A, Železniki, SLO Eppendorf centrifuge 5415 R, Hamburg, Nemčija
centrifugirke in mikrocentrifugirke	Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija
hladilnik (+4 °C)	Gorenje, Velenje, Slovenija
nastavki za pipete (do 10, 200, 300 ali 1000 µL)	Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija
pipete (0,1-2,5 µL, 0,5-10 µL, 2-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL)	Eppendorf Research Plus, Nemčija
vibracijski mešalnik	Vortex GENIE 2, Scientific Industries, ZDA Combi-Spin, Biosan, ZDA
zamrzovalnik	Gorenje, Slovenija
serološke pipete	Sarstedt, Nemčija
mikrotitrne ploščice	Sarstedt, Nemčija

vsebniki za gojenje celičnih kultur	Sigma-Aldrich, ZDA
inkubator	Sanyo
sonifikator	Mikro+polo, Slovenija
naprava za poliakrilamidno gelsko elektroforezo	Bio-Rad Laboratories, ZDA
iBlot® 2 Gel Transfer Device	Bio-Rad Laboratories, ZDA
kamera za snemanje gelov	Syngene, Velika Britanija
čitalec mikrotitrskih ploščic	BioTek instruments, ZDA
komora z laminarnim pretokom zraka (LAF komora) PIO SMBC 183 AV	Iskra Pio, Slovenija

3.1.3. Raztopine

Raztopine, ki smo jih potrebovali za izvedbo magistrske naloge, so navedeni v preglednici III.

Preglednica III: Uporabljene raztopine in njihova sestava

Raztopina	Sestava
pufer RIPA	50 Mm Tris-HCl, pH = 7.4 150 Mm NaCl 0.5 % Na-deoksiholat 1 Mm EDTA 1 % NP-40 Pufer hranimo v hladilniku pri 4 °C.
Pufer za koncentracijski gel	0,5 M Tris-base, pH = 6.8 Pufer hranimo v hladilniku pri 4 °C.
Pufer za separacijski gel	1.5 M Tris-base, pH = 8.8 Pufer hranimo v hladilniku pri 4 °C.
APS	10 % APS Pufer hranimo v zamrzovalniku pri -20 °C.
3-kratni nanašalni pufer SLB	3 x 10 % glicerol 3 x 0.1 % bromfenol modro 3 x 3 % (natrijev dodecil sulfat) SDS

	3 x 65 mM Tris-Cl, pH = 6.8 Pufer hranimo v zamrzovalniku pri -20 °C in ga pred uporabimo 3-krat redčimo z dH ₂ O.
5-kratni elektroforezni pufer	5 x 25 mM Tris-base, pH = 8.3 5 x 192 mM glicin 5 x 0.1 % SDS Pred uporabo pufer 5-krat redčimo z dH ₂ O.
10-kratni tris pufer (TBS)	10 x 25 mM Tris-base, pH = 7.4 10 x 137 mM NaCl 10 x 3 mM KCl Pred uporabo pufer 10-krat redčimo z dH ₂ O.
Pufer za odstranjevanje protiteles (angl. stripping buffer)	62.5 mM Tris-HCl, pH = 6.8 2 % SDS 100 Mm 2-merkaptetanol
Tris pufer z dodanim Tweenom (TTBS)	900 ml dH ₂ O 100 ml 10 x TBS 1 ml Tween ²⁰
Gojišče RPMI	500 ml RPMI-1640 50 ml FBS 5,5 ml mešanice penicilina in streptomicina 5,5 ml L-glutamina
5 % mleko	2 g mleka v prahu 40 ml TTBS

3.1.4. Protitelesa

V preglednici IV so navedena protitelesa, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu magistrske naloge. Vsa protitelesa hranimo v zamrzovalniku pri -20 °C.

Preglednica IV: Seznam uporabljenih primarnih in sekundarnih protiteles z navedenim proizvajalcem

Primarna protitelesa	Faktor redčenja	Kataloška številka	Proizvajalec, država
specifična za $\beta 1$ podenoto	1 : 500	HPA023312	Sigma-Aldrich, ZDA
specifična za $\beta 2$ podenoto	1 : 1000	SAB1100335	Sigma-Aldrich, ZDA
specifična za $\beta 5$ podenoto	1 : 1000	SO324	Sigma-Aldrich, ZDA
specifična za $\beta 1i$ podenoto	1 : 750	BML-PW8840-0100	Enzo Life Science, ZDA
specifična za $\beta 2i$ podenoto	1 : 2500	HPA030225	Sigma-Aldrich, ZDA
specifična za $\beta 5i$ podenoto	1 : 2000	HPA050327	Sigma-Aldrich, ZDA
specifična za β -aktin	1 : 5000	A5316	Sigma-Aldrich, ZDA
Sekundarna protitelesa	Faktor redčenja	Kataloška številka	Proizvajalec, država
protitelesa označena s hrenovo peroksidazo	1 : 5000	AP307P AP308P	Merc Millipore, ZDA

3.1.5. Celične linije

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili 30 humanih LCL, ki so pridobljene iz periferne krvi zdravih donorjev, iz katere so izolirali limfocite B in jih transformirali z EBV. Celice LCL so bile označene z naslednjimi identifikacijskimi kodami: 1112, 1515, 1728, 1976, 6417, 1122, LCL2, LCL3, LCL4, LCL6, LCL7, LCL8, LCL9, LCL10, 1516, 1801, 1823, 5876, 6037, 6333, 6423, 6425, 380, 381, 382, 383, 384, 386, 387 in 1754. Celične linije so bile pridobljene v nacionalnem izraelskem genetskem laboratoriju na Univerzi v Tel Avivu ali iz Estonske genske banke, ki deluje v okviru Estonskega genomskega centra v Tartuju, Estoniji.

3.2. METODE

3.2.1. Gojenje celičnih kultur

Gojenje celic je potekalo v celičnem laboratoriju v LAF komori, kjer smo lahko vseskozi zagotavljali aseptične pogoje. Tako pred začetkom dela, kot tudi po zaključku smo delovno površino v LAF komori in vse pripomočke, ki smo jih za delo potrebovali, razkužili s 70 % (v/v) etanolom. Nato smo komoro 30 minut obsevali z UV svetlobo za dodatno sterilizacijo površine. Pri rokovanju s celično kulturo smo uporabljali sterilne reagente in pribor, zato smo pipetne nastavke in plastične vsebnike prej pripravili s parno sterilizacijo v avtoklavu.

3.2.1.1. Odmrzovanje celic

Pred odmrzovanjem celic smo pripravljen medij v vodni kopeli segreli na 37 °C. Plastične vsebnike smo označili s števkami celičnih kultur in v vsako odpipetirali 10 ml svežega RPMI gojišča. Celice, ki so bile shranjene v kriovialah v tekočem dušiku, smo hitro odtalili v vodni kopeli in jih takoj prenesli v pripravljene plastične vsebnike z medijem. Centrifugirali smo jih 5 min na sobni temperaturi pri 1200 obratov/min. Supernatant smo po centrifugiranju zavrgli, celice premešali v 4 ml svežega medija in jih prenesli v gojitvene posode. Celice smo gojili v inkubatorju na 37 °C in atmosferi s 5 % CO₂ ter nasičeni z vlago.

3.2.1.2. Gojenje celic

Hranilnih snovi in rastnih dejavnikov začne celicam po nekem času primanjkovati, poleg tega pa se v gojišču začnejo kopičiti tudi razgradni produkti in celice začnejo odmirati. Pozorno smo spremljali barvo gojišča (indikator pH), gostoto in obliko celic. Vsak drugi ali tretji dan smo delu starega gojišča s celicami dodali svež medij.

3.2.1.3. Štetje celic

Štetje celic je potekalo tako, da smo najprej celice v gojitveni platenki homogeno premešali. Nato smo v plastični vsebnik prenesli 10 µl homogene suspenzije celic in vanj dodali še 10 µl tripanskega modrila. Tripansko modrilo ne more prehajati v citosol živih celic, medtem ko se mrtve oziroma poškodovane celice obarvajo modro. Vzorec smo premešali, ga nanесли na hemocitometer in s pomočjo invertnega mikroskopa prešteli žive celice v štirih kvadrantih (N). Dobljeno število celic smo delili s 4, pomnožili s faktorjem redčenja f (2) in s faktorjem izdelovalca hemocitometra (10⁴) ter tako dobili število celic v mL medija (enačba 1).

$$\text{št. celic/ml} = N/4 * f * 10^4$$

(Enačba 1)

N....št. celic v vseh štirih kvadrantih

f....faktor redčenja

3.2.2. Liza celic in izolacija proteinov

Ko smo s štetjem celic ugotovili, da jih imamo za naše nadaljnje delo dovolj (celokupno vsaj $4 \cdot 10^6$ celic), smo s serološko pipeto celično kulturo suspendirali in jo prenesli v plastično centrifugirko. Centrifugirali smo 5 min pri 1500 obratov/min. Nato smo supernatant odpipetirali v odpad, celice pa resuspendirali v 1 ml PBS-ja. Dobljeno suspenzijo celic smo prenesli v plastično 1,5 mL mikrocentrifugirko in znova centrifugirali 7 min pri 1600 obratov/min. PBS smo odpipetirali stran in v vsako mikrocentrifugirko s celicami dodali 100 μ l mešanice RIPA in proteaznega inhibitorja (v razmerju 100:1). Celice smo do nadaljnje uporabe hranili pri -80°C .

Med liziranjem smo mikrocentrifugirke s celicami iz skrinje prenesli v kadičko z ledom, kjer so ostale tekom različnih postopkov. Vzorce smo sonicirali 8 s pri frekvenci 50 kHz in postopek po vmesnem premoru še enkrat ponovili. Nato smo v posodi z ledom vzorce stresali na stresalniku 30 min. Dobljeno suspenzijo smo premešali in centrifugirali 15 min pri 4°C in 13200 obratih/min. Usedlino smo zavrgli, supernatante z izoliranimi proteini, vključno s tarčnimi, pa smo odpipetirali v nove mikrocentrifugirke. Preden smo lizat prestavili v skrinjo na -80°C smo odpipetirali 4 μ l lizata, ki smo ga uporabili za določanje koncentracije proteinov.

3.2.3. Določanje koncentracije proteinov (DC metoda)

Za določanje koncentracije proteinov smo izbrali DC metodo, ki temelji na Lowrey-evi kolorimetrični metodi. Uporabili smo komplet reagentov za DC metodo (BioRad), ki vsebuje reagent A (alkalna raztopina bakrovega tartrata), reagent B (razredčen Folinov reagent) in reagent S. Metoda je relativna, zato potrebujemo umeritveno premico, ki jo izračunamo iz izmerjenih absorbanc standardov govejega serumskega albumina. V območju nizkih koncentracij proteina je intenziteta barve kompleksa linearno odvisna od koncentracije proteinov v vzorcu [49].

Pripravili smo raztopine standardov iz govejega serumskega albumina v uporabljenem lizirnem pufu RIPA za pripravo umeritvene krivulje. Uporabili smo pet različnih koncentracij (0,2; 0,5; 0,8; 1,0; 1,5 mg/ml). Reagente A, B in S smo pred uporabo segreli na sobno temperaturo. Na mikrotitrsko ploščo smo nanесли po 5 μ l vzorcev v duplikatih in standardov v triplicatih. Kot slepo meritev smo nanесли 5 μ l RIPA pufra. V luknjice smo nato dodali 25 μ l reagenta A' (pripravljen po navodilih proizvajalca) in na koncu z avtomatsko pipeto še 200 μ l reagenta B. Mikrotitrsko ploščo smo pokrili s pokrovčkom in inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo s čitalcem za mikrotitrsko ploščo pomerili absorbanco pri 750 nm. Od rezultatov meritev smo odšteli vrednost slepe meritve in iz rezultatov standardov narisali umeritveno krivuljo. Iz krivulje smo s pomočjo enačbe premice izračunali koncentracije vzorcev, ki smo jih na koncu pomnožili še s faktorjem redčenja f (enačba 2).

$$x=(y-n)/k * f \qquad \qquad \qquad \text{(Enačba 2)}$$

y....izmerjena absorbanca pri 750 nm z odšteto slepo vrednostjo

k....naklon premice

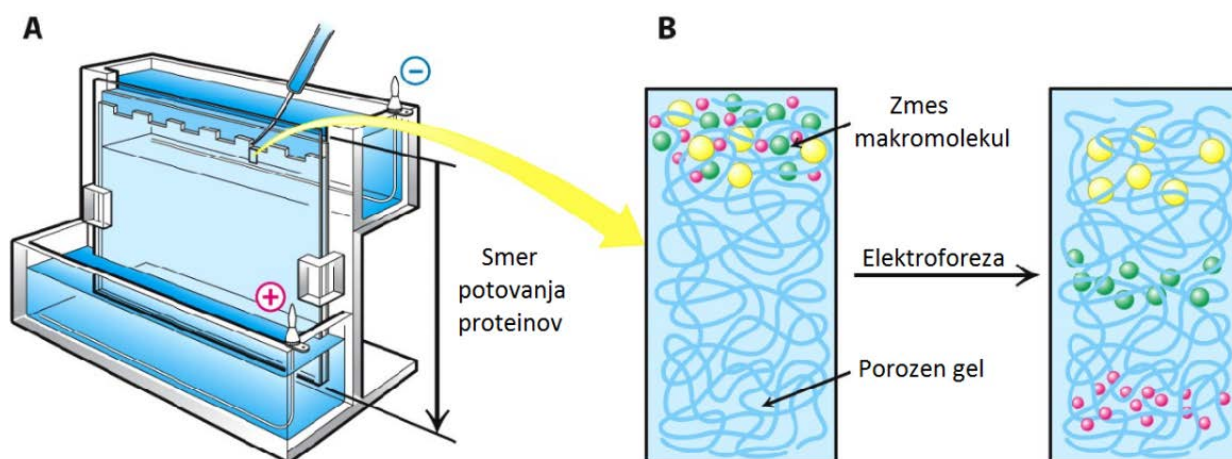
x....koncentracija standarda / vzorca

n...absorbanca pri koncentraciji 0 mg/ml

f....faktor redčenja

3.2.4. Ločevanje proteinov z denuracijsko poliakrilamidno gelsko elektroforezo (SDS PAGE)

Elektroforeza je separacijska metoda, ki temelji na potovanju nabitih delcev pod vplivom električnega polja k elektrodi z nasprotnim nabojem. Delci se ločujejo glede na obliko, velikost in celokupni naboj. Kadar želimo delce ločiti le glede na njihovo velikost, lahko izvedemo poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata. Ta površinsko aktivna snov se veže na proteine in jih denaturira. Ker ima negativni naboj, postanejo negativno nabiti tudi vsi proteini, zato v električnem polju vsi potujejo k anodi (pozitivno nabiti elektrodi). Med elektroforezo se tako zaradi premreženosti poliakrilamidnega gela vrši ločitev samo na podlagi različne velikosti oz. relativne molekulske mase delcev (slika 7). Hitrost potovanja je obratno sorazmerna z velikostjo, saj imajo v premreženem gelu večje molekule tudi večji upor in posledično v enakem času prepotujejo krajšo razdaljo kot manjše molekule [50, 51].



Slika 7: Shema aparata za vertikalno elektroforezo (A) in prikaz ločevanja makromolekul glede na velikost (B) (povzeto po 52).

3.2.4.1. Priprava poliakrilamidnih gelov

Pripravili smo dvofazne pokončne poliakrilamidne gele dimenzij 80 x 60 x 1,5 mm v aparatu za vertikalno elektroforezo. Pred sestavljanjem aparature za vlivanje gela smo vse sestavne dele sprali z destilirano vodo. V okvir smo vstavili gumijasto podlogo ter nanjo tanjše in debelejše steklo z 1,5 mm-distančnikom. Nato smo pripravili raztopine za separacijski in koncentracijski gel kot je navedeno v preglednici V.

Preglednica V: Sestava gelov, ki smo jih uporabili pri izvedbi SDS PAGE

12,5 % separacijski gel		6 % koncentracijski gel	
dH ₂ O	10 mL	dH ₂ O	8,7 mL
40 % AA/BA	7,5 mL	40 % AA/BA	2,25 mL
pufer za separacijski gel	6 mL	pufer za koncentracijski gel	3,75 mL
20 % SDS	0,12 mL	20 % SDS	0,075 mL
10 % APS*	0,24 mL	10 % APS*	0,15 mL
TEMED*	0,024 mL	TEMED*	0,015 mL

*dodamo tik pred vlivanjem gela

Takoj po dodatku 10 % APS in TEMED smo med obe stekli nalili separacijski gel do višine 1,5 cm pod zgornjim robom plošč in ga prekrili z 200 μ L izopropanola. Počakali smo približno pol ure, da je gel polimeriziral. Nato smo izopropanol trikrat sprali z destilirano vodo in s filter papirjem osušili notranjo stran plošč. Sledila je priprava koncentracijskega gela in vlivanje le-tega na separacijski gel do vrha stekel. Nato smo vstavili glavniček s 15 žepki in počakali, da je gel polimeriziral.

3.2.4.2. Priprava vzorcev in denaturacija proteinov

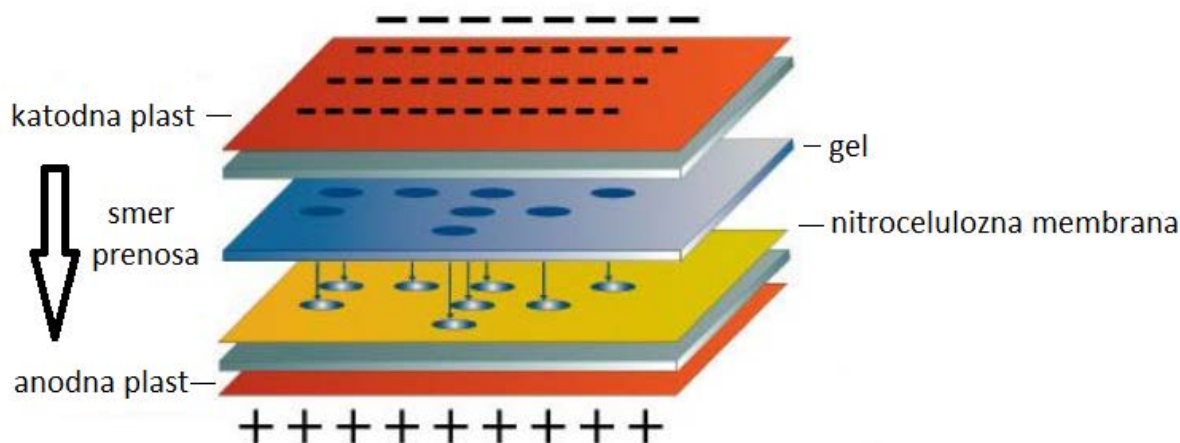
Pred postopkom smo vzorce celičnih lizatov iz skrinje prestavili v posodo z ledom, da so se počasi odtalili. Preračunali smo, koliko destilirane vode je potrebno dodati posameznemu vzorcu, da bo v končnem volumnu vzorca 60 μ g proteinov. V označene plastične mikrocentrifugirke smo nato odpipetirali izračunano količino vode, posamezni vzorec in nanašalni pufer SLB.

3.2.4.3. Pogoji in potek elektroforeze

Strjen gel smo skupaj s stekelcema prenesli v aparaturo za elektroforezo in jo napolnili z elektroforeznim pufrom s pH 8,3. V prvi žepki smo nanesti 4 μ L označevalca velikosti proteinov, v ostale pa po 20 μ L pripravljenih vzorcev. Gel smo razvijali 15 min pri konstantni napetosti 80 V. Nato smo napetost povišali na 130 V in ločbo izvajali toliko časa, da je elektroforezna fronta pripotovala skoraj do konca gela (približno 2h).

3.2.5. Prenos proteinov iz gela na nitrocelulozno membrano (prenos western)

Po končani elektroforezni ločbi smo proteine iz poliakrilamidnega gela prenesli na nitrocelulozno membrano. Prenos western smo izvedli s pomočjo naprave iBlot® 2 Gel Transfer Device, ki nam omogoča suhi prenos proteinov iz gela na membrano. Aparaturo smo sestavili skladno z navodili proizvajalca (slika 8). Za prenos smo izbrali program PO (1 min: 20 V; 4 min: 23 V; 2 min: 25 V). Po končanem prenosu smo dobljene membrane prenesli v pripravljene kadičke s tris pufrom z dodanim Tweenom.



Slika 8: Shematski prikaz prenosa proteinov (iBlot) (povzeto po 53).

3.2.6. Detekcija proteinov na membrani

Za specifično detekcijo smo kot primarna protitelesa uporabili protitelesa proti posamezni podenoti proteasoma, imunoproteasoma ter proti β -aktinu. Kot sekundarna protitelesa smo uporabili kozja protitelesa proti mišjim oziroma zajčjim primarnim protitelesom, konjugirana s hrenovo peroksidazo. Vsa protitelesa smo redčili tako, kot je navedeno v preglednici IV.

Membrano smo 1 uro inkubirali v 5 % mleku in rahlo stresali 1 h. Nato smo membrano sprali s tris pufrom z dodanim Tweenom in jo prenesli v petrijevko z raztopino ustreznih primarnih protiteles. Membrano smo ob rahlem stresanju inkubirali pri 4 °C preko noči. Naslednji dan smo jo spirali 3-krat po 5 min s tris pufrom z dodanim Tweenom in jo prenesli v raztopino sekundarnih protiteles. Sledila je 1 h inkubacija ob rahlem stresanju in spiranje membrane 6-krat po 3 min.

Detekcijo smo izvedli s pomočjo kamere za snemanje gelov in kompletom reagentov SuperSignal West Femto. Po 5 minutni inkubaciji s substratom smo kemiluminiscenčni signal na membrani detektirali z Uvitec aparatom. Jakost lis smo ovrednotili relativno s programom Uvitec Nine Alliance. Po detekciji signala smo membrano sprali in jo prenesli v pufer za spiranje protiteles. Tako smo odstranili vsa vezana protitelesa, kar nam je omogočilo uporabo membrane za ponovno detekcijo drugih proteinov.

3.2.7. Statistična analiza

Dobljene rezultate izražanja proteinov smo podali kot povprečje bioloških ponovitev skupaj s standardnim odklonom. Najprej smo preverili, če se dobljene vrednosti porazdeljujejo normalno, da smo v nadaljevanju lahko izbrali ustrezne statistične teste. Normalnost porazdelitve smo preverili z D'Agostino-Pearsonovim in Shapiro-Wilkovim testom. Nenormalno porazdeljene spremenljivke smo transformirali z ustrezno funkcijo in dobljene vrednosti uporabili pri parametričnih statističnih testih. Izvedli smo dva osnovna testa:

- Korelacijo med izražanjem posameznih proteinov smo ugotavljali s Pearsonovim koeficientom.
- Pri primerjavi izražanja proteinov med več skupinami smo uporabili Kruskal-Wallisovo ANOVO (neparametrično ANOVO) in Dunnov test mnogoterih primerjav.

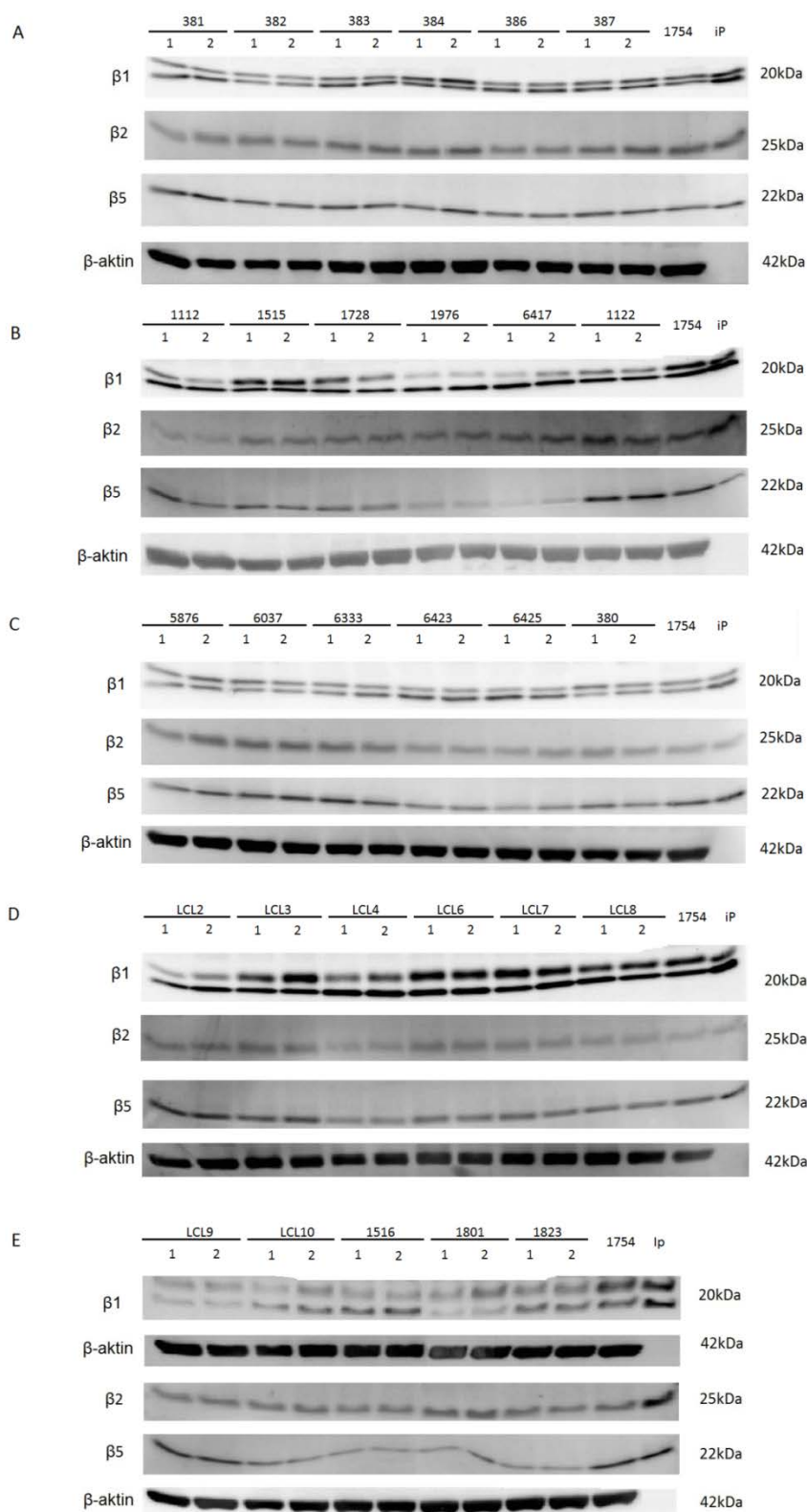
Kot statistično signifikantno vrednost smo opredelili $p < 0,05$. Za analizo smo uporabili računalniški program GraphPad Prism.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

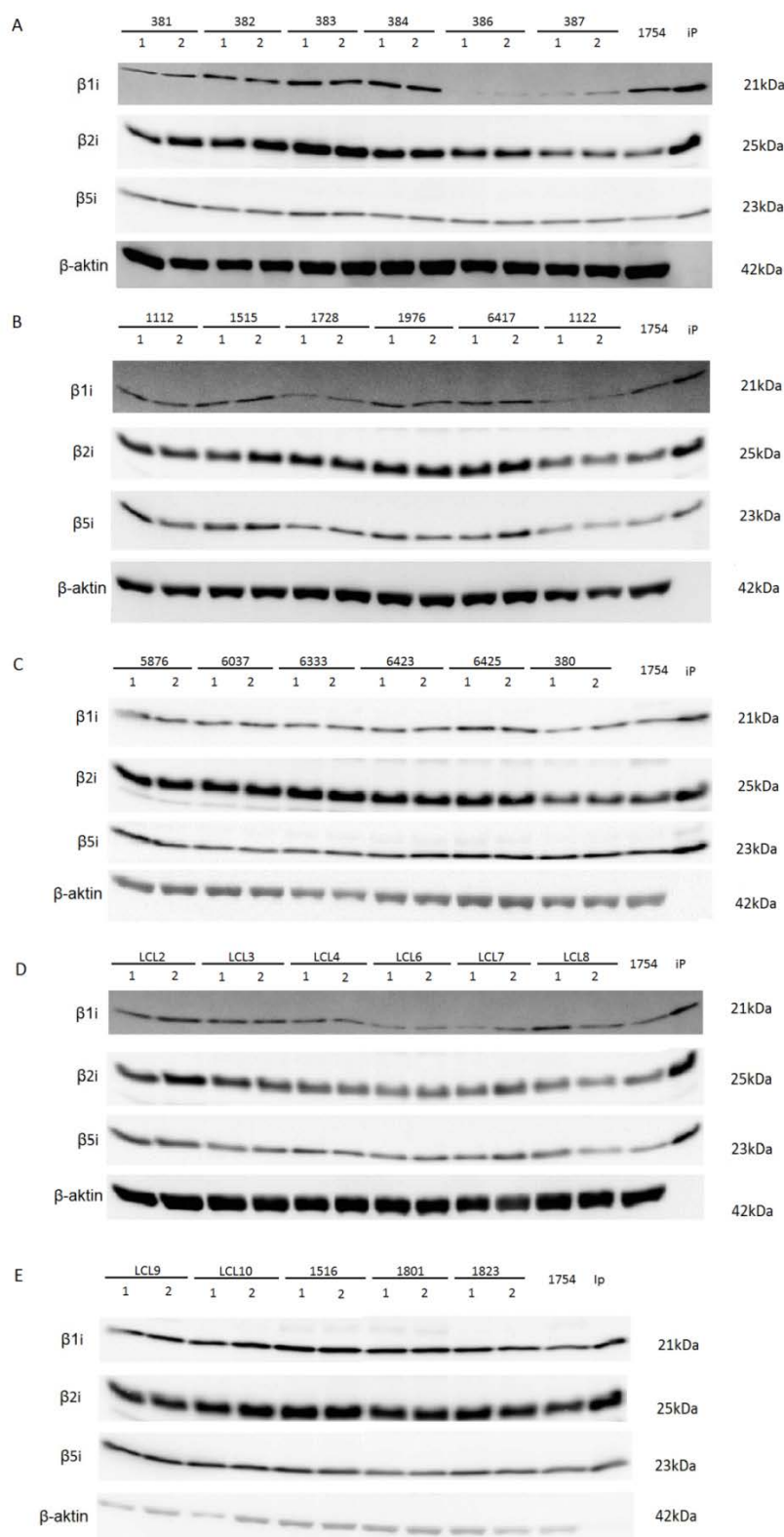
4.1. RAZNOLIKO PROTEINSKO IZRAŽANJE KATALITIČNIH PODENOT (IMUNO)PROTEASOMA V LCL

Kontrolirana transkripcija in translacija igrata glavno vlogo pri določanju, kateri proteini in v kolikšni meri bodo prisotni v celici. LCL, pridobljene z *in vitro* infekcijo limfocitov B z Epstein Barr virusom, predstavljajo neskončen vir celic in s tem tudi proteinov za študije interindividualnih variabilnosti. Na podlagi ugotovljenih razlik lahko predvidimo odzive na posamezne terapevtske pristope in z ustrezno okarakteriziranimi celičnimi linijami v prihodnosti načrtujemo nove eksperimente. V magistrski nalogi smo analizirali proteinski nivo treh podenot proteasoma ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$) in treh podenot imunoproteasoma ($\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$) v LCL. Želeli smo ugotoviti, ali se izražanje posameznih podenot med celičnimi linijami razlikuje glede na to, da gre za isto vrsto celic.

Z denaturacijsko poliakrilamidno elektroforezo, prenosom western in detekcijo proteinov z ustreznimi protitelesi smo na 29-tih celičnih linijah LCL analizirali proteinski nivo izražanja katalitičnih podenot (imuno)proteasoma. Na elektroforezno ploščo smo nanašali enako količino celokupnih proteinov, zato da smo na koncu ugotovljene signifikantne razlike lahko pripisali različnemu izražanju podenot med celičnimi linijami. Za vsako celično linijo LCL smo pripravili dve biološki ponovitvi, da smo zagotovili reprezentativnost rezultatov (sliki 9 in 10). V zadnji žepek smo nanesti še izoliran imunoproteasom, ki je služil kot pozitivna kontrola. Na vsaki membrani smo preverili tudi izražanje β -aktina, ki je globularni protein in tvori celične mikrofilamente. V istem tipu celic se izraža konstantno in v enakomernem obsegu, zato smo ga uporabili kot kontrolo enakomernega nanosa vsakega vzorca. Izražanje posamezne podenote smo zato najprej normalizirali glede na izražanje β -aktina. Pri vsaki izvedbi metode, smo dodali tudi lizat celične linije 1754, ki nam je omogočila relativno kvantifikacijo dobljenih podatkov, saj smo tej liniji pripisali vrednost 1.

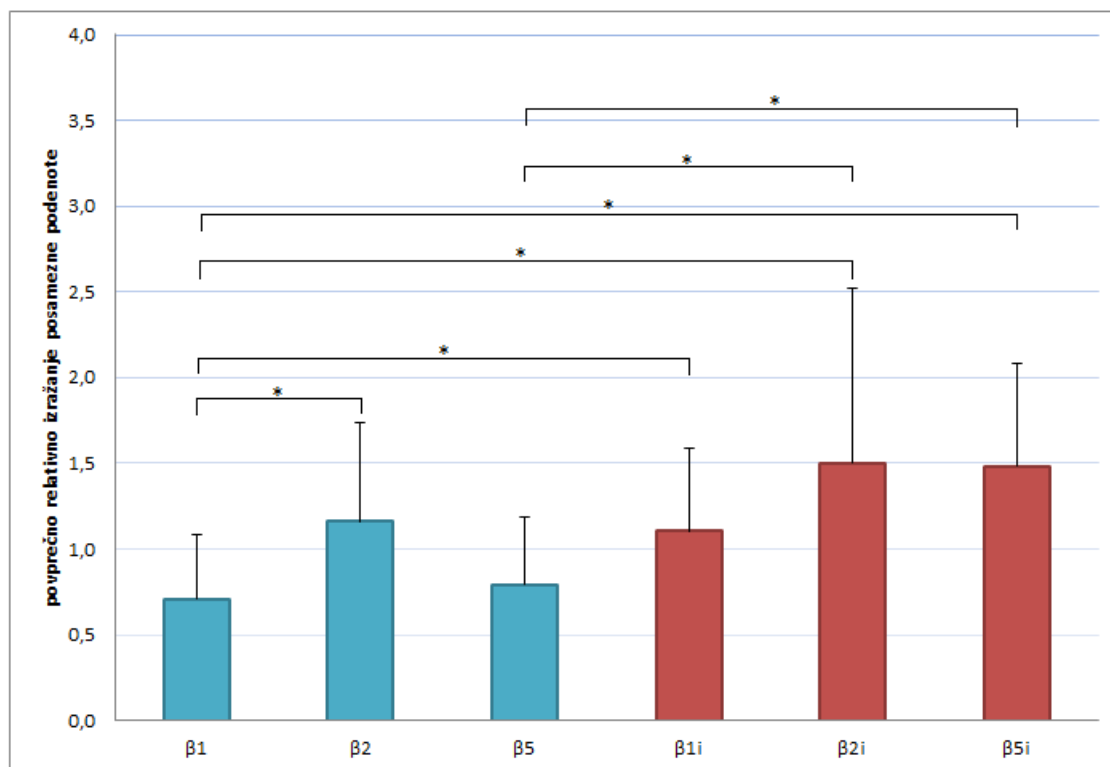


Slika 9: Prikaz proteinskega nivoja izražanja katalitičnih podenot ($\beta 1$, $\beta 2$ in $\beta 5$) proteasoma v LCL celičnih linijah po prenosu western in detekciji s specifičnimi protitelesi. Membrane (A, B, C, D in E) prikazujejo posamezno LCL celično linijo v dveh bioloških ponovitvah (označene s številko 1 in 2). *Ip*; izoliran encim imunoproteasom.



Slika 10: Prikaz proteinskega nivoja izražanja katalitičnih podenot ($\beta 1i$, $\beta 2i$ in $\beta 5i$) imunoproteasoma v LCL celičnih linijah po prenosu western in detekciji s specifičnimi protitelesi. Membrane (A, B, C, D in E) prikazujejo posamezno LCL celično linijo v dveh bioloških ponovitvah (označene s številko 1 in 2). Ip; izoliran encim imunoproteasom.

Rezultati povprečnega izražanja posamezne podenote so prikazani na sliki 11.



Slika 11: Povprečno relativno izražanje posameznih katalitičnih podenot proteasoma in imunoproteasoma v celotni proučevani populaciji LCL. Stolpci prikazujejo povprečne vrednosti z dodanimi intervali napak, ki ponazarjajo standardno deviacijo povprečnih vrednosti. Nad stolpci so prikazane statistično značilne razlike med povprečnimi vrednostmi posameznih podenot z * ($p < 0,05$).

Pričakovali smo, da se bodo katalitične imunoproteasomske podenote izražale višje kot proteasomske, saj so LCL celice imunskega sistema, katere običajno imunoproteasom izražajo v večji meri kot proteasom. Opazimo, da se podenote imunoproteasoma – $\beta 1i$, $\beta 2i$ in $\beta 5i$ res izražajo višje (1.10, 1.50, 1.48) kot njihove homologne podenote v proteasomu – $\beta 1$, $\beta 2$ in $\beta 5$ (0.71, 1.16, 0.79). Standardne deviacije so precej velike, še posebej pri podenoti $\beta 2i$ (1.02), kar nakazuje večjo interindividualno variabilnost. Med izražanjem imunoproteasomskih podenot nismo dokazali statistično značilnih razlik, medtem ko obstaja statistično značilna razlika med proteasomskima podenotama $\beta 1$ – $\beta 2$.

Za nadaljnjo statistično analizo smo potrebovali normalno porazdeljene spremenljivke. Štiri podenote so se porazdeljevale normalno ($\beta 1$, $\beta 5$, $\beta 1i$, $\beta 5i$), dve pa nenormalno ($\beta 2$ in $\beta 2i$). Zato smo za slednji izvedli transformacijo, ki je vodila v normalno porazdeljevanje. Za $\beta 2i$

podenoto so to bile obratne vrednosti povprečnih vrednosti izražanja ($1/Y$), za $\beta 2$ podenoto pa smo normalno porazdelitev dobili po logaritmiranju ($\log Y$) vrednosti. Želeli smo ugotoviti ali obstajajo statistično značilne korelacije med povprečnimi vrednostmi izražanja posameznih podenot, zato smo izračunali vrednosti Pearsonovega koeficienta in vrednosti faktorja pomembnosti p , ki so navedene v preglednici VI.

Preglednica VI: Korelacije med posameznimi pari podenot. *Nesignifikantne korelacije so označene z (ns).*

Par podenot	Vrednost p	Pearsonov korelacijski koeficient
$\beta 1 - \beta 5$	0,002	0,541
$\beta 1 - \beta 2$	0,011	0,467
$\beta 5 - \beta 5i$	0,016	0,445
$\beta 2 - \beta 5$	0,022	0,425
$\beta 1i - \beta 5i$	0,112 (ns)	0,302
$\beta 2 - \beta 1i$	0,142 (ns)	0,279
$\beta 1 - \beta 5i$	0,552 (ns)	0,115
$\beta 5 - \beta 1i$	0,626 (ns)	0,095
$\beta 1 - \beta 1i$	0,774 (ns)	0,056
$\beta 2 - \beta 2i$	0,980 (ns)	-0,005
$\beta 5i - \beta 2$	0,874 (ns)	-0,031
$\beta 1 - \beta 2i$	0,601 (ns)	-0,101
$\beta 1i - \beta 2i$	0,298 (ns)	-0,200
$\beta 5 - \beta 2i$	0,011	-0,464
$\beta 2i - \beta 5i$	$8 * 10^{-5}$	-0,665

Iz preglednice lahko razberemo, da obstajajo statistično značilne korelacije med nekaterimi podenotami. Več statistično značilnih korelacij smo ugotovili med izražanjem proteasomskih podenot ($\beta 1 - \beta 5$, $\beta 1 - \beta 2$, $\beta 2 - \beta 5$) kot med izražanjem imunoproteasomskih podenot ($\beta 2i - \beta 5i$). Od teh statistično značilno negativno korelirata dva para podenot ($\beta 5 - \beta 2i$ in $\beta 2i - \beta 5i$), čeprav smo pričakovali, da bo več negativnih korelacij med pari proteasomska-imunoproteasomska podenota. Povečano izražanje podenot imunoproteasoma je načeloma namreč povezano z znižanim izražanjem podenot proteasoma.

4.1.1. Identifikacija krajnih celičnih linij glede na nivo izražanja posamezne podenote (imuno)proteasoma

V okviru magistrske naloge smo želeli identificirati celične linije LCL, ki največ in tiste, ki najmanj izražajo posamezne katalitične podenote proteasoma in imunoproteasoma. Za vsako podenoto smo izrisali graf, na katerem so celične linije razvrščene od najmanjšega do največjega izražanja posamezne podenote (sliki 12 in 13).

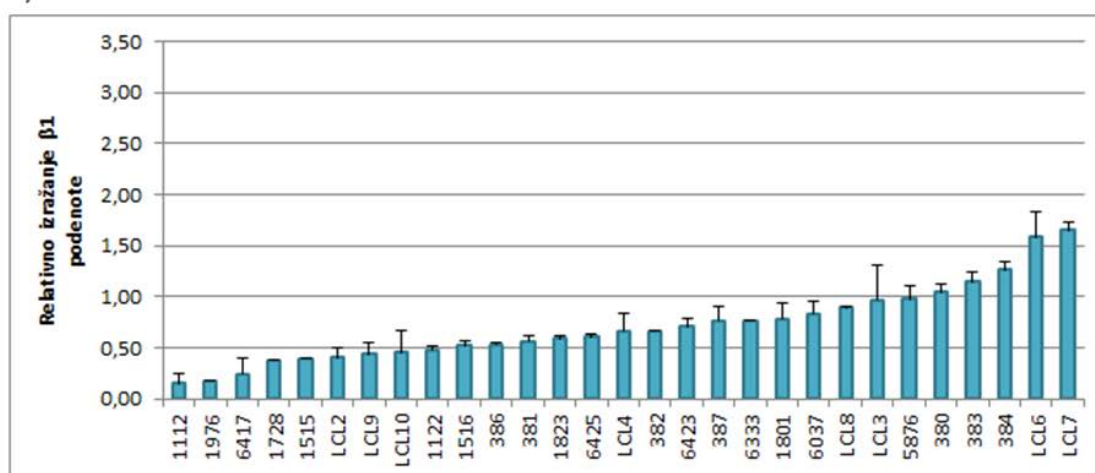
Zaradi interindividualnih razlik v izražanju posameznih podenot so tudi odzivi na posamezno učinkovino lahko različni. Preko modelov, ki izkazujejo različno izražanje podenote lahko preverimo, kakšna bo razlika v terapevtskem učinku glede na stopnjo proteinskega izražanja izbrane podenote. V primeru večjih razlik bi bilo z namenom izboljšanja bolnikove obravnave dobro pretehtati ali je terapija z izbrano učinkovino smiselna in če je, individualizirati odmerjanje. Krajne celične linije lahko uporabimo tudi pri raziskovanju vpliva posamezne učinkovine na proteinski nivo katalitičnih podenot proteasomov. Za posamezno podenoto smo identificirali tri krajne celične linije od 29-tih preučevanih in jih prikazali v preglednici VII.

Preglednica VII: Celične linije z najnižjo in najvišjo ekspresijo posamezne katalitične podenote s podanim povprečjem in SD.

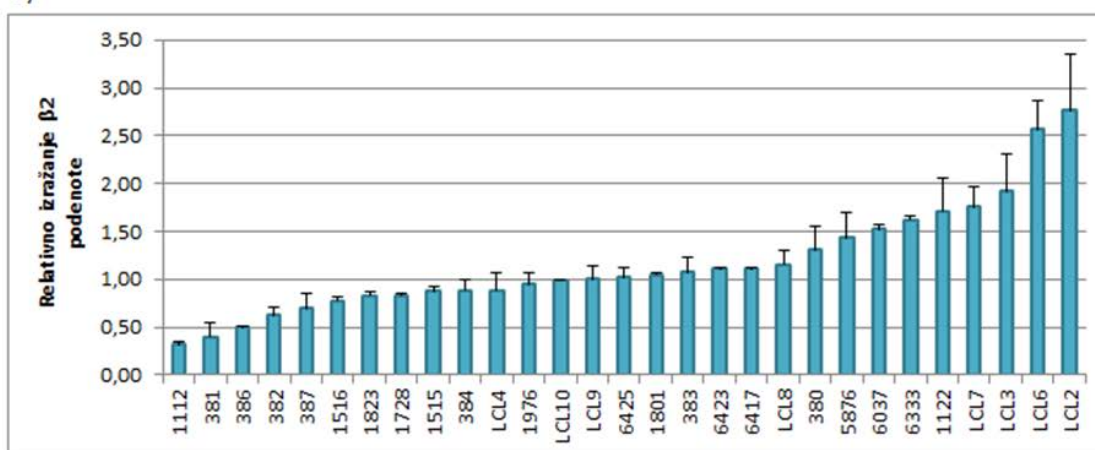
Oznaka podenote	Celične linije z najnižjo proteinsko ekspresijo posamezne podenote		Celične linije z najvišjo proteinsko ekspresijo posamezne podenote	
	Identifikacijska oznaka LCL	Povprečje $\pm$ SD	Identifikacijska oznaka LCL	Povprečje $\pm$ SD
$\beta 1$	1112 1976 6417	$0,19 \pm 0,05$	384 LCL6 LCL7	$1,50 \pm 0,21$
$\beta 2$	1112 381 386	$0,40 \pm 0,09$	LCL3 LCL6 LCL2	$2,42 \pm 0,44$
$\beta 5$	6417 1976 1516	$0,22 \pm 0,06$	LCL6 LCL2 383	$1,43 \pm 0,15$
$\beta 1i$	386 387 1122	$0,20 \pm 0,18$	LCL3 LCL10 383	$1,83 \pm 0,06$
$\beta 2i$	1801 1516 LCL9	$0,73 \pm 0,13$	382 384 383	$3,85 \pm 2,05$
$\beta 5i$	1801 6037 1516	$0,60 \pm 0,12$	1515 LCL2 383	$2,62 \pm 0,42$

Opazimo lahko, da je več celičnih linij hkrati identificiranih kot krajnih pri več podenotah. Za celično linijo LCL6 je značilno visoko izražanje vseh treh proteasomskih podenot, medtem ko celična linija 383 izkazuje najvišji nivo imunoproteasomskih podenot. Glede na to, da visoko izraža podenoto $\beta 5i$, nismo pričakovali, da bo tako visoko tudi izražanje $\beta 5$ podenote. Nasprotno celična linija 1516 zelo nizko izraža podenoti $\beta 5$ in $\beta 5i$.

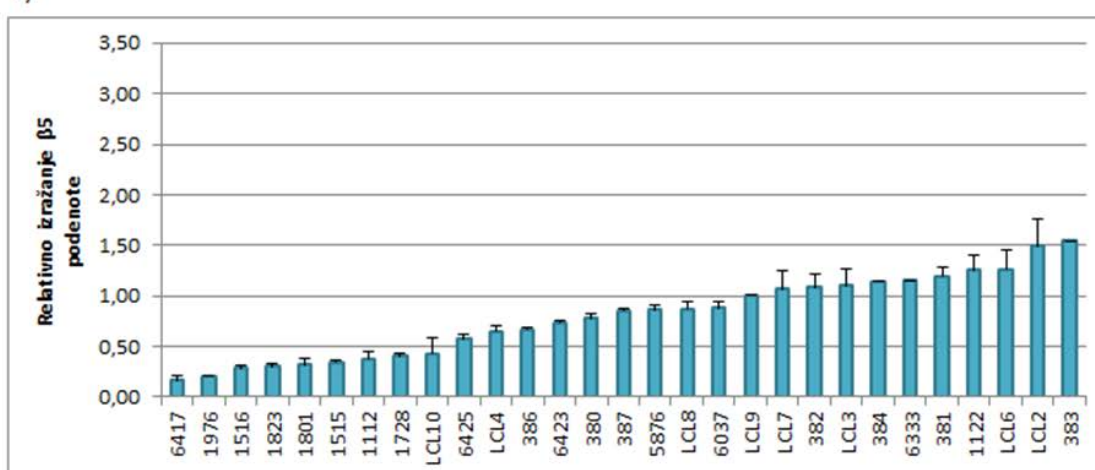
a)



b)

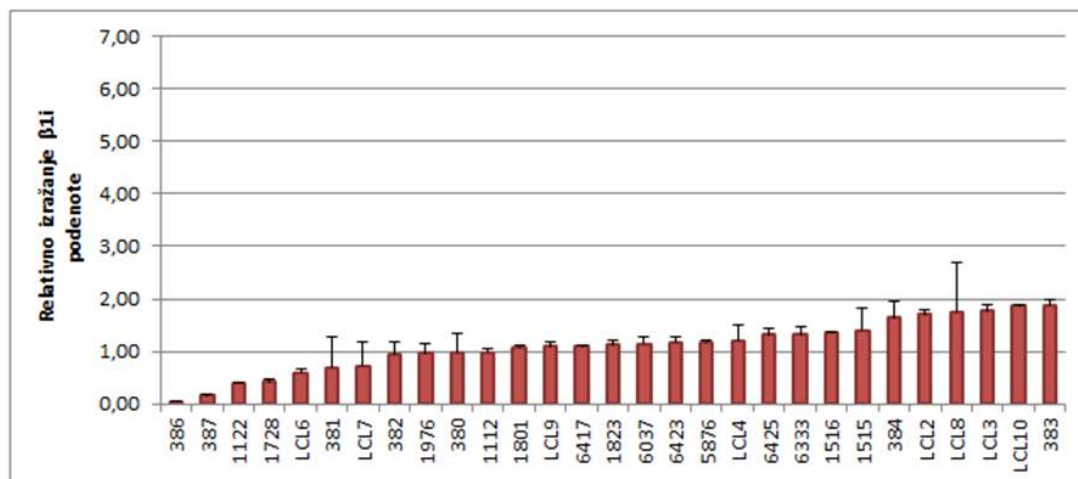


c)

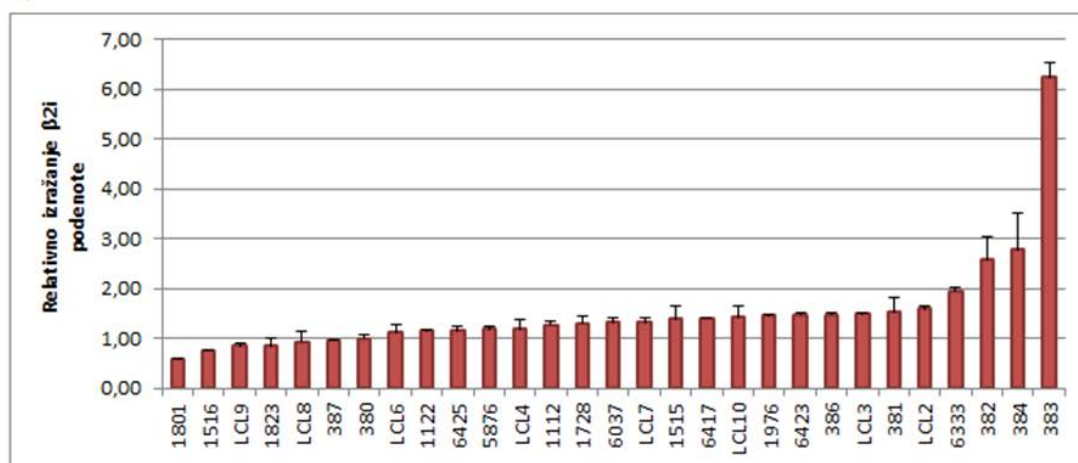


Slika 12: Relativno izražanje katalitičnih podenot proteasoma: $\beta 1$ (a), $\beta 2$ (b) in $\beta 5$ (c). Intervali napak predstavljajo SD povprečnih vrednosti dveh bioloških ponovitev. Na x osi so označene identifikacijske kode celičnih linij LCL.

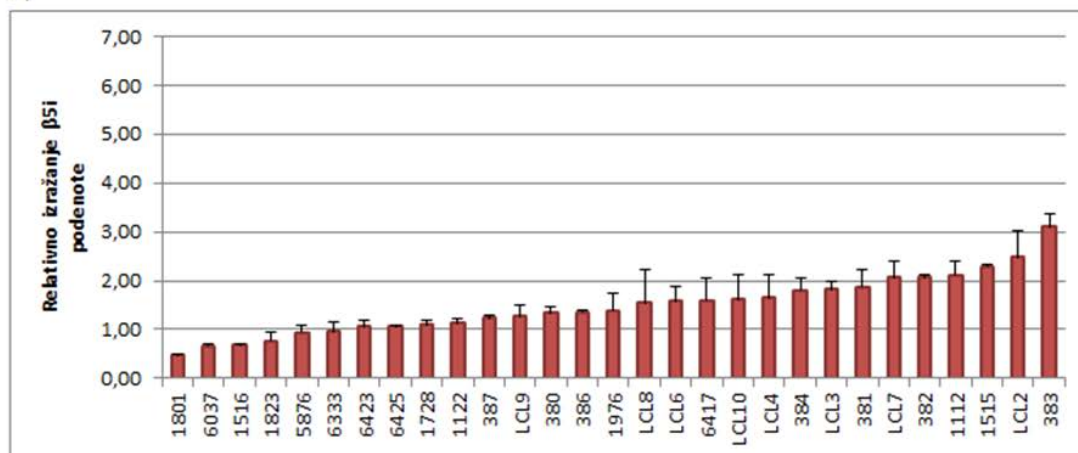
a)



b)



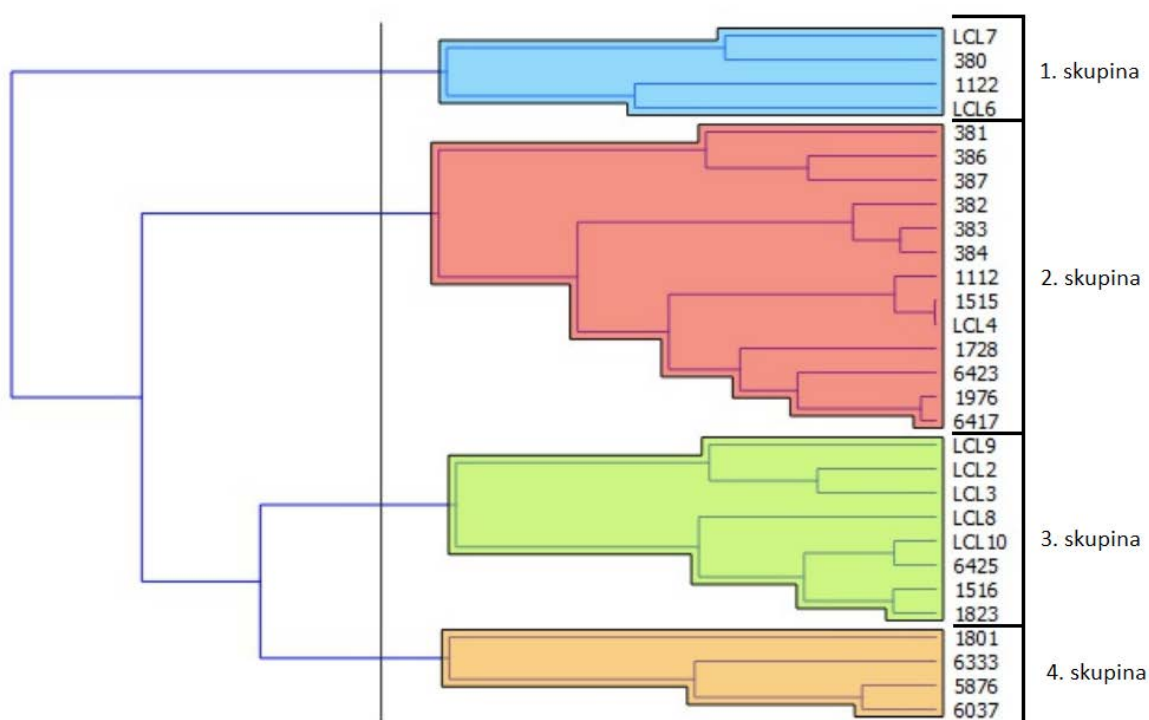
c)



Slika 13: Relativno izražanje katalitičnih podenot imunoproteasoma: $\beta 1i$ (a), $\beta 2i$ (b) in $\beta 5i$ (c). Intervali napak predstavljajo SD povprečnih vrednosti dveh bioloških ponovitev. Na x osi so označene identifikacijske kode celičnih linij LCL.

4.1.2. Hierarhično razvrščanje LCL celičnih linij glede na sorodnost

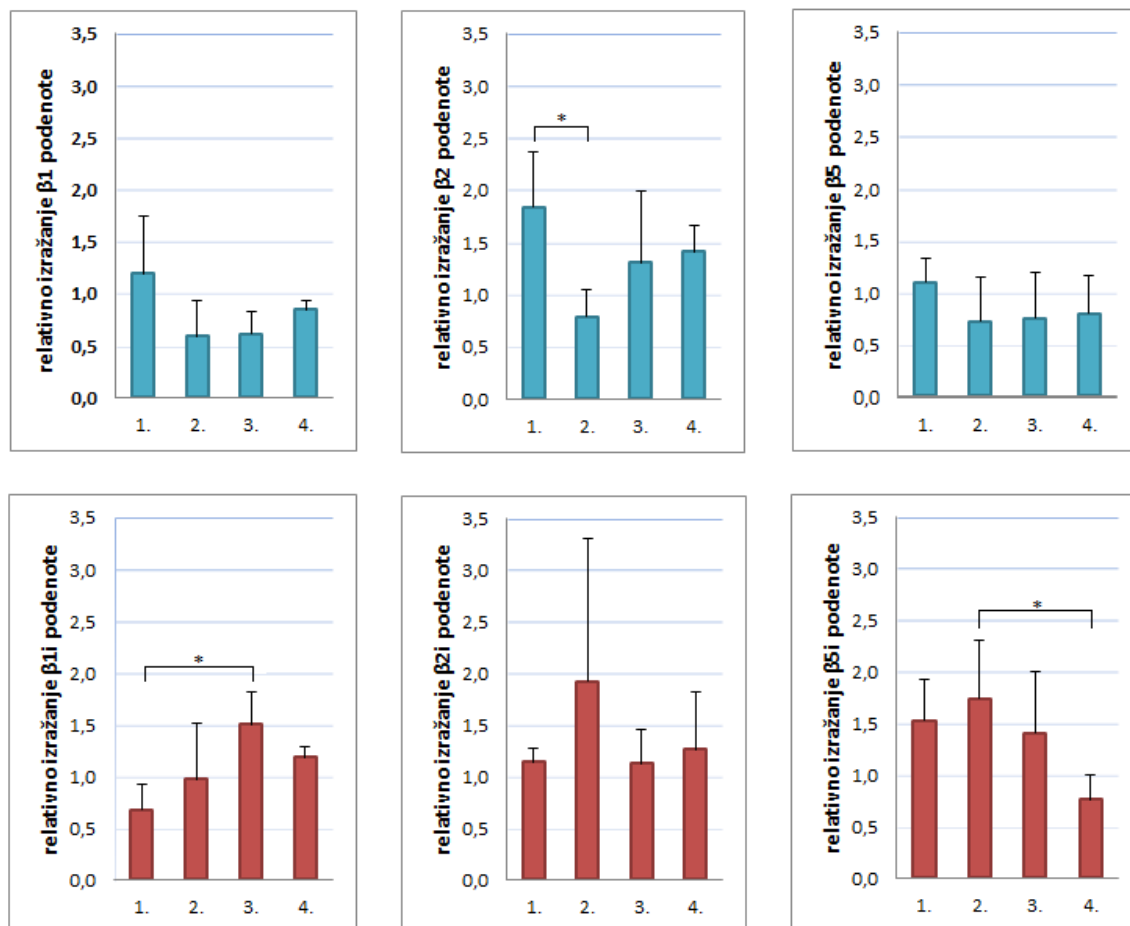
V nadaljevanju smo želeli podrobneje opredeliti skupne značilnosti na podlagi vseh šestih preučevanih podenot, da bi s tem dobili vpogled na širšo sliko našega eksperimenta. Grafi, ki ponazarjajo izražanje posamezne katalitične podenote, namreč omogočajo vrednotenje le na podlagi enega opazovanega dejavnika. Na tak način težko ovrednotimo večje število podatkov, zato smo postopek združevanja v skupine glede na skupne značilnosti izvedli s pomočjo programske opreme Orange. Rezultat tega postopka – hierarhijo skupin, smo ponazorili z dendrogramom (slika 14). Celične linije, ki so na dendrogramu bližje skupaj, izkazujejo večjo medsebojno sorodnost.



Slika 14: Hierarhična razvrstitev preučevanih LCL celičnih linij v skupine (dendrogram) glede na izražanje katalitičnih podenot imunoproteasoma in proteasoma.

Odločili smo se, da za nadaljnje statistično vrednotenje dendrogram odrežemo v točki, ki celične linije razdeli v 4 skupine celotne populacije. Na podlagi hierarhičnega drevesa bi opazovane celične linije lahko razvrstili tudi v več skupin, a bi bile potem le-te premajhne za statistično analizo. Pristop razvrščanja v skupine in opredelitev njihovih značilnosti je potreben za nadaljnjo uporabo LCL celičnih linij kot modelov pri raziskovanju funkcije proteasoma in vrednotenju potencialnih novih zaviralcev proteasoma. Pričakujemo, da bodo celične linije v isti skupini izkazovale podobne odzive po izpostavitvi zaviralcu proteasoma.

Da bi ugotovili, katere so značilnosti posamezne skupine in kako se skupine med seboj razlikujejo, smo pripravili stolpčne diagrame, ki prikazujejo povprečno relativno izražanje posamezne podenote znotraj skupine (slika 15).

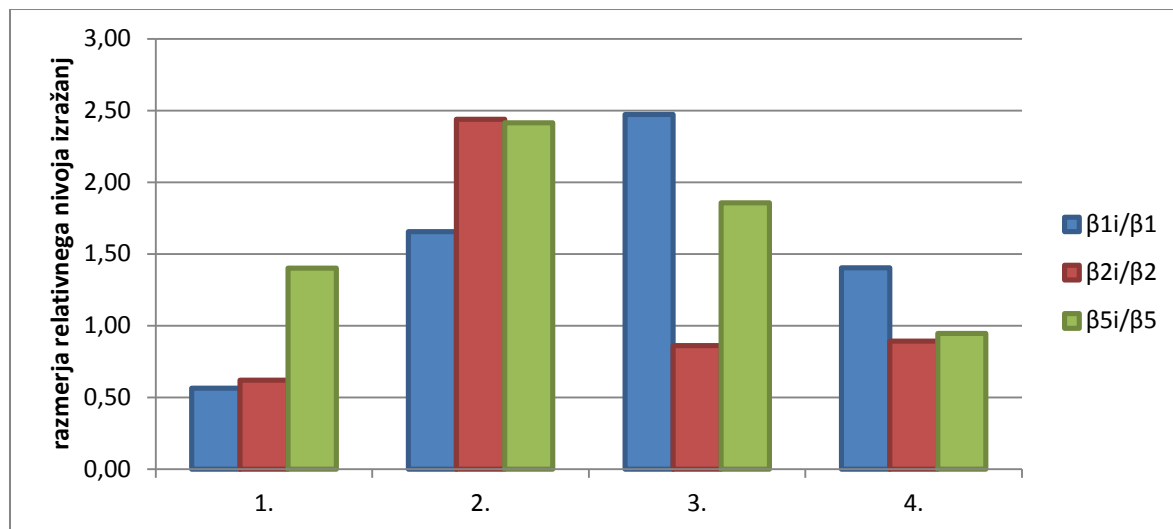


Slika 15: Povprečne relativne vrednosti izražanja posamezne podenote znotraj skupine (stolpčni diagrami). Na x-osi so navedene skupine, na y-osi pa relativne vrednosti izražanja posamezne podenote. Intervali napak predstavljajo SD povprečnih vrednosti izražanj posameznih podenot znotraj skupine. Statistično značilne razlike so označene z * ($p < 0,05$).

1. skupina sicer izkazuje trend najvišje stopnje izražanja vseh proteasomskih podenot v primerjavi z ostalimi skupinami, a je edina signifikantna razlika prisotna v izražanju β2 podenote med 1. in 2. skupino.

Več razlik opazimo pri izražanju imunoproteasomskih podenot. Za 2. skupino je značilno višje izražanje β2i in β5i podenote, medtem ko v 3. skupini opazimo povišano izražanje β1i podenote. Za 1. skupino je značilna nizka prisotnost β1i podenote, medtem ko so v četrti

skupini LCL, ki imajo nizko stopnjo $\beta 5i$ podenote. Signifikantni razlike v izražanju opazimo le med 1. in 3. skupino za podenoto $\beta 1i$ in med 2. in 4. skupino za podenoto $\beta 5i$.



Slika 16: Prikaz razmerja $\beta 1i/\beta 1$, $\beta 2i/\beta 2$ in $\beta 5i/\beta 5$ (stolpčni diagram).

Zgoraj opisano analizo smo razširili z določanjem razmerja izražanj proteasomskih katalitičnih podenot in homolognih imunoproteasomskih podenot v posameznih skupinah (slika 16). Prva skupina izstopa z nizkimi razmerji $\beta 1i/\beta 1$ in $\beta 2i/\beta 2$, in sicer se omenjeni imunoproteasomski podenoti izražata približno 0.6-krat nižje kot njuni homologni proteasomski podenoti. V to skupino (t.j. 1. skupina) so bile s programom Orange razvrščene le štiri celične linije od 29-tih. Nasprotno je bilo v 2. skupino razvrščenih največ celičnih linij, t. j. 13. Druga skupina izkazuje pričakovane lastnosti LCL celičnih linij - znatno višje izražanje imunoproteasomskih podenot v primerjavi s proteasomskimi podenotami in posledično visoka razmerja, še posebej $\beta 2i/\beta 2$ in $\beta 5i/\beta 5$. Tretja skupina izkazuje nizko razmerje $\beta 2i/\beta 2$ ter visoki razmerji $\beta 1i/\beta 1$ in $\beta 5i/\beta 5$, medtem ko sta pri 4. skupini razmerji $\beta 2i/\beta 2$ in $\beta 5i/\beta 5$ manjši od $\beta 1i/\beta 1$.

Diferencialno izražanje nivojev proteasomskih in imunoproteasomskih podenot in različna razmerja med njimi pri različnih patoloških stanjih prispevajo k različni občutljivosti na zaviralce proteasoma. Znanstveniki so že dokazali, da povišana razmerja $\beta 1i/\beta 1$, $\beta 2i/\beta 2$ in $\beta 5i/\beta 5$ pri bolnikih z akutno limfoblastno levkemijo in akutno mieloično levkemijo korelirajo s povečano občutljivostjo na bortezomib. Pacienti z akutno mieloično levkemijo, ki so dosegli

popolno remisijo po kombinirani terapiji z vključenim bortezomibom so prav tako pred začetkom terapije imeli višje razmerje imunoproteasomskih/proteasomskih podenot kot pacienti, ki niso dosegli popolne remisije [54]. Iz tega lahko sklepamo, da za učinkovito terapijo s proteasomskimi inhibitorji ni pomemben le visok celični nivo imunoproteasomskih podenot, ampak tudi visoko razmerje med imunoproteasomskimi in proteasomskimi podenotami. Omenjena razmerja bi kot potencialni biomarker lahko služila za pomoč pri izbiri pacientov, ki bi imeli dober odziv na zdravljenje z zaviralci proteasoma, prav tako bi lahko olajšal spremljanje pridobljene rezistence med terapijo. Za nadaljnja raziskovanja razmerij podenot in opredelitev uporabe, so zaradi enostavnega gojenja in nizkih stroškov primerne celične linije LCL.

Na podlagi ugotovljenih lastnosti celičnih linij 2. skupine, ki izkazujejo izrazito povišani razmerji $\beta 2i/\beta 2$ in $\beta 5i/\beta 5$ ter hkrati izražajo najvišji nivo podenot $\beta 2i$ in $\beta 5i$ v primerjavi z drugimi skupinami, bi jih lahko uporabili kot modelni sistem pri prihodnjih vrednotenjih specifičnih zaviralcev podenot $\beta 2i$ in $\beta 5i$.

Podenota $\beta 5i$ je najbolj proučevana in okarakterizirana izmed vseh treh katalitičnih podenot imunoproteasoma. Povečana aktivnost omenjene podenote je prisotna pri nekaterih boleznih, zato predstavlja potencialno terapevtsko tarčo. Izvedenih je bilo več študij, ki so proučevale vpliv selektivnih zaviralcev $\beta 5i$ podenote na potek bolezni ali pa vpliv odsotnosti te podenote v modelih z izbitim genom. Prvi znani selektivni inhibitor $\beta 5i$ podenote je ONX 0914. Preiskave so pokazale velik potencial njegove uporabe pri zdravljenju avtoimunskih in vnetnih bolezni. Tarčna inhibicija $\beta 5i$ podenote v mišjih modelih revmatoidnega artritisa *in vivo* je vodila do statistično značilnega terapevtskega izboljšanja, predvsem preko znižanja koncentracije provnetnih citokinov (IL-23, TNF α) v aktiviranih monocitih. ONX 0914 je zmanjšal sekrecijo provnetnih citokinov in ustavil izgubo telesne teže v živalskih modelih kolitisa. Spodbudni so tudi izsledki raziskave vpliva te učinkovine na napredovanje sistemskega eritromatoznega lupusa. ONX 0914, ki zaradi selektivnega delovanja potencialno izkazuje manj sistemskih neželenih učinkov, je pri tej bolezni izkazoval enako učinkovitost kot bortezomib ali karfilzomib. Večjo selektivnost do podenote $\beta 5i$ kot ONX 0914 izkazuje učinkovina PR-924. Zanimivo je, da je bil za citotoksičen učinek na celičnih modelih poleg PR-924 potreben tudi dodatek inhibitorja podenote $\beta 5$ ali pa izbitje gena za podenoto $\beta 5$ [41]. Celične linije iz 2. skupine so zaradi visokega nivoja podenote $\beta 5i$ primerne za nadaljnje raziskave selektivnih zaviralcev imunoproteasomske podenote $\beta 5i$, ki glede na izsledke

izkazujejo visok potencial za uporabo v farmakoterapiji širokega spektra vnetnih in avtoimunskih bolezni.

Katalitična podenota imunoproteasoma $\beta 2i$ je manj raziskana kot podenota $\beta 5i$, kar je razvidno iz manjšega nabora dostopne literature o njej. V študiji na mišjih modelih z inducirano hipertenzijo so ugotovili, da je izbitje gena za podenoto $\beta 2i$ statistično značilno zmanjšalo srčno fibrozo in vnetje, ki prispeva k nastanku fibroze. Najverjetneje je tak rezultat posledica inhibicije NF- κ B signalne poti, zmanjšanje nivoja vnetnih citokinov, kemokinov in adhezijskih molekul, ki imajo ključno vlogo pri progresiji hipertenzije in srčne fibroze [55]. Izsledki preiskave potrjujejo vpliv podenote $\beta 2i$ na napredovanje srčne fibroze in večje izražanje omenjene podenote v srčnem tkivu, zato morebitni selektivni inhibitorji podenote $\beta 2i$ predstavljajo potencialen terapevtski pristop pri zdravljenju omenjene bolezni. Glede na to, da je vloga podenote $\beta 2i$ pri različnih patofizioloških procesih še neznana, bi bilo smiselno izvesti dodatne študije, za kar bi lahko uporabili celične linije LCL iz 2. skupine, ki izraža visoko razmerje $\beta 2i/\beta 2$ in hkrati visok nivo $\beta 2i$ podenote.

5. SKLEP

V magistrskem delu smo vrednotili proteinski nivo proteasomskih ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$) in imunoproteasomskih ($\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$) katalitičnih podenot v limfoblastoidnih celičnih linijah. Z uporabo denaturacijske poliakrilamidne gelske elektroforeze in prenosa western ter specifičnih protiteles, smo določili relativni nivo izražanja posamezne podenote. Po analizi podatkov smo prišli do sledečih dognanj:

- Povprečen nivo imunoproteasomskih katalitičnih podenot je višji v primerjavi z nivojem homolognih proteasomskih podenot.
- Celotno populacijo celičnih linij smo glede na sorodnost razdelili v 4 skupine:
- 1. skupina izkazuje najvišjo stopnjo izražanja vseh proteasomskih podenot v primerjavi z ostalimi skupinami. Poleg tega je zanjo značilno nizko izražanje podenote $\beta 1i$.
- Z visokim izražanjem imunoproteasomskih podenot napram proteasomskim podenotam izstopajo celične linije 2. skupine. Izkazujejo izrazito povišani razmerji $\beta 2i/\beta 2$ in $\beta 5i/\beta 5$ ter hkrati najvišji nivo podenot $\beta 2i$ in $\beta 5i$ v primerjavi z drugimi skupinami.
- V 3. skupini se celične linije od drugih razlikujejo po najvišjem izražanju podenote $\beta 1i$, medtem ko so v 4. skupini LCL, ki imajo nizko stopnjo izražanja podenote $\beta 5i$.

S poznavanjem ugotovljenih lastnosti LCL lahko v prihodnosti posamezne celice uporabimo za raziskovanje funkcije posameznih podenot (imuno)proteasoma in vrednotenje njihovih specifičnih zaviralcev.

6. VIRI IN LITERATURA

1. Chowdhury, M., Enenkel, C. Intracellular Dynamics of the Ubiquitin-Proteasome-System. 4:367 (2015).
2. Amm, I., Sommer, T. & Wolf, D. H. Protein quality control and elimination of protein waste: The role of the ubiquitin–proteasome system. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1843, 182-196 (2014).
3. Gupta, I., Singh, K., Varshney, N. K. & Khan. S. Delineating Crosstalk Mechanisms of the Ubiquitin Proteasome System That Regulate Apoptosis. *Front. Cell Dev. Biol.* 6:11 (2018)
4. Woojin, L. & Kyung B. K. The Immunoproteasome: An Emerging Therapeutic Target. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 11, 2923-2930 (2011).
5. Ciechanover, A. Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Cell Death and Differentiation*. 12, 1178-1190 (2005).
6. Yewdell, J. W. Immunoproteasomes: Regulating the regulator. *PNAS*. 102, 9089-9090 (2005).
7. Kisselev, A. F., van der Linden, W. A. & Overkleeft, H. S. Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target. *Chem Biol*. 19, 99-115 (2012).
8. Raynes, R., Pomatto, L. C. D. & Davies, K. J. A. Degradation of oxidized proteins by the proteasome: Distinguishing between the 20S, 26S, and immunoproteasome proteolytic pathways. *Molecular Aspects of Medicine*. 50, 41-55 (2016).
9. Vigneron, N., Abi Habib J. & Van den Eynde B. J. Learning from the Proteasome How To Fine-Tune Cancer Immunotherapy. *Trends Cancer*. 3, 726-741 (2017).
10. Vigneron, N. & Van den Eynde B. J. Proteasome subtypes and regulators in the processing of antigenic peptides presented by class I molecules of the major histocompatibility complex. *Biomolecules*. 4, 994-1025 (2014).
11. Schmidt, M. & Finley, D. Regulation of proteasome activity in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1843, 13–25 (2014).
12. Nitta, T., Murata, S., Sasaki, K., Fujii, H., Ripen, A. M., Ishimaru, N., e tal. Thymoproteasome shapes immunocompetent repertoire of CD8+ T cells. *Immunity*. 32, 29-40 (2010).
13. Fort, P., Kajava A. V., Delsuc, F. & Coux, O. Evolution of Proteasome Regulators in Eukaryotes. *Genome Biol Evol*. 7, 1363-79 (2015).

14. Collins, G. A. & Goldberg, A. L. The Logic of the 26S Proteasome. *Cell*. 169, 792-806 (2017).
15. Tanaka, K. The proteasome: from basic mechanisms to emerging roles. *Keio J Med*. 62, 1-12 (2013).
16. Bard, J. A.M., Goodall, E. A., Greene, E. R., Jonsson, E., Dong, K. C. & Martin, A. Structure and Function of the 26S Proteasome. *Annu. Rev. Biochem.* 87, 1–27 (2018).
17. Wang, X., Cimermancic, P., Yu, C., Schweitzer, A., Chopra N., Engel, J. L., et al. Molecular Details Underlying Dynamic Structures and Regulation of the Human 26S Proteasome. *Mol Cell Proteomics*. 16, 840-854 (2017).
18. Warnatsch, A., Bergann, T. & Krüger, E. Oxidation matters: The ubiquitin proteasome system connects innate immune mechanisms with MHC class I antigen presentation. *Mol Immunol*. 55, 106-9 (2013).
19. Yang, Y. Generation of major histocompatibility complex class I antigens. *Microbes Infect*. 5, 39-47 (2003).
20. York, I. A., Rock, K. L. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol.*;14, 369-96 (1996).
21. Heath, W. R., Belz, G. T., Behrens, G. M., Smith, C. M., Forehan, S. P., Parish, I. A., et al. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev*. 199, 9-26 (2004).
22. Kincaid, E. Z., Che, J. W., York, I., Escobar, H., Reyes-Vargas, E., Delgado, J. C., Welsh, R. M., et al. Mice completely lacking immunoproteasomes show major changes in antigen presentation. *Nat Immunol*. 13, 129-35 (2011).
23. Chapiro, J., Claverol, S., Piette, F., Ma, W., Stroobant, V., Guillaume, B., et al. Destructive cleavage of antigenic peptides either by the immunoproteasome or by the standard proteasome results in differential antigen presentation. *J Immunol*. 176, 1053-61 (2006).
24. Fei, C., Vince, C. & Xianglin, S. New Insights into the Role of Nuclear Factor- κ B in Cell Growth Regulation. *Am J Pathol*. 159: 387–397 (2001).
25. Luqman, S. & Pezzuto, J. M. NF κ B: A Promising Target for Natural Products in Cancer Chemoprevention. *Phytother Res*. 24, 949-63 (2010).
26. Ebstein, F., Kloetzel, P. M., Krüger, E., Seifert, U. Emerging roles of immunoproteasomes beyond MHC class I antigen processing. *Cell Mol Life Sci*. 69, 2543-58 (2012).

27. McCarthy, M. K. & Weinberg, J. B. The immunoproteasome and viral infection: a complex regulator of inflammation. *Front Microbiol.* 6:21 (2015).
28. Santoro, M. G., Rossi, A., Amici, C. NF- κ B and virus infection: who controls whom. *EMBO J.* 22, 2552-60 (2003).
29. Robek, M. D., Garcia, M. L., Boyd, B. S. & Chisari, F. V. Role of immunoproteasome catalytic subunits in the immune response to hepatitis B virus. *J Virol.* 81, 483-91 (2007).
30. Fitzpatrick, L. R., Khare, V., Small, J. S. & Koltun, W. A. Dextran sulfate sodium-induced colitis is associated with enhanced low molecular mass polypeptide 2 (LMP2) expression and is attenuated in LMP2 knockout mice. *Dig Dis Sci.* 51, 1269-76 (2006).
31. Barton, L. F., Cruz, M., Rangwala, R., Deepe, G. S. Jr & Monaco, J. J. Regulation of immunoproteasome subunit expression in vivo following pathogenic fungal infection. *J Immunol.* 169, 3046-52 (2002).
32. Gao, G. & Luo, H. The ubiquitin-proteasome pathway in viral infections. *Can J Physiol Pharmacol.* 84, 5-14 (2006).
33. Rosenblum, M. D., Gratz, I. K., Paw, J. S. & Abbas, A. K. Treating human autoimmunity: current practice and future prospects. *Sci Transl Med.* 4, 125sr1 (2012).
34. Basler, M., Mundt, S., Bitzer, A., Schmidt, C. & Groettrup, M. The immunoproteasome: a novel drug target for autoimmune diseases. *Clin Exp Rheumatol.* 33, S74-9 (2015).
35. Moran, E., Carbone, F., Augusti, V., Patrone, F., Ballestrero, A. & Nencioni, A. Proteasome inhibitors as immunosuppressants: biological rationale and clinical experience. *Semin Hematol.* 49, 270-6 (2012).
36. 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 (2015).
37. Basler, M., Mundt, S., Muchamuel, T., Moll, C., Jiang, J., Groettrup, M., Kirk, C. J. Inhibition of the immunoproteasome ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *EMBO Mol Med.* 6, 226-38 (2014).
38. Everly, J. J., Walsh, R. C., Alloway, R. R. & Woodle, E. S. Proteasome inhibition for antibody-mediated rejection. *Curr Opin Organ Transplant.* 14, 662-6 (2009).

39. Li, J., Basler, M., Alvarez, G., Brunner, T., Kirk, C. J. & Groettrup, M. Immunoproteasome inhibition prevents chronic antibody-mediated allograft rejection in renal transplantation. *Kidney Int.* 93, 670-680 (2018).
40. Teicher, B. A. & Tomaszewski, J. E. Proteasome inhibitors. *Biochem Pharmacol.* 96, 1-9. (2015).
41. Miller, Z., Ao, L., Kim, K. B. & Lee, W. Inhibitors of the immunoproteasome: current status and future directions. *Curr Pharm Des.* 19, 4140-51 (2013).
42. Koerner, J., Brunner, T. & Groettrup, M. Inhibition and deficiency of the immunoproteasome subunit LMP7 suppress the development and progression of colorectal carcinoma in mice. *Oncotarget.* 8, 50873-50888 (2017).
43. Jansen, A. H., Reits, E. A. & Hol, E. M. The ubiquitin proteasome system in glia and its role in neurodegenerative diseases. *Front Mol Neurosci.* 7:73 (2014).
44. Im, E. & Chung, K. C. Precise assembly and regulation of 26S proteasome and correlation between proteasome dysfunction and neurodegenerative diseases. *BMB Rep.* 49, 459-73 (2016).
45. Cloos, J., Roeten, M. S., Franke, N. E., van Meerloo, J., Zweegman, S., Kaspers, G. J., et al. (Immuno)proteasomes as therapeutic target in acute leukemia. *Cancer Metastasis Rev.* 36, 599-615 (2017).
46. Muchamuel, T., Basler, M., Aujay, M. A., Suzuki, E., Kalim, K. W., Lauer, C., et al. A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nat Med.* 15, 781-787 (2009).
47. Markovič, T., Gobec, M., Gurwitz, D. & Mlinarič-Raščan, I. Characterization of human lymphoblastoid cell lines as a novel in vitro test system to predict the immunotoxicity of xenobiotics. *Toxicol. Lett.* 233, 8–15 (2015).
48. Sie, L., Loong, S. & Tan, E. K. Utility of lymphoblastoid cell lines. *J Neurosci Res.* 87, 1953-9 (2009).
49. DC Protein Assay Instruction Manual: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT448.pdf>. Datum dostopa: 2. 4. 2018
50. Voet DJ, Voet JG, Pratt CW: Principles of biochemistry, 3. izdaja, John Wiley & Sons, New York, 2008: 95, 101-103
51. Štrukelj B, Kos J: Biološka zdravila: od gena do učinkovine, 1. izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 144-146, 174, 178-180

52. Protein Characterization Outline:

http://oregonstate.edu/instruct/bb450/450material/stryer7/3/figure_03_07.jpg. Datum dostopa: 6. 4. 2018

53. iBlot™ 2 Dry Blotting system:

https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/iblot2_device_qrc.pdf. Datum dostopa: 8. 4. 2018

54. Niewerth, D., Franke, N. E., Jansen, G., Assaraf, Y. G., van Meerloo, J., Kirk C. J., et al. Higher ratio immune versus constitutive proteasome level as novel indicator of sensitivity of pediatric acute leukemia cells to proteasome inhibitors. *Haematologica*. 98, 1896-904 (2013).

55. Yan, W., Bi, H. L., Liu, L. X., Li, N. N., Liu, Y., Du, J., et al. Knockout of immunoproteasome subunit $\beta 2i$ ameliorates cardiac fibrosis and inflammation in DOCA/Salt hypertensive mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 490, 84-90 (2017).