

Toll-uslični receptori u patogenezi sistemskog eritemskog lupusa

Cepika, Alma-Martina

Doctoral thesis / Disertacija

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:923835>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-17**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)





Središnja medicinska knjižnica

Cepika, Alma-Martina (2012) *Toll-uslični receptori u patogenezi sistemskog eritemskog lupusa [Toll-like receptors in pathogenesis of systemic lupus erythematosus]*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/1806>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Alma-Martina Cepika

**Toll-uslični receptori u patogenezi
sistemskog eritemskog lupusa**

DISERTACIJA



Zagreb, 2012.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Alma-Martina Cepika

**Toll-u slični receptori u patogenezi
sistemskog eritemskog lupusa**

DISERTACIJA

Zagreb, 2012.

Disertacija je izrađena u Imunološkom zavodu d.d., Zagreb i Klinici za dječje bolesti Zagreb.

Voditelj rada: doc. dr. sc. Alenka Gagro, dr.med.

Rad je izrađen uz potporu Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske (projekt br. 072-1080229-0337, «Modulacija funkcije ljudskih regulacijskih T-limfocita», voditelj: doc.dr.sc. Alenka Gagro, dr.med.).

Zahvala

Od srca se zahvaljujem svojoj mentorici, Alenki Gagro, na prenesenom znanju, od rana pruženoj znanstvenoj samostalnosti, povjerenju i neprekidnom ustrajanju da postignem više no što sam mislila da mogu.

U znanost se ne bih zaljubila da nije bilo mojih kolega i prijatelja u laboratoriju – hvala Lili, Eli, Anđelku, Igoru, Mateji, Karin, Lidiji i Maji. Go Immunettes!

Sastanci i prezentacije na Imunološkom zavodu naučili su me znanstvenom mišljenju – hvala Sabini Rabatić, Renati Mažuran, Alemki Markotić, Dubravku Forčiću, Anti Sabioncellu i Ivni Svobodi-Beusan na svakoj upućenoj kritici. Nisam nakon toga nigdje susrela ovako intelektualno stimulirajuću i otvorenu sredinu.

Neizmjereno hvala još jednom kolegi i prijatelju, Kreši Bendelji, na golemoj velikodušnosti u podjeli svog bogatog znanja i potpori koju mi je pružao kad pokusi nisu uspjeli. Hvala na pomoći u eksperimentalnom radu i svim drugim kolegama s Odsjeka za celularnu imunologiju Imunološkog zavoda.

Također hvala Denisu Polančecu, živućoj enciklopediji protočne citometrije koji nesebično dijeli to znanje.

Hvala svim liječnicima i osoblju u suradnim kliničkim ustanovama koji su sudjelovali u regrutiranju bolesnika, prikupljanju uzoraka i kliničkih podataka za njihovu vjeru u znanost. Srdačno hvala svim bolesnicima koji su pristali sudjelovati u studiji: bez njih ova disertacija ne bi bila moguća.

Na kraju, od srca hvala mojim roditeljima i bratu, koji su me podržavali tijekom studija i znanstvenog rada iako me koštao puno vremena koje sam mogla provesti s njima.

Hvala Romainu, s kojim svaki trenutak života postaje čaroban.

Ovu disertaciju posvećujem svom najdražem, pokojnom didi Čedi.

Alma

SADRŽAJ

POPIS KRATICA.....	vi
UVOD	1
1.1. Autoimunost	1
1.2. Urođena imunost.....	4
1.2.1. Toll-u slični receptori	5
1.2.2. Ostali PRR.....	10
1.2.3. Kontrola adaptivne imunosti urođenim imunoreakcijama	12
1.3. Sistemski eritemski lupus.....	19
1.3.1. Genetski čimbenici rizika za SLE	20
1.3.2. Stanice imunološkog sustava u SLE-u.....	23
1.3.3. Medijatori patogeneze i oštećenja tkiva u SLE-u.....	26
1.3.4. Liječenje i prognoza SLE-a	27
HIPOTEZA I CILJEVI	31
MATERIJAL I METODE	32
3.1. Ispitanici.....	32
3.2. Laboratorijske metode	34
3.2.1. Uzorci krvi.....	34
3.2.2. Reagensi	35
3.2.3. Kultura stanica.....	35
3.2.4. ELISA	37
3.2.5. Protočna citometrija	37
3.2.6. Mjerenje fosforiliranog statusa proteina protočnom citometrijom.....	41
3.2.8. Određivanje polimorfizama pojedinačnih nukleotida lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu	42
3.2.9. Izolacija i kvantifikacija cirkulirajuće DNA iz seruma	42

3.2.9. Statistička analiza podataka	46
REZULTATI.....	48
4.1. Izražaj TLR9 u B-limfocitima, cirkulirajuća DNA, IL-10 i BAFF	48
4.1.1. Klorokin ne utječe na ekspresiju TLR9 u B-limfocitima	48
4.1.2. Klorokin smanjuje cirkulirajuću DNA u bolesnika sa SLE-om i inhibira TLR9-posredovanu aktivaciju B-limfocita.....	50
4.1.3. Terapija smanjuje razinu IL-10 u serumu SLE-bolesnika i produkciju IL-10 u kulturi PBMC-a	51
4.1.4. Koncentracija BAFF-a u serumu i lučenje BAFF-a u kulturama PBMC-a nisu modulirane klorokinom ni kortikosteroidima, već koreliraju s aktivnosti bolesti.....	53
4.2. Izražaj TLR4 na monocitima i utjecaj klorokina i kortikosteroida na aktivaciju monocita TLR4-ligandom lipopolisaharidom	57
4.2.1. Izražaj TLR4 na monocitima bolesnika sa SLE-om i zdravih kontrola	57
4.2.2. Utjecaj kortikosteroida i klorokina na izražaj TLR4 na monocitima zdravih kontrola	58
4.2.3. Utjecaj deksametazona i klorokina na aktivaciju TLR4-signalnog puta.....	60
4.2.4. Utjecaj deksametazona i klorokina na produkciju pro-upalnih citokina nakon aktivacije TLR4-signalnog puta	63
4.2.5. Korelacija izražaja TLR4 na monocitima i kliničkih parametara bolesnika sa SLE-om.....	66
4.3. Analiza polimorfizama promotera za TNF-a i IL-10 gene u bolesnika sa SLE-om i zdravih kontrola	68
4.4. Klinički podaci bolesnika sa SLE-om.....	69
RASPRAVA.....	70
5.1. Izražaj TLR9 u B-limfocitima i cirkulirajuće DNA te citokina stimulirajućih za B-limfocite u bolesnika sa SLE-om	70

5.2. Izražaj TLR4 na monocitima bolesnika sa SLE-om te utjecaj imunomodulatornih lijekova na aktivaciju TLR4 signalnog puta	76
ZAKLJUČCI	82
SAŽETAK	85
ABSTRACT	86
LITERATURA.....	87
ŽIVOTOPIS.....	119

POPIS KRATICA

7-AAD	od engl. <i>7-aminoactinomycinD</i> , 7-aminoaktinomicin D
ACR	od engl. <i>American College of Rheumatology</i> , Američki reumatološki kolegij
ANA	od engl. <i>anti-nuclear antibody</i> , anti-nuklearno antitijelo
APC	od engl. <i>antigen-presenting cell</i> , antigen-prezentirajuća stanica
BAFF	od engl. <i>B cell activating factor</i> , faktor aktivacije B-limfocita; sinonim je BlyS
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
BCR	od engl. <i>B-cell receptor</i> , B-limfocitni receptor
BFA	brefeldin A
BlyS	od engl. <i>B lymphocyte stimulator</i> , stimulator B-limfocita; sinonim je BAFF
bp	od engl. <i>base pair</i> , par baza
BSA	od engl. <i>bovine serum albumin</i> , goveđi serumski albumin
CD	od engl. <i>cluster of differentiation</i> , skup diferencijacije
CLR	od engl. <i>C-type lectin like receptor</i> , C-lektinima sličan receptor
CNS	od engl. <i>central nervous system</i> , središnji živčani sustav
CQ	klorokin
CRP	C-reaktivni protein
DAMP	od engl. <i>danger-associated molecular pattern</i> , molekularni uzorak opasnosti
DEX	deksametazon
DNA	od engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> , deoksiribonukleinska kiselina
dNTP	od engl. <i>deoxynucleotide 5' triphosphate</i> , deoksinukleotid 5'
trifosfat	
EBV	Epstein-Barr virus
EDTA	od engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> , etilendiamin tetraoctena kiselina
EGTA	od engl. <i>ethylene glycol tetraacetic acid</i> , etilenglikol tetraoctena kiselina
ELISA	od engl. <i>enzyme-linked immunoadsorbent assay</i> ; enzimski-posredovan imunoesej
FACS	od engl. <i>fluorescence-activated cell sorting</i> , sortiranje stanica aktivacijom fluorescencije
FBS	od engl. <i>fetal bovine serum</i> , serum goveđeg fetusa
FSC	od engl. <i>forward-scatter</i> , prednje raspršenje
HLA	od engl. <i>human leukocyte antigen</i> , ljudski leukocitni antigen
HMGB1	od engl. <i>high-mobility group box protein 1</i>
HSP	od engl. <i>heat-shock protein</i> , protein toplinskog šoka
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
IQR	od engl. <i>interquartile range</i> , inter-kvartilni raspon
IRAK	od engl. <i>IL-1 receptor associated kinase</i> , kinaza IL-1 receptora
IRF	od engl. <i>interferon-regulatory factor</i> , regulatorni čimbenik interferona
LPS	lipopolisaharid

LRR	od engl. <i>leucine-rich repeats</i> , leucinom bogate regije
MAPK	od engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i> , mitogenom aktivirana proteinska kinaza
MBL	od engl. <i>mannan-binding lectin</i> , lektin koji veže manan
MFI	od engl. <i>mean fluorescence intensity</i> , srednji intenzitet fluorescencije
MHC	od engl. <i>major histocompatibility complex</i> , glavni kompleks histokompatibilnosti
MP	metil-prednizolon
MyD88	od engl. <i>myeloid differentiation primary response gene88</i> , gen 88 primarne mijeloidne diferencijacije
NF- κ B	od engl. <i>nuclear factor κB</i> , nuklearni čimbenik κ B
NLR	od engl. <i>Nod-like receptor</i> , Nod-u slični receptor
NOD	od engl. <i>nucleotide oligomerization domain</i> , regija oligomerizacije nukleotida
NTC	od engl. <i>non-template control</i> , kontrola bez uzorka
PAMP	od engl. <i>pathogen-associated molecular pattern</i> , molekularni uzorak patogena
PBMC	od engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i> ; mononuklearne stanice periferne krvi
PBS	od engl. <i>phosphate-buffered saline</i> , fosfatom-puferirana fiziološka otopina
PCR	od engl. <i>polymerase chain reaction</i> , lančana reakcija polimeraze
pDC	plazmocitoidne dendritičke stanice
PRR	od engl. <i>pattern-recognition receptor</i> , receptor za prepoznavanje uzoraka
RF	reumatoidni faktor
RLR	od engl. <i>RIG-I like receptor</i> , RIG-u I-sličan receptor
RNA	od engl. <i>ribonucleic acid</i> , ribonukleinska kiselina
RNP	ribonukleinski protein
RPMI-1640	od engl. <i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>
RT	od engl. <i>room temperature</i> , sobna temperatura
rTth	rekombinantna <i>Thermus thermophilus</i> DNA polimeraza
SD	standardna devijacija
SE	sedimentacija eritrocita
SLE	od engl. <i>systemic lupus erythematosus</i> , sistemski eritemski lupus
SLEDAI	od engl. <i>SLE disease activity index</i> , indeks aktivnosti SLE-a
SNP	od engl. <i>single nucleotide polymorphism</i> , polimorfizam pojedinog nukleotida
SSC	od engl. <i>side-scatter</i> , postranično raspršenje
TCR	od engl. <i>T cell receptor</i> , T-limfocitni receptor
T _{FH}	od engl. <i>follicular helper T cells</i> , folikularni pomoćnički T-limfociti
T _H	od engl. <i>T helper cells</i> , pomoćnički T-limfociti
TIR	TLR/IL-1 receptor
TLR	od engl. <i>Toll-like receptor</i> , Toll-u sličan receptor
Treg	od engl. <i>regulatory T cells</i> , regulacijski T-limfociti
Tx	terapija

UVOD

1.1.Autoimunost

Imunosustav je skup organa, tkiva, stanica i različitih staničnih proizvoda čija je primarna funkcija očuvanje integriteta organizma tijekom izloženosti vanjskim ili unutarnjim čimbenicima poput patogenih mikroorganizama, tumora, transplantata ili sterilne upale. Normalno je imunosustav u stanju tolerancije prema neškodljivim tvarima iz okoliša i prema vlastitom tkivu. Prekid tolerancije prema neškodljivim tvarima iz okoliša manifestira se alergijskom reakcijom, a prekid tolerancije prema vlastitom tkivu autoimunošću.¹

Autoimunosne bolesti očituju se kroničnom upalom jednog ili više organa, te prisutnošću autoantitijela i autoreaktivnih T- i B-limfocita. Do sada je prepoznato više od 80 različitih autoimunosnih bolesti; prevalencija u razvijenim zemljama je 5-8%, i povećanom se učestalošću javljaju u žena. Autoimunosne bolesti ograničene na samo jedan organ većinom zahvaćaju endokrine žlijezde kao što su gušterača (dijabetes tipa I), štitnjača (Hashimotov tireoiditis, Gravesova bolest) ili jetra (autoimuni hepatitis), s prisutnim specifičnim autoantitijelima za dotično tkivo. Sistemske autoimunosne bolesti praćene su autoantitijelima na sveprisutne antigene kao što su DNA, RNA ili citrulinirani proteini, te se manifestiraju širokim spektrom poremećaja kao što su vaskulitisi, odlaganje imunokompleksa, artritis velikih i malih zglobova, serozitisi, kožne promjene, nefritis, oštećenja središnjeg živčanog sustava i dr. Sistemske autoimunosne bolesti također su često praćene sustavnom upalnom reakcijom koja se očituje povišenom

temperaturom, ubrzanom sedimentacijom, povišenim reaktantima akutne faze te povišenom razinom proupalnih citokina u serumu.

Etiologija i okidači autoimunskih bolesti nisu još do kraja razjašnjeni, no smatra se da ulogu igraju i genetski faktori i utjecaj okoliša. Daleko najvažniji genski lokus povezan s rizikom za razvitak autoimunskih bolesti čine geni HLA. Na primjer, HLA-B27 alel prisutan je u više od 95% bolesnika s ankilozirajućim spondilitisom bijele etničke pripadnosti. S druge strane, virusne infekcije mogu biti okidač za dijabetes tipa I, pušenje za reumatoidni artritis, a ultraljubičasto zračenje za sistemski eritemski lupus.

Također, nije jasno gdje i kada se točno gubi tolerancija prema autoantigenima. Tolerancija se dijeli na centralnu i perifernu. Centralna tolerancija je proces u kojem nezreli T-limfociti po izlasku iz koštane srži bivaju izloženi endogenim proteinima na timusnim epitelnim stanicama tijekom sazrijevanja. T-limfociti čiji receptor prepozna vlastite peptide dovoljno jakim afinitetom posljedično su inaktivirani ili uništeni (negativna selekcija). Ukoliko se taj proces poremeti, kao npr. kod mutacije transkripcijskog regulatora AIRE koji kontrolira ekspresiju vlastitih peptida na timusnim epitelnim stanicama, dolazi do razvitka sindroma APECED (od engl. autoimmune polyendocrinopathy, candidiasis and ectodermal dystrophy) koji se manifestira autoimunom upalom u žlijezdama slinovnicama, suznim žlijezdama, gušterači, štitnjači i jetri.²

B-limfociti svoj razvoj pak završavaju u koštanoj srži, gdje se autoreaktivni B-limfociti inaktiviraju preinakama u varijabilnim lancima gena za imunoglobuline (engl. receptor editing), delecijom ili anergijom.

Periferna tolerancija pokriva autoreaktivne T- i B-limfocite koji izbjegnu mehanizmima centralne tolerancije i dospiju u perifernu cirkulaciju, a mogu činiti i do 30% novonastalih limfocita u normalnih, zdravih osoba. Jedni od posrednika periferne tolerancije su regulacijski T-limfociti (Treg),³ koji direktno ili indirektno – putem citokina sa supresivnom funkcijom – mogu kontrolirati efektorske funkcije i proliferaciju drugih stanica. Drugi važan način održavanja periferne tolerancije leži u prirodi samih antigena i antigen-prezentirajućih stanica.

Dendritičke stanice su «profesionalne» antigen-prezentirajuće stanice (APC, od engl. antigen presenting cells) koje su u tkivima kontinuirano u kontaktu sa stanicama i ekstracelularnim prostorom. Ako iz tih odjeljaka ingestiraju materijal koji ne sadržava PAMP-ove (od engl. pathogen-associated molecular patterns) ili DAMP-ove (od engl. danger-associated molecular patterns), dendritičke stanice ostaju u stanju tolerancije i nezrelosti. Ako se, međutim, PAMP-ovi (evolucijski očuvane strukture porijeklom od patogenih mikroorganizama) ili DAMP-ovi (egzogeni ili endogeni materijal potencijalno štetan po domaćina) nalaze u ingestiranom komadiću ekstracelularnog prostora, dendritičke se stanice aktiviraju, počinju sazrijevati, lučiti proupalne citokine i kemokine, te migriraju u najbliži limfni čvor gdje prezentiraju proteine odnosno peptide porijeklom iz ingestiranog materijala B- i T-limfocitima, pokrećući na taj način adaptivnu imunost.⁴ Ostale, «ne-profesionalne» antigen-prezentirajuće stanice (monociti, makrofazi, B-limfociti) također aktiviraju adaptivnu imunost, no pod određenim uvjetima i ne tako efikasno kao dendritičke stanice.⁵

1.2.Urođena imunost

Imunosustav ima dvije glavne komponente: urođenu (nespecifičnu) i adaptivnu (specifičnu) imunost. Adaptivna imunost razvila se tek u kralješnjaka i posredovana je T- i B-limfocitima koji prepoznaju specifičan peptid ili protein na koji mogu razviti «memoriju», tako da pri ponovnom susretu s istim peptidom i proteinom isti biva znatno brže prepoznat i uklonjen. Urođeni je imunosustav posredovan stanicama hematopoetske i ne-hematopoetske loze, evolucijski je očuvan i ne može razviti memoriju.¹ Iako je urođeni imunosustav prepoznat prije više od 100 godina i donio je Nobelovu nagradu Ilyji Mechnikovu 1908.g. za opažanje da leukociti mogu uništiti mikroorganizme fagocitozom, do unatrag 15 godina nije bio predmetom intenzivnog istraživanja u imunologiji i medicini. Jedan od razloga zanemarivanja urođene imunosti serija je ključnih otkrića u mehanizmima adaptive imunosti od druge polovice 20-tog stoljeća nadalje, kao što su teorija stečene imunotolerancije, klonske selekcije sustava HLA. To je dovelo do pretpostavke da se rješenje ključnog problema imunologije - razlikovanja vlastitih od stranih antigena – također krije u adaptivnom imunosustavu. Tek kasnije otkrila se nužnost «drugog signala» ili kostimulacijskih molekula za aktivaciju T- i B-limfocita koji dolazi od antigen-prezentirajućih stanica, te da komponente mikroorganizama kao što su lipopolisaharid (LPS) mogu dovesti do ekspresije tih molekula. Neovisno o tome, istraživanja antimikrobnih mehanizama makrofaga i neutrofila dovelo je do spoznaje da se mnogi procesi važni za mikrobicidnu aktivnost mogu aktivirati ne samo cijelim i živim mikroorganizmima već i njihovim komponentama.⁶

Ključnu hipotezu koja je prethodila i dala podlogu eksploziji istraživanja u urođenoj imunosti, a aktualna je i danas, predložio je Charles Janeway 1989.g.⁷ Teorija «prepoznavanja uzorka» (engl. pattern recognition theory) predlaže da su stanice ključne za razlikovanje vlastitih i stranih antigena stanice urođene imunosti, koje antigene prepoznaju receptorima za prepoznavanje uzoraka (PRR, od engl. pattern recognition receptors). Ligandi PRR-a evolucijski su sačuvane strukture mikroorganizama (PAMP) kao što je LPS. Aktivacija PRR nužna je za ekspresiju kostimulacijskih molekula, aktivaciju antigen-prezentirajućih stanica i posljedičnu aktivaciju adaptivne imunosti. Teorija je elegantno sažela mnoge do tada nepovezane koncepte u imunologiji i objasnila poznate fenomene kao što su efikasnost bakterijskih adjuvanata (jedan od najpoznatijih je BCG, Bacillus Calmette-Guerin). Usprkos tome, nije zaživjela u potpunosti do nekoliko godina kasnije, djelomično radi toga što klasični PRR nisu još bili otkriveni.

1.2.1. Toll-uslični receptori

Prvi u nizu eksperimentalnih dokaza Janewayeve teorije bilo je otkriće da je Toll protein vinske mušice nužan za obranu protiv gljivičnih infekcija.⁸ Toll-geni su evolucijski sačuvani i njihov unutarstanični, signalni dio, strukturno je sličan receptoru za interleukin-1 (IL-1), citokinu za kojeg se znalo da može aktivirati NF- κ B signalni put i ekspresiju kostimulacijskih molekula. To je pokrenulo potragu za homologima Toll-gena u sisavaca. Transfekcija konstitutivno aktivnog humanog Toll-homologa u ljudsku monocitnu staničnu liniju 1997.g. dovela je do aktivacije NF- κ B signalnog puta, ekspresije kostimulacijskih molekula i sekrecije proupalnih citokina.⁹ Ligand za dotični

humani Toll-homolog (nazvan TLR4, od engl. Toll-like receptor 4 odnosno Toll-u sličan receptor 4) otkriven je godinu dana kasnije, kad se pozicijskim kloniranjem *lps* lokusa u miševa rezistentnih na LPS-om induciranu sepsu potvrdilo da je *Tlr4* gen nužan za prepoznavanje LPS-a.¹⁰ Posljedično je otkriveno još 12 funkcionalnih Toll-u sličnih receptora u miševa i 9 u ljudi,¹¹ potvrđena je Janewayova teorija i urođena je imunost doživjela svoj preporod.

Toll-uslični receptori (TLR-i) su transmembranski proteini tipa I. Imajuektodomenu sačinjenu od ponavljajućih leucinom bogatih regija (engl. LRR, leucine-rich repeats) za koje se vežu PAMP-ovi, transmembransku regiju, te signalnu unutarstaničnu TIR (Toll/IL-1R)-domenu.^{12,13} Nalaze se ili na staničnoj membrani – površinski TLR-i, ili na membrani unutarstaničnih vezikula – unutarstanični TLR-i. Površinski TLR-i prepoznaju evolucijski sačuvane komponente membrana ili vanjskih ovojnica bakterija, virusa i parazita, dok unutarstanični TLR-i prepoznaju nukleinske kiseline (Tablica 1).

Tablica 1. Ljudski Toll-u slični receptori i pripadajući ligandi

Lokalizacija	TLR	Egzogeni ligandi	Endogeni ligandi
Stanična membrana	TLR2/1	Lipoproteini (G ⁺ bakterije)	Proteini toplinskog šoka («heat-shock»)
	TLR2/6	Triacil-lipopeptidi (bakterije i mikobakterije)	HMGB1
		Lipoarabinomanan (<i>Mycobacteria</i>)	Hijaluronska kiselina
		Fosfolipomanan (<i>C. albicans</i>)	
		Diacil-lipopeptidi (<i>Mycoplasma</i>)	
		Solubilni faktori (<i>N. meningitidis</i>)	
		Atipični LPS (<i>L. interrogans</i> , <i>P. gingivalis</i>)	
		Zimozan (<i>Saccharomyces</i>)	
	TLR4	LPS (G ⁻ bakterije)	HMGB1
		Glikoinozitolfosfolipidi (<i>Trypanosoma</i>)	Proteini toplinskog šoka («heat-shock»)
		F-protein (respiratorni sincicijski virus)	Heparan-sulfat
Membrana endosoma			Hijaluronska kiselina
			Fibronektin
			Surfaktant protein A
	TLR5	Flagelin (bakterije s bičevima)	
	TLR10	Ligandi nepoznati; strukturno sličan TLR1, TLR2 i TLR6	
Membrana endosoma	TLR3	ssRNA i dsRNA	ssRNA i dsRNA
	TLR7	ssRNA	ssRNA
	TLR8	ssRNA	ssRNA
	TLR9	DNA	DNA

Kratice: LPS, lipopolisaharid; HMGB1, *protein B1 vrlo mobilne grupe* (od engl. *high-mobility group protein B1*); ssRNA, *jednolančana RNA* (od engl. *single-stranded RNA*); dsRNA, *dvolančana RNA* (od engl. *double-stranded RNA*)

Smatra se da je ovakva lokalizacija TLR-a prilagođena njihovim ligandima. Površinski TLR-i prepoznaju stabilne komponente mikroorganizama koje se mogu naći u izvanstaničnom prostoru, dok nukleinske kiseline mikroorganizama koje budu oslobođene u izvanstanični prostor bivaju brzo razgrađene prisutnim nukleazama.¹¹ Nadalje, nukleinske kiseline mogu biti endogene; endogena DNA i RNA koja bi se našla u izvanstaničnom prostoru i zbog nekog razloga ne bi bila razgrađena (npr. kod neadekvatnog uklanjanja apoptotskih stanica ili ako je stabilizirana u imunokompleksima),¹⁴⁻¹⁶ mogla bi pokrenuti upalni proces i dovesti do razvoja autoimunosti.¹⁷ Makrofazi transficirani kimerom TLR9 i TLR4, gdje je

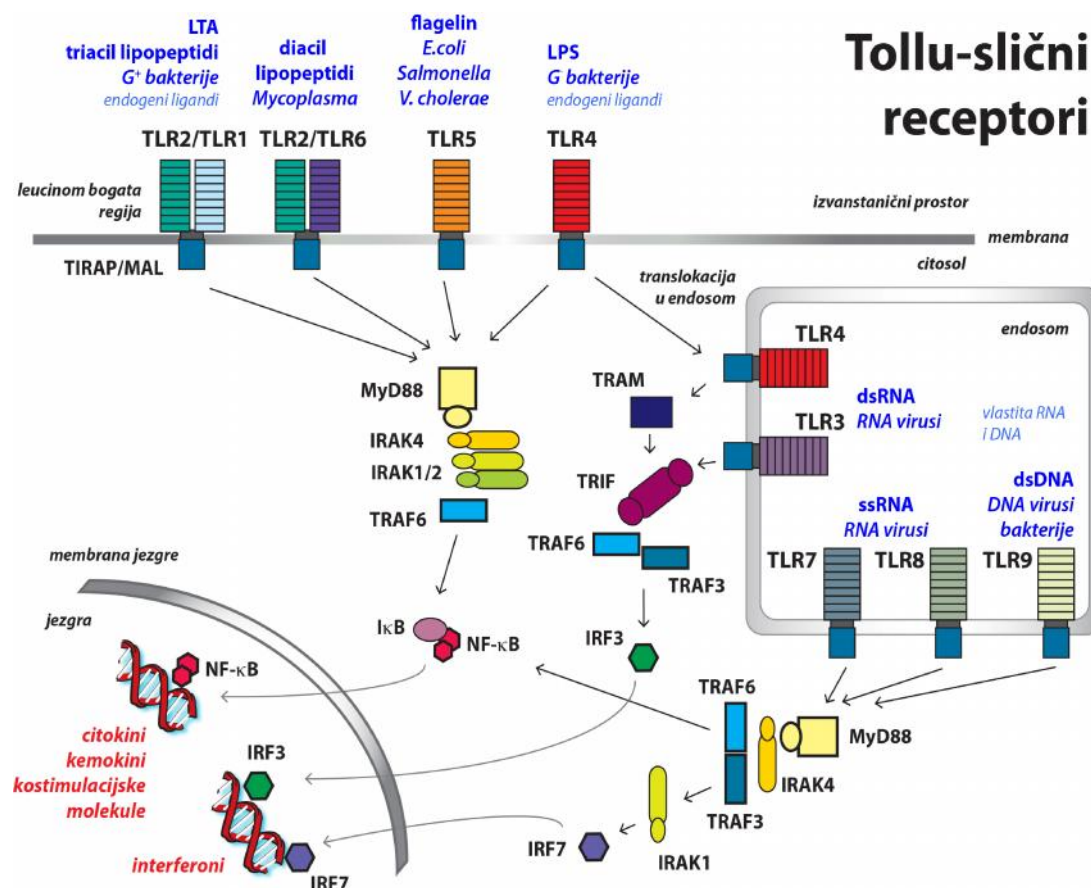
izvanstanični i signalni dio TLR9 spojen s transmembranskom regijom TLR4, proizvode velike količine proupalnih citokina po dodavanju endogene DNA u kulturu, dok makrofazi s unutarstaničnim TLR9 ostaju inertni.¹⁸ Tako se osigurava da nukleinske kiseline koje dođu u kontakt s unutarstaničnim TLR-ima moraju biti unesene fagocitozom ili endocitozom, što nije čest događaj u slučaju native endogene DNA.

Nakon što TLR-i prepoznaju svoj ligand, signal se prenosi preko citoplazme do stanične jezgre. Svi TLR-i osim TLR3 koriste adapterski protein MyD88 (od engl. myeloid differentiation primary response gene 88). Signalizacija putem IL-1 receptora se također odvija preko MyD88 adaptora.¹⁹ TLR3 koristi adapterski protein TRIF²⁰ (od engl. TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β), dok TLR4 koristi i MyD88 i TRIF.²¹ TLR4 tako ima dva različita signalna puta, MyD88-ovisni i TRIF-ovisni, koji imaju različitu kinetiku²², različite dodatne adapterske proteine i različit ishod. MyD88-ovisni TLR4 signalni put započinje kada adapterski protein TIRAP (od engl. Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein) premosti TLR4 i MyD88.²³ MyD88 dalje prenosi signal na IRAK-kinaze 4, 2 i 1 (od engl. IL-1 receptor associated kinase), TRAF6 (od engl. TNF receptor associated factor 6) te TAB2 i TAB3 (od engl. TAK1 binding protein), koji potom aktiviraju TAK1 (od engl. TGF- β -activated kinase 1). TAK1 se pridružuje IKK-kompleksu i fosforilira IKK β , što vodi do degradacije I κ B inhibitornih proteina i aktivacije transkripcijskih faktora NF- κ B. TAK1 istovremeno aktivira MAP kinaze (od engl. mitogen-activated protein kinase) Erk1, Erk2, p38 i Jun, koje zatim aktiviraju različite transkripcijske faktore

uključujući AP-1.²⁴ Aktivacija NF- κ B i ostalih transkripcijskih faktora rezultira sekrecijom proupalnih citokina, uključujući IL-6, TNF- α i IL-12.²⁵ TLR4 se potom unosi u stanicu endocitozom. Na membrani endosoma TLR4 stvara kompleks s TRIF-om i TRAM-om (od engl. TRIF-related adaptor molecule), koji potom aktiviraju TRAF3, TBK1 (od engl. TANK-binding kinase 1) i IKK ϵ , te se katalizira fosforilacija IRF3 (od engl. interferon regulatory factor 3) i produkcija interferona β .^{26,27}

Ostali površinski TLR-i koji koriste samo adapterski protein MyD88 ne pobuđuju sekreciju interferona tipa I (osim u vrlo specifičnim uvjetima),²⁸ već samo aktiviraju NF- κ B i MAP-kinaze. Aktivacija TLR3 preko TRIF-a također može aktivirati NF- κ B. Ostali unutarstanični TLR-i, TLR7, TLR8 i TLR9, koriste MyD88 i TRAF6 za aktivaciju NF- κ B i sekreciju proupalnih citokina, no ujedno i TRAF3, IRF7 i IRF8 za sekreciju interferona tipa I (slika 1).^{24,29}

Toll-u slični receptori prisutni su u svim stanicama hematopoetske loze s različitom distribucijom pojedinih receptora,³⁰ a nalaze se i u nekim tkivima ne-hematopoetske loze.³¹



Slika 1. Toll-u slični receptori i njihovi signalni putevi.

1.2.2. Ostali PRR

Iako su Toll-u slični receptori najbolje do sada karakterizirani receptori urođene imunosti, često su nadopunjeni drugim receptorima koji prepoznaju iste ili slične ligande. Druge porodice receptora urođene imunosti mogu se svrstati u solubilne, transmembranske (gdje spadaju i TLR-i) te citosolne receptore. Solubilni receptori uključuju kolektine kao što su MBL (od engl. mannan-binding lectin) i SP-A (surfaktant protein A), fikoline i pentraksine kao što su CRP (od engl. C-reactive protein) i SAP (od engl. serum amyloid P), koji se vežu za površinu mikroorganizama, aktiviraju komplement i opsonizacijom olakšavaju fagocitozu makrofazima, monocitima i

neutrofilima.^{32,33} CLR-i (od engl. C-type lectin-like receptors) dektin-1 i dektin-2 su transmembranski receptori koji prepoznaju β -glukan i manan, komponente staničnog zida gljiva.³⁴ U citoplazmatske receptore pripadaju RLR-i (od engl. RIG-I-like receptors) i NLR-i (od engl. Nod (nucleotide oligomerization domain)-like receptors).

RLR-i su helikaze koje sadrže DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) ili DEXH (Asp-Glu-X-His) domenu i prepoznaju RNA ili DNA prisutne u citoplazmi. Najbolje proučene helikaze su RIG-I (retinoic acid-inducible gene 1), MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5) i LGP2. RIG-I i MDA5 preko adaptorskog proteina IPS-1 (od engl. interferon- β promoter stimulator 1) aktiviraju gene interferona tipa I. RIG-I i MDA5 prepoznaju dsRNA, kraću odnosno duđu od 300 bp. Nadalje, RIG-I prepoznaje RNA sa 5'-trifosfatnom skupinom koja je prisutna u genomima većine virusa, ali je uklonjena ili pokrivena 7-metil-guanozinom u tRNA, rRNA i mRNA domaćina.³⁵ Nedavno je toj porodici pridruženo još helikaza koje prepoznaju unutarstaničnu RNA (DDX1, DDX21, DHX36) i DNA (DDX41, DHX9).³⁶⁻³⁹

U ljudskom genomu je 22 NLR-a, kojima je zajednička centralna Nod ili NACHT domena, N-terminalna CARD domena (od engl. caspase recruitment domain) i C-terminalna leucinom bogata regija (LRR). Smatra se da se prepoznavanje liganda vrši putem LR, a prijenos signala preko Nod i CARD domene. Aktivacija NLR-a može rezultirati aktivacijom signalnog puta NF- κ B (Nod1 i Nod2), inflammasoma (NLRP3, NLRP1, NLRC4), autofagije (Nod1, Nod2, NLRC4) i/ili stanične smrti (NLRP3, NLRP1, NLRC4). Ligandi NLR-a

predmetom su intenzivnog istraživanja, i uključuju bakterijski peptidoglikan za Nod1 i Nod2, flagelin i komponente tipa III sekrecijskog aparata za NLRC4, dok su NLRP3 i NLRP1 pleiotropni senzori različitih molekula ili procesa kao što su ATP, bakterijski toksini, gradijent unutarstaničnih iona kalija, soli aluminija, kristali urične kiseline i dr. Ovaj širok raspon liganada koji vodi k jednom putu – aktivaciji inflammasoma, kaspaze-1 i sekreciji interleukina (IL)- 1β doveo je do hipoteze da postoji zajednički prethodni događaj, npr. o NADPH-ovisno stvaranje reaktivnih kisikovih radikala (ROS) ili ruptura lizosomalne membrane.⁴⁰ AIM2 je senzor unutarstanične DNA koji pripada HIN-200 porodici proteina te stoga nije član NLR-a, ali poput NLR-a može potaknuti oligomerizaciju inflammasoma, aktivaciju kaspaze-1 i sekreciju IL- 1β .⁴¹

1.2.3. Kontrola adaptivne imunosti urođenim imunoreakcijama

PRR-i sudjeluju u kontroli adaptivne imunosti ovisno o svojoj lokaciji i sposobnosti za signalizaciju. Solubilni PRR-i kao što je MBL i neki transmembranski PRR koji sudjeluju u fagocitozi («scavenger» receptori) ne mogu samostalno pobuditi adaptivnu imunoreakciju. S druge strane, uglavnom svi PRR koji aktiviraju NF- κ B, IRF ili NFAT signalni put mogu aktivirati adaptivnu imunost s različitih aspekata. TLR-i mogu potaknuti aktivaciju B-limfocita te sintezu i sekreciju IgM, IgA i IgG klase imunoglobulina, indukciju Th1 i Th17 pomoćničkih CD4⁺ T-limfocita i aktivaciju citotoksičnih CD8⁺ T-limfocita.⁴² Aktivacija dektina-1 i -2 usmjerava diferencijaciju pomoćničkih T-limfocita u Th17-fenotip, nužan za obranu od

gljivičnih infekcija.⁴³ Neki NLR-i, RLR-i i citosolni senzori DNA također mogu aktivirati adaptivnu imunost.⁴⁴⁻⁴⁷

Kontrola adaptivne imunosti neraskidivo je vezana uz prepoznavanje vlastitih od stranih antigena. Strano porijeklo antigena uspostavlja se kroz fizičku vezu antigena i PAMP-a koji uglavnom čine dio iste čestice, npr. fagocitirane bakterije, i prepoznavanje se vrši u istom endosomu antigen-prezentirajuće stanice. Ukoliko su antigen i PAMP u različitim endosomima, APC će se aktivirati, ali neće preraditi antigen i prezentirati peptid u sklopu MHC-molekule T-limfocitima.⁴⁸ Cjepiva koja sadrže samo proteinsku komponentu mikroorganizma prividno pobijaju to pravilo, no ona uglavnom sadrže kao adjuvant aluminij-hidroksid, koji svojim depo-efektom produžuje izloženost APC-a antigenu, a postoje indikacije da i samostalno može aktivirati urođenu imunost.^{42,49,50} Asocijacija PAMP-a i antigena objašnjava imunodominantnost proteina koji sadrže PAMP-motiv, kao što su profilin *Toxoplasma gondii*.⁵¹ U slučaju B-limfocita, ko-aktivacija BCR-a (od engl. B cell receptor, B-stanični receptor) antigenom koji je okružen komponentom komplementa C3dg dovodi do izraženo veće produkcije antitijela. C3dg, iako vlastiti protein domaćina, «označava» antigen kao strani i omogućuje optimalnu imunoreakciju.⁵²

Kao što je prikazano u slici 1, TLR-i mogu prepoznavati i endogene ligande, pa se postavlja pitanje da li to u normalnim okolnostima može dovesti do razvoja adaptivne imunosti na vlastite antigene, tj. autoimunosti. Ubikvitarni izvor endogenih TLR-liganada su izvanstanični matriks i unutarstanični proteini. Mali fragmenti hijaluronske kiseline (HA), heparan-sulfata i biglikan

koji se akumuliraju tijekom oštećenja tkiva mogu aktivirati TLR2 i/ili TLR4 na makrofazima i potaknuti proizvodnju proupalnih citokina.⁵³⁻⁵⁵ HMGB1 (od engl. high-mobility group box 1) se normalno nalazi u staničnoj jezgri, no može se osloboditi tijekom stanične smrti. Ovisno o okolnostima, izvanstanični HMGB1 može djelovati proupalno putem aktivacije TLR2, TLR4, TLR9 i RAGE receptora (od engl. receptor for advanced glycation end-products).⁵⁶ Miševi deficijentni za biglikan ili s mutiranim TLR4 imaju manje proupalnih citokina tijekom sepse ili ishemijsko-reperfuzijske ozljede u cirkulaciji i smanjenu smrtnost.^{54,57} S druge strane, miševi bez TLR2 i TLR4 izloženi sterilnoj upali pluća pokazuju smanjenu migraciju leukocita u pluća, veće oštećenje tkiva i povećanu smrtnost.⁵³ To upućuje da endogeni ligandi TLR2 i TLR4 mogu započeti proupalnu imunoreakciju, ali su važni i za cijeljenje oštećenog tkiva. Usprkos tome, za sad nema dokaza da ti endogeni ligandi – za razliku od PAMP-ova - mogu potaknuti adaptivnu imunoreakciju. Razlog tome možda leži u utilizaciji različitih ko-receptora. HA se veže za TLR4 i CD44, HMGB1 za TLR4 i RAGE, dok se bakterijski LPS nalazi u kompleksu TLR4 i CD14.^{56,58}

B-limfociti, iako uobičajeno svrstavani u efektorske stanice adaptivne imunosti zajedno s T-limfocitima, od njih se razlikuju na dva bitna načina. Prvo, sposobni su ingestirati, preraditi i predložiti antigen T-limfocitima u sklopu MHC-klase II – dakle djelovati kao antigen-prezentirajuće stanice – ako antigen biva prepoznat od strane B-limfocitnog receptora.⁵⁹ Drugo, na svojoj površini izražavaju TLR1, TLR6 i TLR10, a unutarstanično TLR7 i TLR9.³⁰ Aktivacija TLR-a na B-limfocitima nužna je za optimalnu sekreciju

antigen-specifičnih IgG i IgM, reakciju germinalnog centra i diferencijaciju B-limfocita u plazma-stanice u mišjem modelu.⁶⁰ U ljudskih naivnih B-limfocita, aktivacija putem TLR-a služi kao «treći» signal potreban za njihovu proliferaciju, izotipsko prekapčanje i diferencijaciju u plazma-stanice, dok su klasični «signal 1» (aktivacija BCR-a) i «signal 2» (kostimulacija od strane pomoćničkih T-limfocita specifičnih za isti antigen) dovoljni samo za početnu proliferaciju, ali ne i diferencijaciju i preživljenje.⁶¹ S obzirom da B-limfociti izražavaju TLR7 – receptor za RNA, i TLR9 – receptor za DNA, pitanje koje se nameće jest da li B-limfociti mogu prepoznati endogenu RNA i DNA, i da li to može pridonijeti razvoju autoimunosti?

Prvo, B-limfociti se trebaju susresti s endogenom DNA ili RNA i posjedovati BCR specifičan za istu. Kloniranje antitijela iz pojedinačnih B-limfocita tijekom različitih razvojnih stadija u koštanoj srži pokazalo je da je većina tek nastalih, ranih nezrelih B-limfocita autoreaktivna na mnoge endogene antigene, uključujući DNA. Sazrijevanjem postotak autoreaktivnosti pada na 40-75% nezrelih B-limfocita. B-limfociti koji tek izlaze iz koštane srži nazivaju se tranzicijski B-limfociti, i također ih je otprilike 40% autoreaktivno. Njihovo sazrijevanje u periferiji praćeno je padom autoreaktivnosti na oko 20% u zrelih naivnih B-limfocita.⁶² Sazrijevanje tranzicijskih u zrele naivne B-limfocite ovisi o prisutnosti BAFF-a (od engl. B-cell activating factor).⁶³ Autoreaktivni anergični B-limfociti izražavaju manju razinu BAFF-receptora na svojoj površini od B-limfocita koji ne prepoznaju vlastite antigene. Kako je razina cirkulirajućeg BAFF-a u zdravom organizmu graničena, ne-autoreaktivni B-limfociti s većom razinom ekspresije BAFF-receptora imaju

prednost pri preživljavanju.⁶⁴ Miševi transgenični za BAFF razvijaju autoimuni sindrom sličan sistemskom eritemskom lupusu (SLE).^{65,66} U ljudi, povišene razine BAFF-a izmjerene su u SLE-u, Sjögrenovom sindromu i reumatoidnom artritisu.⁶⁷⁻⁶⁹

Drugo, endogena RNA ili DNA je obično brzo degradirana u izvanstaničnom prostoru od strane ubikvitarnih nukleaza. Osim u izuzetnim slučajevima kao što je netoza,⁷⁰ nukleinske su kiseline u izvanstaničnom prostoru uglavnom rezultat stanične smrti. Smatra se da apoptoza nije proupalna ukoliko dođe do efikasnog uklanjanja apoptotskih tjelešaca od strane makrofaga, dok nekroza i piroptoza mogu izazvati upalnu reakciju.⁷¹ Defekti u uklanjanju apoptotskih i/ili nekrotskih ostataka mogu dovesti do razvoja autoimunosti. Miševi deficijentni za C1q komponentu komplementa ili SAP razvijaju anti-nuklearna antitijela, a skoro svi ljudi s C1q deficijencijom obolijevaju od SLE-a.¹⁵ Nadalje, nukleinske kiseline, da bi bile prepoznate od strane endosomalnih TLR-a, trebaju biti ingestirane, za što je preduvjet stabilizacija, npr. u kompleksu s proteinima.¹⁸ Nukleinske kiseline u kompleksu s imunoglobulinima mogu biti prepoznate putem BCR-a, što potiče kolokalizaciju u iste endosomalne vezikule i posljedičnu signalizaciju.^{16,72,73} U plazmacitoidnim dendritičkim stanicama unos DNA-imunokompleksa odvija se putem Fc γ -receptora.⁷⁴ Treći način ulaska nukleinskih kiselina u endosomalne vezikule je putem HMGB1. HMGB1 otpušta se pasivno iz nekrotičkih stanica i aktivno iz monocita i dendritičkih stanica stimuliranih TLR-ligandima, te se veže za izvanstaničnu DNA.⁷⁵⁻⁷⁸ Postoje indicacije da bi HMGB-proteini mogli biti čak i univerzalni medijatori prepoznavanja

nukleinskih kiselina.⁷⁹ Drugi protein koji veže RNA i DNA, štiti ih od degradacije i potiče unos u endosome je LL37 ili katelicidin, za kojeg je pokazano da potiče produkciju IFN tipa 1 u psorijatičnim kožnim lezijama.^{80,81}

Slijedeće, između nukleinskih kiselina porijeklom iz vlastitog organizma i onih iz mikroorganizama postoje razlike koje potenciraju prepoznavanje stranih nukleinskih kiselina. DNA bakterija i virusa je uglavnom nemetilirana, dok je RNA obogaćena poli-U motivima.⁸² Stoga je odgovor na prepoznatu endogenu DNA ili RNA manje magnitude. Treće, za razvoj *bona fide* autoimunosti potreban je dopunski signal koji će podržati početnu autoimunu reakciju (npr. genetska predispozicija). Tako je poznato da 6 do 9% zdravih osoba koje nikad ne razviju autoimunu bolest ima cirkulirajuća anti-nuklearna antitijela (ANA) u niskom titru, a njih do 3,8% ima i razna druga antitijela kao što su anti-dsDNA, anti-RNP, anti-Ro i anti-fosfolipidna antitijela.^{83,84} Usprkos tome, značaj autoantitijela za razvoj autoimunosti je neprikosnoven: pri istraživanju pojave autoantitijela u serumu klinički zdravih američkih vojnika prije nego što su razvili manifestni SLE, pokazano je da 88% vojnika koji su razvili SLE i do 9 godina nakon prvog uzorkovanja ima barem jedno autoantitijelo (od 7 mjerenih) u cirkulaciji, te se broj različitih autoantitijela akumulira do u prosjeku tri u doba uspostavljanja dijagnoze.⁸³ Sukladno tome, 40% naivnih zrelih B-limfocita u bolesnika sa SLE-om je autoreaktivno, nasuprot 20% autoreaktivnih naivnih zrelih B-limfocita u zdravih osoba.⁸⁵

Nadalje, aktivacija TLR9 dovodi do sekrecije IL-10, koji ima supresivno djelovanje na mijeloidne stanice i T-limfocite no potencira preživljavanje,

proliferaciju, izotipsko prekapčanje, sekreciju imunoglobulina i diferencijaciju B-limfocita.⁸⁶⁻⁹¹ IL-10 je učestalo povišen u SLE bolesnika, korelira s aktivnosti bolesti i titrom anti-dsDNA antitijela. Polimorfizmi promotora za IL-10 pridonose riziku za razvoj SLE-a, a imunokompleksi SLE-bolesnika induciraju produkciju IL-10 *in vitro*.^{92,93}

Ukoliko su gore navedeni preduvjeti ispunjeni – B-limfociti imaju autoreaktivni BCR koji prepoznaje imunokomplekse DNA ili RNA, stabilizirane nukleinske kiseline perzistiraju u izvanstaničnom prostoru, povišena je razina BAFF-a – B-limfociti mogu, neovisno o T-limfocitima, započeti i održavati autoimuni proces. Kad su zdravi miševi s BCR-om koji prepoznaje reumatoidni faktor (endogeni IgG) malim afinitetom križani s *lpr*-miševima koji imaju predispoziciju za SLE-u sličnu autoimunost, B-limfociti podmlatka bili su aktivirani, te su proliferirali i lučili autoantitijela nakon prepoznavanja IgG_{2a}-kromatin imunokompleksa koji su sinergistički aktivirali BCR i TLR9. DNA i TLR9 bili su kritični za razvoj autoimunosti, pošto je aktivacija B-limfocita mogla inhibirati DNazom, klorokinom (koji blokira acidifikaciju endosoma i signalizaciju putem TLR9) ili sintetskim TLR9-inhibitorom.⁹⁴ Iako ovaj mehanizam patogeneze SLE-a tek treba biti potvrđen u ljudi, deplecija B-limfocita, inhibicija BAFF-a i klorokin pokazani su kao uspješni u terapiji SLE-a.⁹⁵⁻⁹⁹

1.3. Sistemski eritemski lupus

Sistemski eritemski lupus (SLE) je autoimunosna bolest u velikoj mjeri nepoznate etiologije. Javlja se uglavnom u žena generativne dobi i zahvaća različite organske sustave. Sistemski karakter bolesti očituje se općim simptomima kao što su slabost, malaksalost, smanjeni apetit, umor i povišena tjelesna temperatura. Često su prisutne kožne promjene karakteristične lokalizacije, artritis, fotosenzibilnost, vaskulitis i miozitis, zatim ulceracije sluznice usne i nosne šupljine, gubitak kose, endokarditis, perikarditis, pleuritis, glomerulonefritis i neurološki te psihijatrijski poremećaji.¹⁰⁰ Klinička heterogenost bolesti očituje se u dijagnostičkim kriterijima (Tablica 2); bilo koja 4 od 11 simptoma su dostatna za dijagnozu.¹⁰¹ Bolest je kronična i neizlječiva, oblikom varira od blagog do fulminantnog, s mogućim letalnim ishodom u kratkom vremenskom razdoblju. Dugoročno 85% bolesnika preživi 10 godina od postavljanja dijagnoze.¹⁰² Incidencija i prevalencija variraju od populacije do populacije, te ovise ne samo o spolu, dobi, etničkoj ili rasnoj pripadnosti nego i razini te dostupnosti medicinske skrbi o kojima ovisi postavljanje dijagnoze. Incidencija varira od 1 do 10, a prevalencija od 20 do 70 bolesnika na 100 000 stanovnika. Osobe porijeklom iz Afrike ili Azije imaju 2 do 3 puta veću incidenciju i prevalenciju od bijelaca, a odnos broja oboljelih muškaraca naspram žena je 1:9.^{102,103}

Tablica 2. ACR-kriteriji za dijagnozu sistemskog eritemskog lupusa

Kriterij	Opis
Leptirasti osip	Simetrični eritem na obrazima i nosu, često u obliku leptira
Diskoidni osip	Crveni, uzdignuti osip u obliku diska, može se ljuštiti
Fotosenzitivnost	UV-zračenjem izazvan osip ili pogoršanje postojećeg
Oralne ulceracije	Aftozne promjene u usnoj šupljini
Artritis	Bol i otok dva ili više zglobova
Serozitis	Pleuritis ili perikarditis
Bubrežni poremećaj	Perzistirajući proteini ili stanični depozit u urinu
Neurološki poremećaj	Epileptički napadi ili psihoza
Krvni poremećaj	Anemija, leukopenija, limfopenija ili trombocitopenija
Imunološki poremećaj	Pozitivna anti-dsDNA, anti-Sm ili anti-fosfolipidna antitijela
Prisutnost anti-nuklearnih antitijela	Pozitivan test na ANA (anti-nuklearna antitijela)

ACR: Američki reumatološki kolegij (od engl. American College of Rheumatology)

1.3.1. Genetski čimbenici rizika za SLE

Do sada je otkriveno mnogo genetskih čimbenika koji pridonose razvoju SLE-a. Predispozicija je u većini slučajeva multigenetska, no postoje rijetke mutacije koje samostalno mogu dovesti do razvitka bolesti (npr. u genima koji kodiraju pojedine komponente komplementa). SLE ima visok nasljedni rizik (>66%) i visoku podudarnost između jednojajčanih blizanaca (20-40%), naspram 2-5% podudarnosti između braće i dvojajčanih blizanaca.¹⁰⁴ Ciljana genotipizacija polimorfizama (SNP, od engl. single nucleotide polymorphism) te GWA studije (od engl. genome-wide association) otkrile su znatan broj gena koji pridonose razvoju i patogenezi SLE-a (Tablica 3). Mnogi od tih gena sudjeluju u procesima kao što su prezentacija antigena, signalni put interferona tipa 1, signalni put TLR-a, uklanjanje mrtvih stanica i imunokompleksa, te aktivacija B- i T-limfocita. O patogenezi bolesti još više

govore mutacije u pojedinim genima koje mogu dovesti do SLE-a. Deficijencija u C1q komponenti komplementa, iako rijetka, dovodi do razvitka SLE-a u više od 90% slučajeva. Oko 30% bolesnika sa SLE-om ima autoantitijela na C1q, a potrošnja komplementa u plazmi je jedna od najčešće prisutnih poremećaja u krvi bolesnika s SLE-om. Glavna funkcija C1q jest opsonizacija apoptotskih stanica, što potiče njihovu fagocitozu i uklanjanje.¹⁵ Nadalje, mutacije u nekatalitičkoj domeni gena *TREX1* pronađene su u oko 2% bolesnika sa SLE-om, ali s visokom penetracijom, dok su mutacije u katalitičkoj domeni povezane s «chilblain» lupusom, kožnim oblikom SLE-a (Tablica 3).^{105,106} *TREX1* je egzonukleaza koja razgrađuje DNA u citosolu. U nedostatku *TREX1*, u stanicama se akumulira DNA endogenih retrovirusa koja potom aktivira citosolne senzore DNA, sekreciju interferona tipa 1 i autoimunu reakciju.^{107,108} Obje mutacije pokazuju važnost uklanjanja endogene DNA iz organizma; u slučaju C1q mutacije dolazi do defekta u odstranjivanju apoptotskih stanica, što dovodi do sekundarne nekroze i oslobađanja DNA u izvanstanični prostor, dok se u slučaju mutacije *TREX1*-a DNA nakuplja unutarstanično.

Brojni čimbenici iz okoliša također pridonose etiologiji i patogenezi SLE-a. Lijekovi koji izazivaju hipometilaciju DNA kao što su hidralazin i prokainamid mogu dovesti do razvitka SLE-a u inače zdravih osoba.¹⁰⁹ Epidemiološke studije impliciraju ultraljubičasto zračenje kao faktor rizika.¹¹⁰ Zarazna bolest koja se često povezuje sa SLE-om je infekcija Epstein-Barr virusom (EBV). EBNA1 antigen EBV-a sličan je u molekularnoj strukturi Ro autoantigena, SLE bolesnici pokazuju bržu serokonverziju u primarnoj EBV-infekciji i viši virusni titar, te njihovi CD8⁺ citotoksični T-limfociti ne kontroliraju uspješno

EBV-om inficirane B-limfocite.¹¹¹⁻¹¹³ Nadalje, ženski spolni hormoni također pridonose SLE-u putem još nerazjašnjenih mehanizama. Višak X-kromosoma u genetski modificiranih miševa povezan je s težim simptomima bolesti u životinja. Na X-kromosomu se nalazi *CD40*, jedan od rizičnih lokusa za SLE. Trudnoća može pogoršati SLE, a tretman dehidroepiandrosteronom (DHE) pokazao je povoljne kliničke učinke.¹¹⁴⁻¹¹⁷

Tablica 3. Genetska prijemчивost za razvitak SLE-a

Gen	OR ("odds ratio")	Funkcija
<i>TREX1</i>	25	uklanjanje citosolne DNA
<i>C1Q</i>	10	uklanjanje mrtvih stanica i imunokompleksa
<i>C4A</i>	6.5	uklanjanje imunokompleksa
<i>C4B</i>	2.02	uklanjanje imunokompleksa
<i>C2</i>	5	uklanjanje imunokompleksa
<i>TNFAIP3</i>	2.3	NF-κB signalni put
<i>HLA-DR2</i> i <i>HLA-DR3</i>	2	prezentacija antigena T- i B-limfocitima
<i>IRF5</i>	1.8	signalni put interferona tipa 1
<i>ITGAM</i> (<i>CD11b</i> ili <i>CR3</i>)	1.6	uklanjanje imunokompleksa
<i>FCGR3A</i>	1.6	uklanjanje imunokompleksa
<i>STAT1</i> – <i>STAT4</i> lokus	1.5	signalni put interferona tipa 1 odnosno IL-12
<i>BLK</i> – <i>FAM167A</i> – <i>XKR6</i> lokus	1.5	signalni put BCR-a (B-limfocitni receptor)
<i>BANK1</i>	1.38	signalni put BCR-a (B-limfocitni receptor)
<i>FCGR2A</i>	1.35	uklanjanje imunokompleksa
<i>PTPN22</i>	1.3	signalni put TCR-a (T-limfocitni receptor)
<i>CRP</i>	1.3	uklanjanje imunokompleksa
<i>TNFSF4</i> (<i>OX40L</i>)	1.3	kostimulacija T-limfocita
<i>KIAA1542</i> (blizu <i>IRF7</i>)	1.28	signalni put interferona tipa 1
<i>PXK</i>	1.25	Na/K ATPaza
<i>MECP2</i> – <i>IRAK1</i> lokus	1.2	TLR/IL1R signalni put
<i>PDCD1</i>	1.2	aktivacija T-limfocita
<i>IL10</i>	1.19	aktivacija B-limfocita; imunoregulacija
<i>CD86</i>	1.18	kostimulacija T-limfocita

Prilagođeno prema Harley i sur., *Nat Genet* 2008 i Gateva i sur., *Nat Genet* 2009.^{104,118}

1.3.2. Stanice imunološkog sustava u SLE-u

Stanice imunološkog sustava ključne su u patogenezi bolesti, što je vidljivo iz uspjeha transplantacije koštane srži kod pacijenata sa SLE-om rezistentnim na sve konvencionalne i biološke terapije.^{119,120} T-limfociti, B-limfociti i dendritičke stanice na svoj način pridonose bolesti. T-limfociti u SLE-u koriste ne-kanonski signalni put nakon aktivacije svog receptora (TCR, od engl. T-cell receptor) putem Syk-kinaze umjesto uobičajenog proteina ZAP-70. TCR-i se također nalaze u agregatima metabolički aktivnih lipidnih splavi koji pospješuju aktivaciju i prijenos signala. Smanjena razina IL-2 pridonosi smanjenoj aktivnosti citotoksičnih T-limfocita i nedostatnoj aktivacijom-induciranoj apoptozi (AICD, od engl. activation-induced cell death), što pospješuje preživljavanje autoreaktivnih T-limfocita. T-limfociti bolesnika sa SLE imaju povišen izražaj CD44, adhezijske molekule koja je ključna za migraciju u upaljena tkiva. T-limfociti koji infiltriraju bubreg u SLE-nefritisu izražavaju CD44 te stvaraju IL-17, citokin s izraženim proupalnim svojstvima.¹²¹ Regulacijski T-limfociti, ključni za kontrolu upalne reakcije i sprečavanje oštećenja okolnog tkiva, imaju kvantitativni i kvalitativni defekt u pacijenata sa SLE-om.¹²²

Dendritičke stanice u SLE-u mogu biti aktivirane interferonom- α (IFN- α), CD40-ligandom, nukleosomima ili imunokompleksima s DNA.^{74,123,124} Plazmacitoidne dendritičke stanice (pDC) su specijalizirane tvornice IFN- α kojeg luče nakon aktivacije putem TLR7 i/ili TLR9, te su vjerojatno izvor interferonskog «potpisa» u transkriptomu periferne krvi bolesnika SLE-om.¹²⁵⁻

¹³⁰ Broj pDC-a u perifernoj cirkulaciji je reduciran, ali zato opsežno infiltriraju kožu i bubrege bolesnika sa SLE-om.^{131,132}

B-limfociti imaju neprikosnovenu ulogu u patogenezi SLE-a. I humani SLE i mišji modeli karakterizirani su obilatim i raznovrsnim autoantitijelima. Mnogi geni identificirani u GWA-studijama SLE-a mogu pridonijeti povećanoj i olakšanoj aktivaciji B-limfocita, kao što su *BANK1*, *BLK*, *IL-21R*, *CD40*, *LYN*, *PTPN22*, *TNFAIP3*, *BLIMP1* te geni za Fc γ -receptore.¹³³⁻¹³⁵ Iako nedavna studija deplecije B-limfocita rituksimabom (anti-CD20 antitijelo) nije dostigla primarni terapijski cilj, u manjoj je studiji pokazano da pacijenti u dugotrajnoj kliničkoj remisiji poslije deplecije imaju manje cirkulirajućih memorijskih B-limfocita, manje autoantitijela te promijenjen fenotip B-limfocita u germinalnim centrima tonzila.^{136,137} Nadalje, belimumab – monoklonsko antitijelo na BAFF – odobreno je za terapiju nakon uspješnih kliničkih studija u SLE bolesnika bez nefritisa.¹³⁸

U krvi bolesnika sa SLE nalazi se povećan broj tranzicijskih i nezrelih naivnih B-limfocita neovisno o aktivnosti bolesti, uključujući i autoreaktivne naivne B-limfocite.^{139,140} Također, povećan je broj cirkulirajućih CD27⁺IgD⁻ memorijskih B-limfocita koji su prošli izotipsko prekapćanje, a rezistentni su na imunosupresivnu terapiju.¹⁴¹ Povećan broj memorijskih B-limfocita sam po sebi je rizik za autoimunu reakciju, jer memorijski B-limfociti imaju niži aktivacijski prag i mogu se brzo i nespecifično aktivirati kombinacijom TLR-signalna i BAFF-a ili IL-21.¹³⁸ Osim memorijskih B-limfocita, u SLE-u je povišen broj CD27⁺⁺ plazmablasta koji izražavaju unutarstanični imunoglobulin.¹⁴¹⁻¹⁴³ Plazmacitoza u aktivnom SLE-u odražava kontinuirano

stvaranje novih plazmablasta u germinalnim centrima, pošto je terapija monoklonskim antitijelom anti-CD40L, koje blokira interakciju sa CD40 na B-limfocitima i time reakciju germinalnog centra, znatno smanjila broj cirkulirajućih plazmablasta.¹⁴⁴

Stvaranje i regulacija germinalnih centara te somatska hipermutacija (SHM) su također modulirani u SLE-u. Germinalni su centri aktivniji, miševi s mutiranim genom koji regulira izražaj proteina ICOS na T_{FH} limfocitima (od engl. Tfollicular helper) u germinalnim centrima razvijaju teški oblik SLE-u slične bolesti, a IL-21 (kojeg proizvode T_{FH} i koji je ključan za reakciju germinalnog centra) i njegov receptor geni su rizika za SLE. Plazma-stanice bolesnika sa SLE-om imaju izrazito mutirane V_H i V_L gene za varijabilnu regiju teškog odnosno lakog lanca imunoglobulina. Važnost SHM u stvaranju autoantijela pokazana je kad su autoantitijela SLE-bolesnika reverzno mutirana u originalnu, «germline» konfiguraciju čime su izgubila autoreaktivnost.¹³⁸ Nadalje, B-limfociti i dendritičke stanice u germinalnim centrima izložene su potencijalnim autoantigenima u SLE-u. Fagociti u oko 50% SLE-bolesnika pokazuju smanjenu mogućnost ingestije apoptotskog materijala. Apoptotski debris u germinalnim centrima SLE-bolesnika nalazi se i u izvanstaničnom prostoru, ne samo unutar specijaliziranih makrofaga koji bi ga trebali razgraditi, te na površini folikularnih dendritičkih stanica čija je uloga prezentacija antigena T- i B-limfocitima.¹⁴⁵⁻¹⁴⁸

1.3.3. Medijatori patogeneze i oštećenja tkiva u SLE-u

Pored gore navedenih stanica imunološkog sustava, imunokompleksi su jedni od glavnih medijatora patogeneze u SLE-u. Anti-nuklearna antitijela mogu se vezati za obilno prisutne antigene stanične jezgre. Njihovo je uklanjanje smanjeno radi kvalitativnih i kvantitativnih defekta u izražaju Fc-receptora i komplementa. Nedostatno uklanjanje imunokompleksa povezano je s polimorfizmima u genima za Fc-receptore i komponentu komplementa C3b.¹⁴⁹⁻¹⁵¹ Imunokompleksi koji se talože u bubregu najčešće sadrže kationska anti-DNA antitijela, anti-C1q, anti-nukleosomna i anti-kromatinska antitijela. Nakupljaju se u subendotelnom prostoru i mezangiju, a potom u subepitelnom prostoru i bazalnoj membrani glomerula. Nadalje, imunokompleksi se mogu akumulirati u koži i centralnom živčanom sustavu (CNS, od engl. central nervous system). Iako mogu utjecati na funkciju i preživljenje stanica na koje se vežu, češći i opasniji efekt je aktivacija komplementa koja potiče lokalnu upalnu reakciju dolazak leukocita i limfocita iz cirkulacije.¹⁵²⁻¹⁵⁵

Usprkos širokom spektru autoantitijela, samo ih je nekoliko direktno povezano s oštećenjem tkiva. Anti-Ro antitijela, koja se mogu vezati za miocite, mogu uzrokovati kongenitalni srčani blok u neonatalnom SLE-u, koji se razvija u 2% majki s pozitivnim anti-Ro antitijelima. Anti-eritrocitna antitijela aktiviraju komplement i uzrokuju citopeniju. Neka anti-dsDNA antitijela mogu biti križno-reaktivna s *N*-metil-*D*-aspartat (NMDA) receptorima u mozgu, što u slučaju oštećenja krvno-moždane barijere može dovesti do neurokognitivnih poremećaja. Anti-fosfolipidna antitijela potiču izražaj

adhezijskih molekula na endotelu, agregaciju trombocita i sekreciju tkivnog faktora, što pogoduje nastanku tromba. Spontani pobačaji u SLE-u kod bolesnica s prisutnim anti-fosfolipidnim antitijelima povezuju se s aktivacijom komplementa uzrokovanom vezanjem anti-fosfolipidnih antitijela za stanice trofoblasta. Antitijela na ubikvitarnе antigene kao što je DNA i RNA mogu se vezati za ishemična tkiva te aktivirati komplement, čime se objašnjava reaktivacija SLE-a nakon događaja koji su uzrokovali stres i/ili sterilnu upalu.¹⁵⁶⁻¹⁶⁰

Tkivne stanice također mogu pridonijeti upali i oštećenju tkiva i organa. Polimorfizmi u genu i promotorima za kalikrein, proteazu koja može aktivirati kinin u plazmi i bradikinin u tkivima, povezani su s rizikom za razvoj SLE-nefritisa.¹⁶¹ Ultraljubičasto zračenje uzrokuje apoptozu keratinocita, a nedostatan uklanjanje apoptotskih tjelešaca u SLE-u dovodi do sekundarne nekroze i izlaganja nuklearnih autoantigena lokalnim antigen-prezentirajućim stanicama, što potiče upalu i može pridonijeti razvoju autoimunosti.¹⁶² SLE-bolesnici imaju povećanu učestalost i rizik za aterosklerozu, što se povezuje s autoantitijelima na lipoproteine te odlaganjem imunokompleksa na stanice endotela i posljedičnom upalnom reakcijom.¹⁶³⁻¹⁶⁶

1.3.4. Liječenje i prognoza SLE-a

Lijekovi u uporabi za sistemski eritemski lupus mogu se podijeliti na konvencionalne, koji uključuju antimalarike, kortikosteroide, ne-steroidne protuupalne lijekove i imunosupresivne lijekove, te na novije, ciljane lijekove, koji uključuju monoklonska antitijela. Predstavnici antimalarika su klorokin i

njegova manje toksična varijantna hidroksiklorokin, koji su prvi korak u terapiji blagog SLE-a, kožnog lupusa i prevenciji relapsa («flare»). Antimalarici dugoročno smanjuju morbiditet i mortalitet, no ne mogu liječiti teže komplikacije SLE-a. Imaju višestruk i ne do kraja razjašnjen mehanizam djelovanja, koji uključuje blokadu fagocitoze, endocitoze i acidifikaciju endosoma, što onemogućava prijenos signala putem unutarstaničnih TLR-a te efikasno procesiranje i prezentaciju antigena.^{97,167,168} Kortikosteroidi su esencijalni za kontrolu aktivnog SLE-a i relapsa. Imaju brojna imunosupresivna djelovanja, uključujući smanjenje broja cirkulirajućih T- i B-limfocita, inhibiciju efektorskih funkcija APC-a te redukciju sekrecije proupalnih citokina i kemokina.^{169,170}

Ciklofosamid je lijek izbora u liječenju bubrežnog nefritisa i uglavnom se propisuje zajedno s kortikosteroidima. Radi svoje toksičnosti ne preporučuje se u održavanju remisije, gdje se preferiraju azatioprin i mikofenolat-mofetil. Metotreksat se koristi kod artritisa i kožnih oblika bolesti rezistentih na antimalarike i kortikosteroide.¹⁶⁸ Ciljana, biološka terapija SLE-a koja je odobrena ili u procesu evaluacije u kliničkim studijama opisana je u Tablici 4.

Ranija dijagnoza, prepoznavanje bolesti i adekvatno liječenje znatno je utjecalo na ishod SLE-a. Polovicom dvadesetog stoljeća 5-togodišnje preživljenje bilo je manje od 50%, dok je danas 10-ogodišnje preživljenje 85%. U Europi, gdje je većina bolesnika bijele rase te ima blaži oblik SLE-a od populacija porijeklom iz Afrike i Azije, 10-ogodišnje preživljenje kreće se i do 92%. Najčešći uzroci smrtnosti su aktivni lupus (26,5%, većinom radi

bubrežnih komplikacija ili multiorganskog zatajenja), infekcije (25%, od kojih 22,1% su bakterijske etiologije), te tromboza (26,5%).¹⁷¹ Više od 40% novootkrivenih bolesnika sa SLE-om razvije oštećenja organa, koja su u 15% bolesnika ozbiljna, unutar 5 godina od dijagnoze.^{172,173} Također, SLE je praćen velikim socioekonomskim teretom ne samo za bolesnike, već i za njihove obitelji i zdravstveni sustav općenito.¹⁷⁴ Sve navedeno upućuje na važnost razumijevanja patogeneze SLE-a, što je nužan preduvjet za razvoj novih lijekova.

Tablica 4. Biološke terapije za SLE

Cilj lijeka	Antigen	Generičko ime lijeka	Stadij kliničke studije	Ishod
B-limfociti	Anti-CD20	rituksimab	Stadij II/III, EXPLORER i LUNAR	Nije dostigla primarne i sekundarne ciljeve
	Anti-CD20	okrelizumab	Stadij III	Prekinuta radi infekcija
	Anti-CD22	epratuzumab	Stadij IIb	Evaluacija u tijeku
	B-limfocitni tolerogen	abetimus (LJP-394)	Stadij III, studija ASPEN	Prekinuta, nakon što je pokazana neučinkovitost
	BAFF receptor	belimumab	Stadij III	Odobren za liječenje blagog SLE-a u SAD
	TACI	atacept	Stadij II za SLE nefritis	Prekinuta radi infekcija
		atacept	Stadij II/III za ne-bubrežni SLE	U tijeku
Kostimulacijske molekule	CD40-CD40 ligand	anti-CD40L (Biogen Hu5c9)	Prekinuta	Prekinuta radi tromboza
	CD28 i CTLA-4 receptori i ligandi	abatacept	Stadij II (SLE nefritis)	U tijeku
	ICOS-B7RP1	anti-B7RP1 antitijelo (AMG557)	Stadij I	U tijeku
Citokini	anti-IL-10	anti-IL-10 mAb (B-N10)	Pilot studija	Pilot studija je pokazala koristan učinak; nema još kliničkih studija
	anti-IL-1	anakinra	Dvije male studije	Nema još kliničkih studija
	anti-IL-6	tocilizumab	Stadij I	Planira se studija s više ispitanika
Ostalo	Komplement	ekulizumab (anti-C5)	Stadij I	Bez učinka u SLE-u
	NMDA receptor antagonist	memantin	Pilot studija	Pilot studija nije poboljšala kognitivne funkcije; nema još kliničkih studija
	IFN- α	MEDI-545	Stadij I studija	U tijeku

*prilagođeno prema Yildirim-Toruner & Diamond, *J Allergy Clin Immunol* 2011¹⁶⁸

HIPOTEZA I CILJEVI

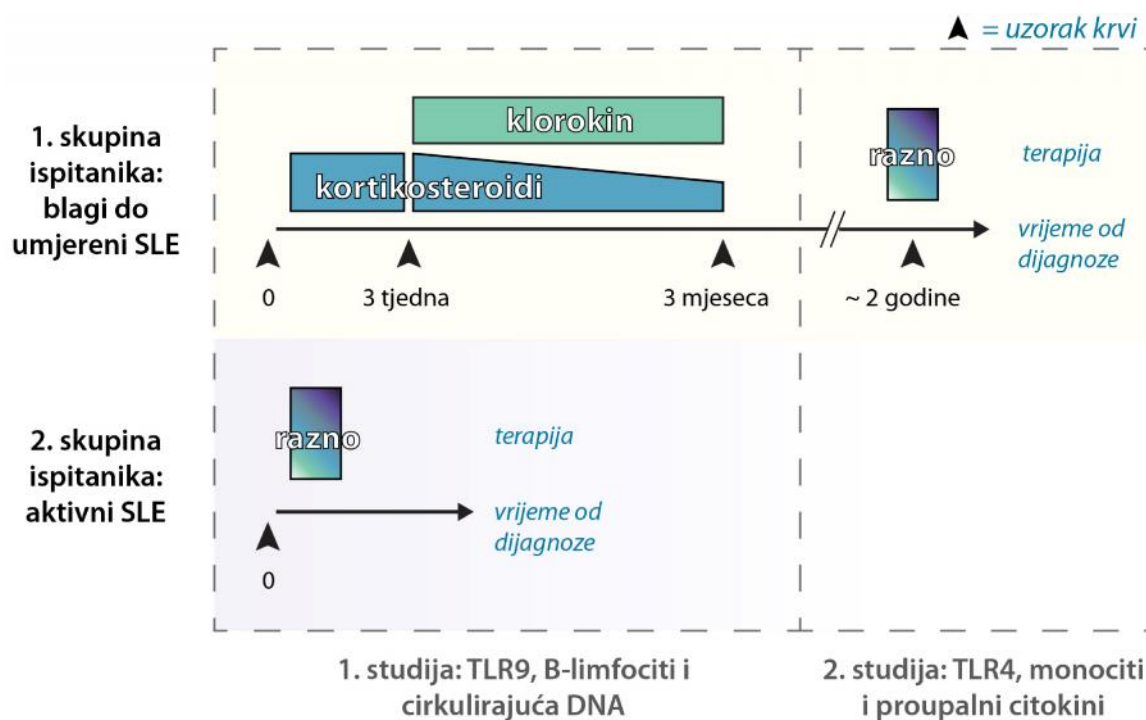
Dosadašnja istraživanja pokazala su važnost aktivacije urođene imunosti endogenim ligandima kao što je DNA i hiper-reaktivnosti B-limfocita u patogenezi SLE-a. Shodno tome, intenzitet autoimunskih procesa u bolesnika korelirao bi s izražajem TLR-a u cirkulirajućim leukocitima, razinom slobodne endogene DNA i imunostimulatornim citokinima, te bi se njihova manifestacija mogla modulirati klorokinom, lijekom koji inhibira prijenos signala unutarstaničnih TLR-a.

Da bi ispitali gore navedenu hipotezu, odredili smo slijedeće ciljeve: izmjeriti izražaj TLR9 u B-limfocitima novootkrivenih bolesnika sa SLE-om prije terapije te nakon terapije klorokinom i/ili kortikosteroidima, te u serumu izmjeriti cirkulirajuću DNA i citokine BAFF i IL-10, koji imaju stimulirajući učinak na B-limfocite. Izolirane periferne mononuklearne stanice (PBMC, od engl. peripheral blood mononuclear cells) bolesnika sa SLE-om stimulirat će se *in vitro* CpG oligonukleotidom, ligandom TLR9, te će se ispitati da li klorokin i/ili kortikosteroidi moduliraju aktivaciju B-limfocita te sekreciju IL-10 i BAFF-a. Da bi istražili da li imunomodulirajući lijekovi utječu na sposobnosti obrane od bakterijske infekcije, jednom od glavnih uzroka smrtnosti u SLE-u, mjerit će se izražaj TLR4 na monocitima bolesnika te sposobnost klorokina i/ili kortikosteroida da inhibiraju signalizaciju putem TLR4 i posljedičnu sekreciju proupalnih citokina *in vitro* nakon stimulacije izoliranih PBMC-aLPS-om, ligandom TLR4.

MATERIJAL I METODE

3.1. Ispitanici

Ispitanici sa SLE-om dijagnosticirani su prema kriterijima Američkog reumatološkog kolegija (ACR), a aktivnost bolesti utvrđena je koristeći SLEDAI (od engl. SLEdisease activity index) indeks.^{175,176} Bolesnici su uzorkovani netom nakon uspostavljanja dijagnoze i prije propisivanja imunomodulatorne terapije. Prva skupina ispitanika sastojala se od 11 žena s blagim do umjerenim SLE-om u trenutku postavljanja dijagnoze, s kliničkom prezentacijom prikladnom za terapiju klorokinom. Uzorci krvi uzimani su prije početka liječenja, nakon 3 tjedna kortikosteroidne terapije (prosječno 10.5 mg metilprednizolona/dan), te nakon 3 mjeseca po uvođenju klorokina (250 mg/dan) i reduciranja doze kortikosteroida (prosječno 7 mg/dan). Dodatni uzorak je prikupljen 2-3 godine nakon dijagnoze u 9 ispitanika, kad je 5 bolesnica liječeno klorokinom (250 mg/dan) i kortikosteroidima (4 ili 8 mg/dan), dok su ostale bile bez terapije ili samo na nesteroidnim protuupalnim lijekovima. Druga skupina ispitanika sastojala se od 4 bolesnika (3 žene i jedna muškarac) s aktivnom bolesti, čiji su se periferni leukociti primarno koristili u staničnim kulturama za eksperimentalnu potvrdu rezultata *ex vivo*. Uzorci bolesnika prikupljeni su i korišteni za dvije odvojene studije, što je shematski prikazano na Slici 2. Kratki pregled aktivnosti bolesti, simptoma i prisutnih autoantitijela nalazi se u Tablici 5.



Slika 2. Uzorci periferne krvi dvije skupine bolesnika sa SLE-om ispitivani su u dvije odvojene studije. Strelica (▲) označava vrijeme uzimanja uzorka. Terapija «razno» uključuje različite doze kortikosteroida, klorokin i ciklofosfamid, pojedinačno ili u kombinaciji (ovisno o kliničkoj slici bolesnika).

Tablica 5. Klinički podaci ispitanika sa SLE-om prije terapije, u trenutku uzorkovanja.

	n	SLE-DAI*	Glavni simptomi	Proteinurija (24h)	anti-dsDNA antitijela [#]	RF [#]	ENA-6 [#]
Blagi do umjereni SLE	11	5	artritis, osip, limfopenija, umor	0,16 – 0,28 g (3/11)	2/11	4/11	1/11
Aktivni SLE	4	17	artritis (3/4), nefritis (2/4), CNS lupus (1/4), ↓komplement (4/4)	4,8 - 2,9 g (2/4)	4/4	1/4	3/4

* Jedna bolesnica sa SLEDAI = 7 uključena je u "aktivni SLE" skupinu radi brze progresije bolesti i pogoršavajuće trombocitopenije.

[#]označava broj bolesnika sa simptomom ili antitijelom od ukupnog broja bolesnika.

CNS = središnji živčani sustav (od engl. *central nervous system*); ANA = anti-nuklearna antitijela; dsDNA = dvostruko uzvojita DNA; RF = reumatoidni faktor; ENA-6 = ekstraktabilni nuklearni antigeni (od engl. *extractable nuclear antigen-6*, koji se sastoji od anti-SS-A/Ro, -SS-B/La, -Sm, -Sm/RNP, -Jo-1, -Scl-70 antitijela).

U vrijeme uzorkovanja bolesnici su također prošli kliničku obradu tijekom koje se utvrdila aktivnost bolesti, kompletna krvna slika, sedimentacija eritrocita, razina C-reaktivnog proteina, komplementa, proteinurije i autoantitijela (anti-nuklearna antitijela, anti-dsDNA antitijela, reumatoidni faktor te ENA-6 profil, kojeg čine anti-SS-A/Ro, -SS-B/La, -Sm, -Sm/RNP, -Jo-1 i -Scl-70 antitijela). Nadalje, uzorci periferne krvi prikupljeni su i od zdravih ispitanika (n=11), koji su spolom i dobi prilagođeni skupini ispitanika sa SLE-om.

Studija je odobrena od strane Etičkih povjerenstava Kliničke bolnice Dubrava, Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Ispitanici su pružili informirani pristanak prije uzimanja uzoraka. Svi postupci bili su u skladu s Helsinškom deklaracijom za medicinska istraživanja na ljudima.¹⁷⁷

3.2. Laboratorijske metode

3.2.1. Uzorci krvi

Periferna krv ispitanika prikupljana je venipunkcijom koristeći Vacutainer® epruvete (BD, Franklin Lakes, SAD) bez antikoagulansa (za prikupljanje seruma), ili natrij-heparinom (za fenotipizaciju pune krvi i izolaciju perifernih mononuklearnih stanica) odnosno EDTA (za izolaciju DNA i određivanje polimorfizama). Uzorci su procesirani unutar 3 sata od vađenja krvi. Serum je izoliran nakon dvije inkubacije krvi (prvo 30' na sobnoj temperaturi, zatim 30' na +4°C) centrifugiranjem na 3000xg na +4°C kroz 10' u Heraeus Omnifuge 2.0 RS centrifugi (Heraeus Instruments, Hanau, Njemačka), te alikvotiran i

pohranjen na -80°C . Uzorci krvi s EDTA pohranjeni su netom nakon venepunkcije na -20°C do izolacije DNA i određivanja polimorfizama.

3.2.2. Reagensi

Deksametazon, klorokin, lipopolisaharid (LPS, *E. coli* 0111:B4) i brefeldin A (BFA) proizvedeni su u Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen, Njemačka). CpG oligonukleotid (C-tip, M362), proizveden u Invivogenu (Toulouse, Francuska), korišten je u koncentraciji od $5\text{ }\mu\text{g/mL}$. Deksametazon je korišten u farmakološkoj koncentraciji od 10^{-6} M .¹⁷⁸ Klorokin je korišten u koncentraciji od $2 \times 10^{-6}\text{ M}$, LPS u koncentraciji od 100 ng/mL , a brefeldin A u koncentraciji od $10\text{ }\mu\text{g/mL}$. Svi su reagensi titrirani prije uporabe.

3.2.3. Kultura stanica

Periferne mononuklearne stanice (PBMC) izolirane su iz periferne heparinizirane krvi na gradijentu gustoće Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Uppsala, Švedska). Ficoll je neutralni, hidrofilni polisaharid visoke mase i visoke gustoće u vodenoj otopini ($1,077\text{ g/mL}$) na kojeg se nasloji krv, te se centrifugiranjem razdvoji na četiri dijela: u talogu su granulociti i eritrociti, iznad njih Ficoll, zatim prsten PBMC-a koji sadržava limfocite i monocite, te na vrhu plazma i trombociti. Krv se prije nadslojavanja razrijedila 1:1 s fiziološkom otopinom s fosfatnim puferom (PBS; od engl. phosphate-buffered saline), nadslojila na jednak volumen Ficoll-a te centrifugirala na $800\times g/30'/\text{RT}$ (sobna temperatura, od engl. room temperature) u Heraeus Omnifuge 2.0 RS centrifugi. Prsten PBMC-a sakupio se Pasteurovom pipetom i prebacio u novu epruvetu, te isprao od ostataka Ficolla i plazme

centrifugiranjem s PBS-om na 600xg/5'/RT dva puta uzastopno. Broj i vijabilnost PBMC-a odredili smo pomoću Neubauerovog hemocitometra s 0,4% otopinom reagensa Trypan Blue (Sigma-Aldrich). Vijabilnost je uvijek bila $\geq 97\%$.

Nakon ispiranja i brojanja, $0,5$ ili 1×10^6 /mL PBMC-iresuspendiranisu u mediju RPMI 1640 (koji je sadržavao $50 \mu\text{g/mL}$ gentamicin sulfata) s 10% autolognog serumu 12×75 mm (5 mL) polistirenskim Falcon-epruvetamakružnog dna (BD Biosciences, San Jose, SAD) za mjerenje citokina protočnom citometrijom ili u polistirenskim pločama s 24 jažice (Corning, Amsterdam, Nizozemska) za mjerenje citokina enzimskim imunoesejem (ELISA, od engl. enzyme linked immunosorbent assay). PBMC-i su analizirani prije ili nakon inkubacije na 37°C u atmosferi s 5% CO_2 u Heracell Heraeus inkubatoru (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD) u naznačenim vremenskim razmacima. Vrijeme inkubacije s deksametazonom izabrano je prema prijašnjim studijama koje su pokazale da je najmanje 16h do 24h potrebno za optimalnu inhibiciju sekrecije citokina,¹⁷⁹ te našim preliminarnim rezultatima koji su pokazali smanjenje vijabilnosti limfocita u kulturama s deksametazonom duljim od 24h. PBMC-i su kultivirani 18h za mjerenje IL-10 sa ili bez CpG, deksametazona i klorokina, dok su IL-6 i TNF- α mjereni nakon 6h inkubacije sa ili bez LPS-a, nakon 24h i 48h pre-inkubacije u mediju sa ili bez deksametazona i klorokina. Nakon isteka inkubacije, PBMC-i su centrifugirani na $600 \times g / 5' / \text{RT}$, supernatant kultura prikupljen i pohranjen na -80°C prije ELISA-testa za dotični citokin. Svi postupci izolacije i kultivacije stanica vršeni su u sterilnim uvjetima koristeći

sterilne reagense i potrošni materijal testiran na prisutnost endotoksina. Svaka kultura sadržavala je i nestimulirani uzorak inkubiran samo u mediju kao negativnu kontrolu.

3.2.4. ELISA

Koncentracija IL-10 i BAFF citokina u serumima i supernatantima kulture PBMC-a mjereni su prema protokolu proizvođača koristeći Human High-Sensitivity IL-10 ELISA (Bender MedSystems, Beč, Austrija) i Quantikine Human BAFF Immunoassay (R&D Systems, Abingdon, Velika Britanija). Koncentracija TNF- α i IL-6 u supernatantima kulture PBMC-a mjereni su prema protokolu proizvođača koristeći Quantikine Human TNF- α odnosno IL-6 ELISA test (R&D Systems). Absorbancija se očitavala na Multiskan Spectrum spektrofotometru (Thermo Fisher Scientific) prema uputama proizvođača.

3.2.5. Protočna citometrija

Izražaj TLR9 i BAFF-receptora (BAFF-R) na B-limfocitima te TLR4 na monocitima analiziran je koristeći metodu pune krvi “lyse-wash” (engl. liziraj-isperi).¹⁸⁰ Heparinizirana krv u volumenu od 50 μ L po epruveti najprije je obilježena monoklonskim antitijelima za površinske antigene inkubacijom 15' u mraku na RT. Eritrociti su potom lizirani dodavanjem 2 mL BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences) po epruveti i inkubacijom 10'/RT u mraku. Po isteku inkubacije, epruvete su centrifugirane na 600xg/5'/RT (“ispiranje”), te supernatant odliven. Resuspendirani talog ispran je dodavanjem 3 mL

pufera za obilježavanje. Supernatant je potom odliven, talog resuspendiran i stanice fiksirane dodavanjem 150 μ L 1% ili 4%-tnog formaldehida, ovisno da li je obilježavanje bilo površinsko odnosno unutarstanično. Ukoliko se nastavilo s unutarstaničnim obilježavanjem, nakon fiksacije od 20'/4°C stanice su se isprale s 3 mL permeabilizacijskog pufera po epruveti. Unutarstanično obilježavanje provedeno je inkubacijom 30'/+4°C, po čemu su stanice isprane permeabilizacijskim puferom, te talog resuspendiran u 200 μ L pufera za obilježavanje. Obilježavanje PBMC-a izvođeno je na isti način, no bez liziranja eritrocita.

Sekrecija IL-10 u B-limfocitima inducirana je nakon inkubacije PBMC-a u RPMI 1640 mediju s 10% autolognog seruma tijekom 18h s CpG, deksametazonom ili klorokina. BFA je dodan zadnjih 6h inkubacije. Stanice su potom inkubirane 5' na ledu da bi se monociti odvojili od stijenke epruvete. Epruvete su zatim isprane i obilježene s CD19, površinskim biljekom B-limfocita te unutarstaničnim antitijelom za IL-10 (klon JES3-9D7) prema gore navedenom protokolu.

Sekrecija IL-6 i TNF- α u monocitima inducirana je nakon prethodne inkubacije PBMC-a tijekom 24h i 48h dodatkom 100 ng/mL LPS-a u prisustvu BFA. Nakon 6h, monociti su odvojeni od stijenke epruveta inkubacijom na ledu, isprani s PBS-om, resuspendirani u 100 μ L PBS-a i inkubirani s 0,5 μ L rekonstituirane boje za vijabilnost LIVE/DEAD Fixable Aqua (Invitrogen, Carlsbad, SAD) 30' na ledu, u mraku. Uzorci su potom isprani s PBS-BSA i

obilježeni s CD14 FITC, površinskim biljekom monocita te unutarstaničnim antitijelima za IL-6 i TNF- α prema gore navedenom protokolu.

Zaseban test vijabilnosti koji može razlikovati apoptozu od nekroze obilježavanjem s aneksinom V odnosno 7-aminoaktinomicinom D (7-AAD) (Invitrogen) izvršen je prema uputama proizvođača. PBMC-i su isprani s aneksin-vežućim puferom te obilježeni s annexin VAlexa Fluor 488 monoklonskim antitijelom, 7-AAD i površinskim biljezima prema gore navedenom protokolu.

Svi uzorci prikupljeni su na FACSCalibur ili LSRII protočnom citometru i analizirani pomoću programa CellQuest odnosno DiVa (BD Biosciences). Program FlowJo korišten je za grafički prikaz rezultata (Tree Star Inc., Ashland, SAD). Sva antitijela titrirana su prije uporabe i prikladne izotipske kontrole korištene za obilježavanje. Detaljan opis monoklonskih antitijela nalazi se u Tablici 6, a opis i sastav pufera u Tablici 7. Podaci su izraženi kao postotak pozitivnih stanica za pojedini biljeg unutar određene populacije ili kao MFI (od engl. mean fluorescence intensity; srednji intenzitet fluorescencije), koji može odražavati gustoću pojedinog antigena po stanici.

Tablica 6. Monoklonska antitijela korištena u protočnoj citometriji

Antigen	Fluoro-krom	Proizvođač	Volumen/ epruveta (mL)	Ciljne stanice	Površinsko / unutarsta- nično (P/U)	Krv / PBMC
CD19	PE-Cy5	BD Biosciences	5	B-limfociti	P	Krv i PBMC
CD14	FITC	BD Biosciences	5	monociti	P	Krv
CD14	PE	BD Biosciences	5	monociti	P	PBMC
BAFF-R	FITC	BD Biosciences	7,5	B-limfociti	P	Krv
CD86	FITC	BD Biosciences	5	B-limfociti	P	PBMC
TLR4	PE	eBioscience	10	monociti	P	Krv
TLR9	PE	eBioscience	5	B-limfociti	U	Krv
IL-10	PE	BD Biosciences	1,25	B-limfociti	U	PBMC
IL-6	FITC	BD Pharmingen	1,25	monociti	U	PBMC
TNF-a	APC	BD Pharmingen	1,25	monociti	U	PBMC

Tablica 7. Sastav pufera korištenih u obilježavanju monoklonskim antitijelima i protočnoj citometriji

Ime pufera	Baza	Sastav baze (g/L)	pH	Serum	Ostali dodaci
PBS	Dulbecco PBS	0,13 CaCl ₂ , 0,1 MgCl ₂ , 0,2 KCl, 8,0 NaCl, 0,2 KH ₂ PO ₄ , 1,15 Na ₂ HPO ₄	7,4	-	-
Pufer za obilježavanje	Dulbecco PBS		7,2 - 7,4	1% FBS	0,01% NaN ₃
Pufer za permeabilizaciju	Dulbecco PBS		7,2 - 7,5	-	0,1% saponin
Aneksin-vežući pufer	10x koncentriran u H ₂ O	10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl ₂	7,4	-	-
PBS-BSA	Dulbecco PBS		7,2- 7,4	1% BSA	-

Kratice: FBS = serum goveđeg fetusa (od engl. *fetal bovine serum*); BSA = goveđi serumski albumin (od engl. *bovine serum albumin*).

3.2.6. Mjerenje fosforiliranog statusa proteina protočnom citometrijom

Status fosforilacije podjedinice p65 transkripcijskog faktora NF- κ B mjeren je u kulturi PBMC ($0,5 \times 10^6$ u 0,5 mL RPMI 1640 s 10% autolognog seruma) nakon 15' inkubacije sa ili bez 100 ng/mL LPS. Autologni serum nije bio toplinski inaktiviran kako bi se osigurala optimalna bioaktivnost protein koji veže LPS (LBP, od engl. lipopolysaccharide-binding protein).¹⁸¹ Stanice su potom trenutno fiksirane dodatkom 0.5 mL 4%-tnog formaldehida prethodno zagrijanog na 37°C i inkubacijom na 37°C da bi se spriječila inače brza defosforilacija.¹⁸² Po isteku inkubacije fiksirani PBMC-i pohranjeni su na -80°C do daljnje analize, a otapani su istovremeno u vodenoj kupki zagrijanoj na 37°C, te isprani s puferom za obilježavanje. Permeabilizacija je izvršena polaganim kapanjem 90%-tnog metanola tijekom kojeg je epruveta sa stanicama blago vorteksirana, da se spriječi agregacija pod utjecajem metanola. PBMC-i u metanolu inkubirani su 30' na ledu, te dva puta isprani s puferom za obilježavanje. Stanice su potom obilježene s NF- κ B p65 Alexa Fluor 488 monoklonskim antitijelom (BD Phosflow, San Jose, SAD) tijekom 45' na ledu. Nakon još jednog ispiranja puferom za obilježavanje, PBMC su resuspendirani u 200 μ L istog te analizirani pomoću protočnog citometra FACSCalibur. Fenotipizacija monocita antitijelima nije bila moguća jer je metanol kompromitirao testirane površinske epitope za CD14 i CD33, te su monociti diferencirani od limfocita na temelju njihovog karakterističnog raspršenja svjetlosti (engl. forward-scatter i side-scatter).¹⁸³

3.2.8. Određivanje polimorfizama pojedinačnih nukleotida lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu

Određivanje polimorfizama pojedinačnih nukleotida (SNP; od engl. single nucleotide polymorphism) izvršeno je kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu (engl. real-time PCR odnosno qPCR) na ABI PRISM 7000 Sequence Detection System instrumentu (Applied Biosystems, Foster City, SAD) kao što je opisano ranije.¹⁸⁴ Komercijalno dostupni TaqMan SNP-kitovi za genotipizaciju (Applied Biosystems) koristili su se za određivanje IL10 -1082 A/G (rs1800896) i TNF α -308 G/A (rs1800629) SNP-ova prema protokolu proizvođača. Kontrolni uzorci za moguće SNP-genotipove i NTC-kontrola (od engl. no template control; prisutni svi reagensi osim same DNA) analizirani su paralelno s uzorcima DNA ispitanika.

3.2.9. Izolacija i kvantifikacija cirkulirajuće DNA iz seruma

DNA korištena kao standard izolirana je iz PBMC-a zdravih kontrola pomoću fenol-kloroform metode.¹⁸⁵ Čistoća i koncentracija izolirane DNA određena je Eppendorf BioPhotometer spektrofotometrom (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) prema uputama proizvođača. Cirkulirajuća DNA izolirana je iz 50 μ L seruma (prethodno pohranjenog na -80°C) koristeći QIAamp DNA Mini Kit blood and body fluid kit (Qiagen, Hilden, Njemačka) prema uputama proizvođača. Centrifugiranje se vršilo u Eppendorf 5415C mikrocentrifugi (Eppendorf). Eluirana DNA pohranjena je -20°C do qPCR analize. Deset μ L eluata daljnje je razrijeđeno i korišteno kao kalup (engl. template).

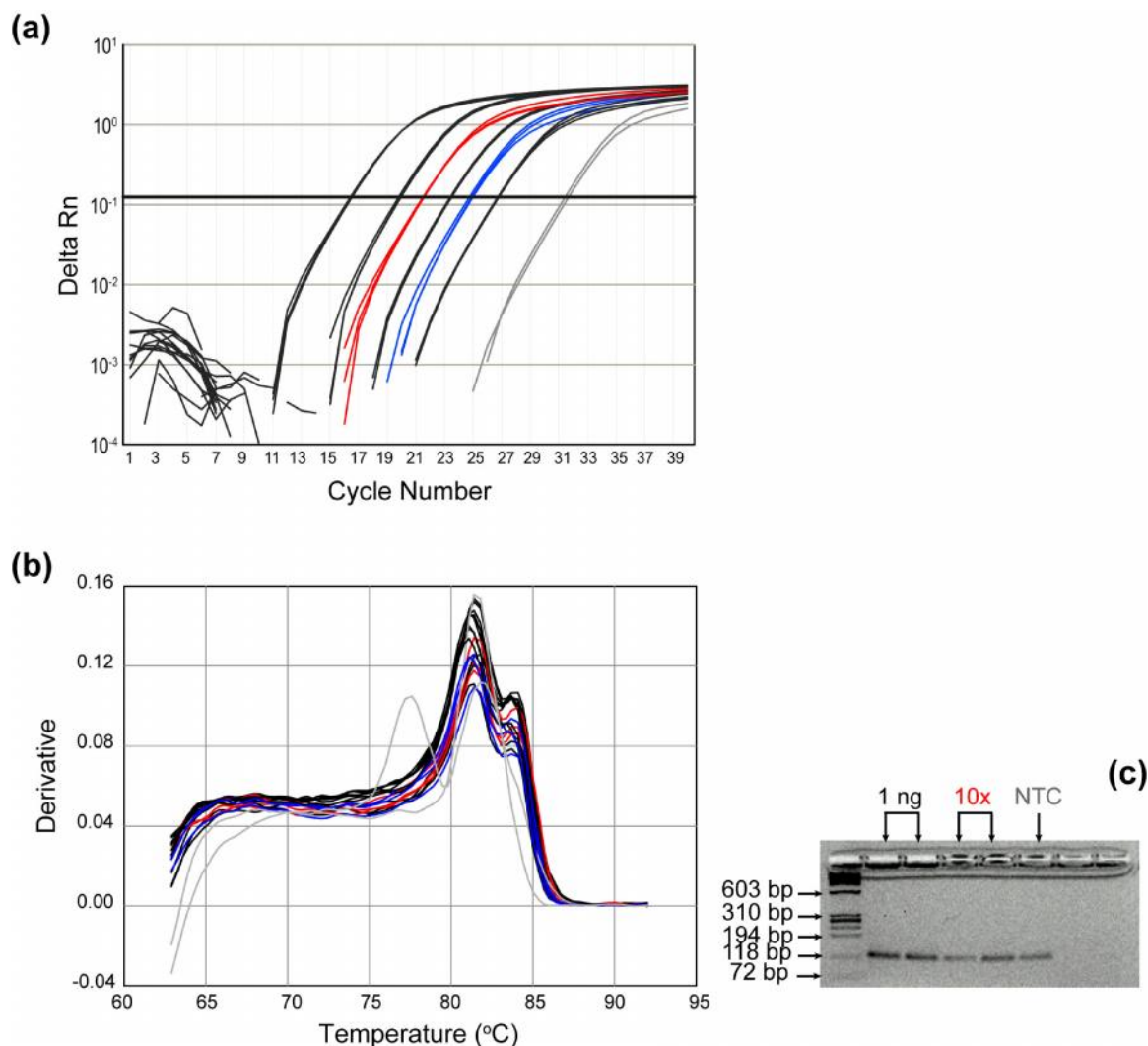
Da bi uspostavili metodu za kvantifikaciju cirkulirajuće DNA qPCR-om, testirali smo tri različite početnice: Alu 115, Yb8 i Ya5.¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ Početnice zaporođicu sekvenci Alu Ya5 odabranesu zbog optimalnog učinka baziranog na efikasnosti qPCR-reakcije i uniformnosti PCR-produkta.^{188,189} Kako serum sadrži razne potencijalne inhibitore PCR-reakcije kao što su hem i laktoferin koji mogu zaostati u tragovima u izoliranoj DNA, uspoređen je kapacitet amplifikacije polimeraze AmpliTaq Gold, koja je jedna od najčešće upotrebljivanih polimeraza, i polimeraze rTth koristeći serijska razrjeđenja i uzorke s dodanom poznatom količinom (engl. spike-in) DNA. U skladu s prijašnjim studijama,¹⁹⁰⁻¹⁹³ AmpliTaq Gold je bila susceptibilna inhibiciji, te je rTth korištena u daljnjim pokusima. Za validaciju metode korišteni su uzorci seruma tri zdrava donora alikvotirani u tri jednaka dijela, te se iz svakog zasebno izolirala i kvantificirala DNA. Koeficijent varijacije (CV; od engl. coefficient of variation) između različitih alikvota istog donora (engl. inter-assay variability) za uzorke razrijeđene 1:10 bio je $8,9 \pm 4,7\%$ (prosjeak $\pm$ SD), a za uzorke razrijeđene 1:100 $11,7 \pm 8,6 \%$. CV između replikata istog donora u istom testu (engl. intra-assay variability) bio je $5,6 \pm 5,2$ za uzorke razrijeđene 1:10, i $8,3 \pm 4,5\%$ za uzorke razrijeđene 1:100. Nerazrijeđeni uzorci nisu se koristili jer su inhibirali PCR-reakciju. Posljedično, uzorci razrijeđeni 1:10 korišteni su za kvantifikaciju, a uzorci razrijeđeni 1:100 kao interne kontrole; 1:10/1:100 odnos manji od 8,3 ukazivao je na inhibiciju, pošto je bio veći od varijabilnosti koja je mogla nastati pogreškom pri pipetiranju i/ili varijacijom u temperaturi tijekom PCR-reakcije. Takvi su uzorci izbačeni iz analize.

Prednja početnica (engl. forward; GTCAGGAGATCGAGACCATCCC) i stražnja početnica (eng. reverse; TCCTGCCTCAGCCTCCCAAG) naručene su od Applied Biosystems. Nakon optimizacije uvjeta qPCR-reakcije i koncentracije reagensa, qPCR je izveden pomoću SYBR® Green PCR core reagents kitai rTth DNA polimerazes pripadajućim puferima (Applied Biosystems) u 30 µL-reakcijskom volumenu koji je sadržavao 1x SYBR® Green, 0,5 µM svake početnice, 3 mM MgCl₂, 1,5 mM dNTP, 1,5 U rTth polimeraze, 1x rTth kelirajućeg pufera (5% (v/v) glycerol, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 0,1 M KCl, 0,05% (w/v) Tween® 20, 0,75 mM EGTA), 10 µL DNA i vodu bez nukleaza. qPCR reakcije izvedene su u ABI 7500 ili StepOne Plus instrumentu (Applied Biosystems) u slijedećim uvjetima: početna denaturacija na 94°C / 60", 40 ciklusa denaturacije na 94°C / 10", spajanje na 68°C / 30", elongacija na 72°C / 60", te disocijacijska krivulja početno na 60°C s postepenim porastom temperature do 95°C. Standardi (1000, 100, 10 i 1 pg DNA izolirane iz PBMC-a zdravih kontrola) i NTC-kontrole uključene su u svaku reakciju. Amplifikacija standarda bila je u triplikatu, a eksperimentalnih uzoraka (1:10 i 1:100 razrjeđenje za svaki uzorak) u triplikatu ili duplikatu. Reprezentativna PCR-reakcija standardne DNA i uzorka jednog SLE bolesnika prikazana je na Slici 3a.

Metoda je provjerena analizom disocijacijskih krivulja pri svakoj qPCR-reakciji. Disocijacijske krivulje prikazuju promjenu apsorbancije tijekom zagrijavanja dvostruko uzvojite DNA, koja raste tijekom disocijacije dva lanca. Disocijacijske krivulje omogućavaju identifikaciju dimerizacije početnica, kontaminirajuće DNA i polimorfizama, s obzirom da detektiraju

razliku u točki disocijacije različitih amplikona. Reprezentativna disocijacijska krivulja prikazana je na Slici 3b. Nadalje, qPCR-produkti vizualizirani su elektroforezom u 3%-tnom agaroznom gelu i masa je odgovarala očekivanom 124bp amplikonu Alu Ya5 sekvence (Slika 3c). Alu Ya5 DNA u NTC-kontroli nakon 28. ciklusa qPCR-a detektirana je i u drugim studijama, te se smatra da predstavlja ultra-nisku kontaminaciju PCR-reagensa i/ili radnog prostora ljudskom DNA prisutnom u okolišu.^{188,194}

Odabrani PCR-produkti su također sekvencirani. Najprije su razlučeni elektroforezom na 2,3 % agaroznom gelu i pročišćeni kitom QIAEX II Gel Extraction (Qiagen) prema uputama proizvođača. Pročišćena DNA sekvencirana je koristeći početnice Alu Ya5 korištene u qPCR-u i BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) prema uputama proizvođača na 3130 Genetic Analyser instrumentu (Applied Biosystems), gdje je izvršena i analiza sekvenci. Dobivene sekvence usporedile su se s već objavljenim sekvencama Alu Ya5u NCBI (od engl. National Center for Biotechnology Information; Nacionalni centar za biotehnoške informacije, Bethesda, SAD) pomoću BLAST-servisa za analizu sekvenci (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) i pokazane su odgovarajućima.



Slika 3. Reprezentativna qPCR kvantifikacija cirkulirajuće serumske DNA s početnicama Alu Ya5.

Izolirana serumska DNA SLE-bolesnikarazrijeđena je 1:10 (crvena linija) i 1:100 (plava linija) te uspoređena s poznatom koncentracijom standardne DNA (crna krivulja; 1 ng, 100 pg, 10 pg i 1 pg DNA s lijeva na desno). NTC-kontrola prikazana je sivom linijom. Normalizirana fluorescencija u odnosu na broj ciklusa prikazana je u (a), a disocijacijska krivulja u (b). Odabrani amplikoni detektirani su na 3%-tnom agaroznom gelu obilježavanjem s etidij-bromidom (c).

3.2.9. Statistička analiza podataka

Podaci dobiveni analizom uzoraka *ex vivo* analizirani su ne-parametarskim testovima (Mann Withney *U* test za dva neovisna uzorka, Kruskal-Wallis ANOVA *post hoc* analizom za više neovisnih uzoraka, a Friedman ANOVA *post hoc* analizom za više ovisnih uzoraka). Podaci dobiveni iz pokusa gdje

je broj uzoraka (n) < 4 prikazan je s prosjekom i standardnom devijacijom (SD) kao indikatorima centralne tendencije i varijabilnosti, no nije vršena statistička analiza. Korelacija eksperimentalnih podataka analizirana je Spearman rank testom. Analize su izvršene pomoću Statistica 8.0 programa (StatSoft, Tulsa, SAD). Vrijednost $p < 0,05$ smatrala se značajnom.

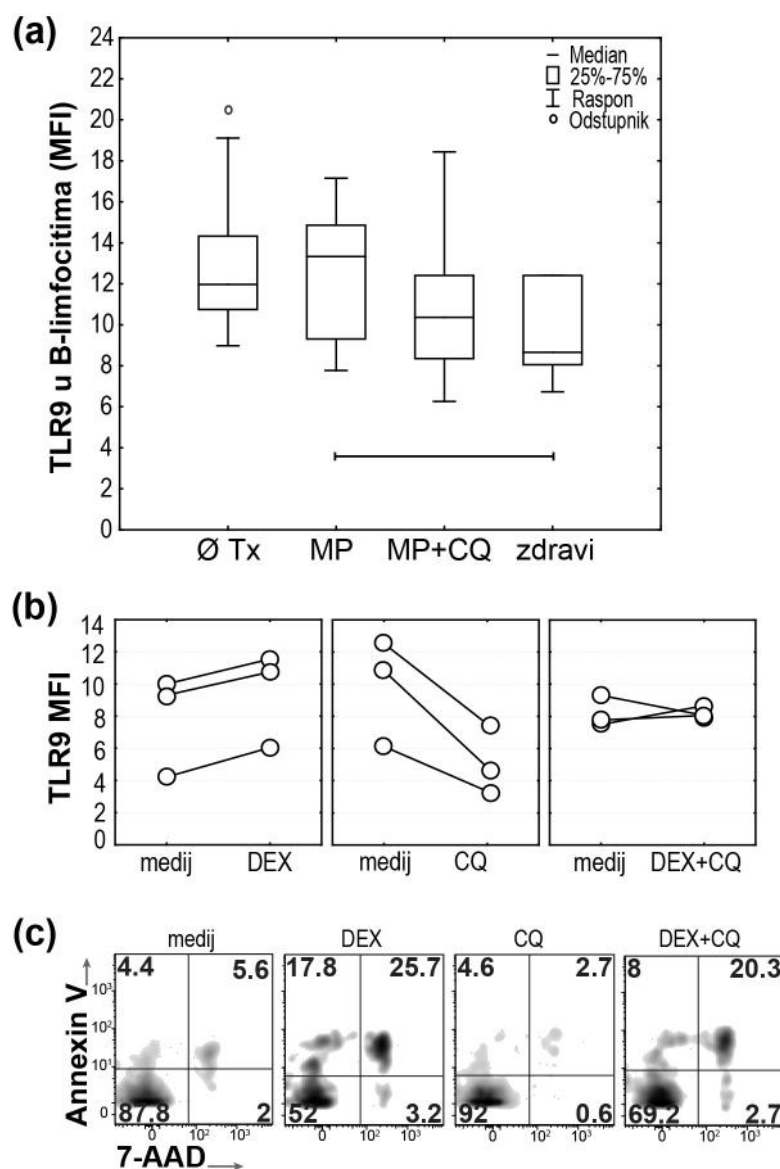
Vrijednosti podataka «daleko» od sredine distribucije prikazani su kao odstupnici (engl. outlier) i ekstremi (engl. extremes). Odstupnici uključuju vrijednosti $> \text{UBV} + \text{o.c. (UBV - LBV)}$, ili $< \text{LBV} + \text{o.c. (UBV - LBV)}$, dok ekstremi uključuju vrijednosti $> \text{UBV} + 2 \times \text{o.c. (UBV - LBV)}$, ili $< \text{LBV} + 2 \times \text{o.c. (UBV - LBV)}$. UBV (od engl. upper box value) označava vrijednost 75. percentile, LBV (od engl. lower box value) označava vrijednost 25. percentile, a o.c. (od engl. outlier coefficient, koeficijent odstupnika) u ovom slučaju iznosi 1,5.

REZULTATI

4.1. Izražaj TLR9 u B-limfocitima, cirkulirajuća DNA, IL-10 i BAFF

4.1.1. Klorokin ne utječe na ekspresiju TLR9 u B-limfocitima

Izražaj TLR9 u B-limfocitima periferne krvi novo-otkrivenih bolesnica sa SLE-om ispitan je u 3 točke: prije terapije, nakon 3 tjedna terapije kortikosteroidima, te nakon 3 mjeseca po uvođenju klorokina i smanjenju doze kortikosteroida. B-limfociti bolesnika na kortikosteroidnoj terapiji imali su viši izražaj TLR9 od zdravih kontrola ($p = 0,018$, Mann-Whitney U test; slika 4a). Kako izražaj TLR9 nije korelirao s aktivnosti bolesti mjerenoj indeksom SLEDAI, istraženo je da li prisustvo kortikosteroida u kulturi limfocita može modulirati izražaj TLR9. PBMC-i zdravih kontrola inkubirani su s deksametazonom i/ili klorokinom, te je izražaj TLR9 u B-limfocitima mjeran prije i nakon 24h, 48h i 72h. Nakon 72h izmjeran je blagi porast izražaja TLR9 u kulturi s deksametazonom u usporedbi s nestimuliranim stanicama (slika 4b), dok u prijašnjim točkama nije bilo promjene. No nakon 72h, deksametazon je smanjio vijabilnost limfocita (slika 4c), što je onemogućilo razlikovanje između efekta kortikosteroida i apoptoze na izražaj TLR9.



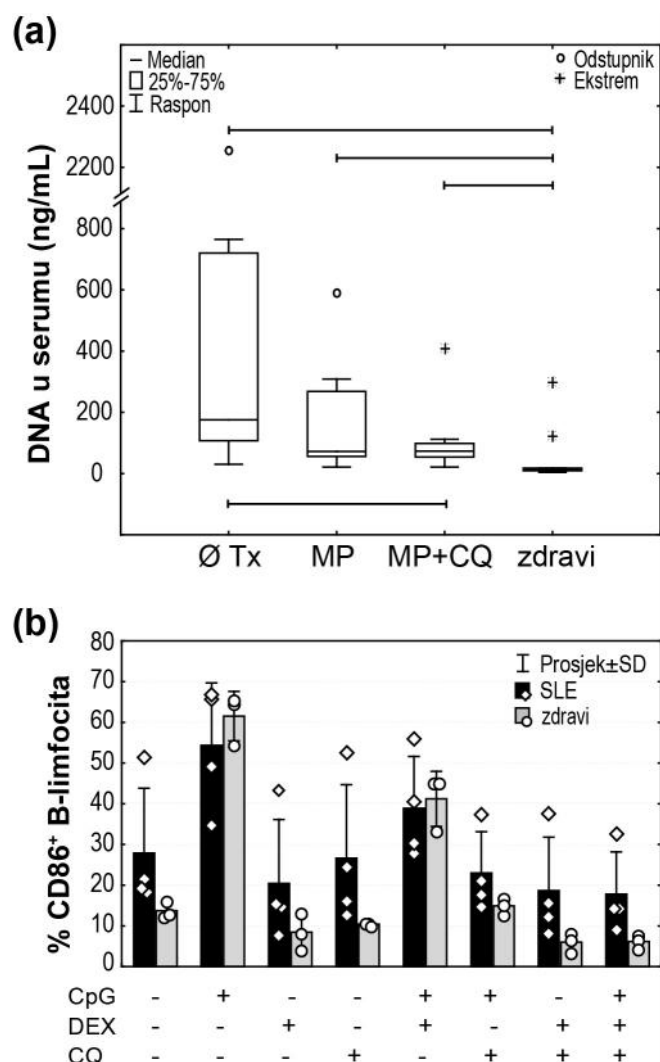
Slika 4. Izražaj TLR9 u B-limfocitima *ex vivo* i *in vitro*.

TLR9 MFI (od engl. mean fluorescence intensity; srednji intenzitet fluorescencije) u B-limfocitima periferne krvi SLE bolesnika (n=11) prije liječenja (Ø Tx), nakon 3 tjedna kortikosteroidne terapije (MP; metil-prednizolon), te 3 mjeseca nakon uvođenja klorokina s redukcijom doze kortikosteroida (MP+CQ; metil-prednizolon+klorokin), u usporedbi sa zdravim kontrolama (zdravi, n=11) izmjeren je protočnom citometrijom. Horizontalna linija označava statistički značajnu razliku. (a). Utjecaj kortikosteroida (DEX; deksametazon) i klorokina (CQ) na TLR9 MFI u B-limfocitima *in vitro*, nakon 72h kulture PBMC-a zdravih kontrola. Krugovi označavaju pojedine uzorke (b). Reprezentativni prikaz vijabilnosti B-limfocita u kulturi PBMC-a jednog zdravog donora nakon 72h inkubacije u mediju ili u prisutnosti kortikosteroida (DEX) i/ili klorokina (CQ). Annexin V⁺ obilježavanje indicira apoptozu, 7-AAD⁺ nekrozu, a dvostruko pozitivno obilježene stanice prijelazni stadij iz apoptoze u sekundarnu nekrozu (c).

4.1.2. Klorokin smanjuje cirkulirajuću DNA u bolesnika sa SLE-om i inhibira TLR9-posredovanu aktivaciju B-limfocita

Potom je ispitano da li je DNA, ligand za TLR9, prisutna u serumu bolesnika sa SLE-om i time u potencijalnom kontaktu s B-limfocitima u krvi. Koncentracija DNA ispitana je indirektno kvantifikacijom Alu-sekvenci, repetitivnih retro-elemenata prisutnih u preko 1 milion kopija u ljudskom genomu.¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ Svi bolesnici sa SLE-om – prije terapije, nakon 3 tjedna kortikosteroida te nakon 3 mjeseca klorokina+kortikosteroida - imali su značajno povišenu cirkulirajuću DNA u usporedbi sa zdravim kontrolama ($p = 0,005$, $p = 0,011$ odnosno $p = 0,03$; Mann-Whitney U test). Neliječeni, novo-otkriveni bolesnici imali su višu razinu cirkulirajuće DNA od bolesnika liječenih klorokinom ($p = 0,031$, Friedman ANOVA). Kortikosteroidna terapija bez klorokina također je snizila cirkulirajuću DNA, no razlika nije dosegla statističku značajnost (slika 5a).

Da bi istražili učinak klorokina i kortikosteroida na aktivaciju B-limfocita posredovanu TLR9, PBMC-iSLE bolesnika i zdravih kontrola kultivirani su s CpG-oligonukleotidom prisustvu deksametazona i/ili klorokina. Aktivacija B-limfocita mjerena je porastom izražaja kostimulacijske molekule CD86 protočnom citometrijom nakon 18h (slika 5b). Deksametazon je smanjio, a klorokin u potpunosti inhibirao porast izražaja CD86. U skladu s prijašnjim studijama, SLE-bolesnici imali su viši izražaj CD86 od zdravih kontrola u uvjetima bez stimulacije, što upućuje na bazičnu aktivaciju B-limfocita u SLE-u.^{195,196}



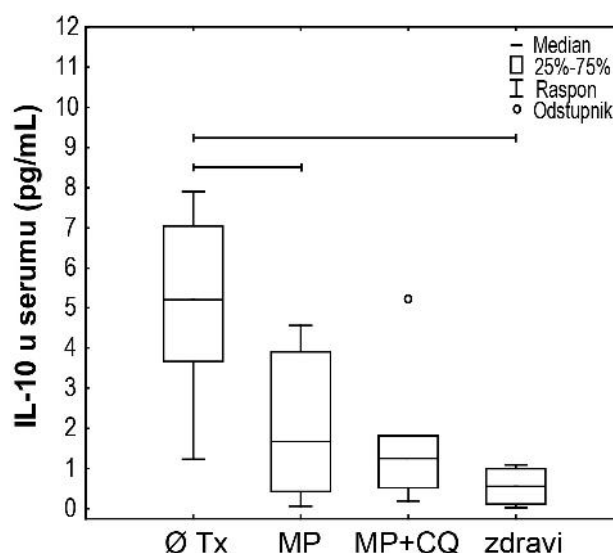
Slika 5. Cirkulirajuća DNA u serumu bolesnika i zdravih kontrola, te aktivacija TLR9-signalnog puta u B-limfocitima sintetskom DNA *in vitro*.

Koncentracija cirkulirajuće DNA u SLE bolesnika (n=9) prije i tijekom terapije te zdravih kontrola (n=11), izmjerena qPCR-om. Ø Tx = bez terapije, MP = metil-prednizolon, CQ = klorokin, zdravi = zdrave kontrole. Horizontalna linija označava statistički značajnu razliku (a). Porast izražaja CD86 na B-limfocitima u kulturi PBMC-a zdravih kontrola (n = 3) i bolesnika s aktivnim SLE-om (n = 4) nakon 18h aktivacije CpG-om, sintetskim oligonukleotidom, sa ili bez kortikosteroida (DEX) i klorokina (CQ) (b).

4.1.3. Terapija smanjuje razinu IL-10 u serumu SLE-bolesnika i produkciju IL-10 u kulturi PBMC-a

Naredno je ispitana razina IL-10 u serumu bolesnika sa SLE-om i zdravih kontrola. ELISA-testom visoke osjetljivosti detektiran je IL-10 u serumu 5 od

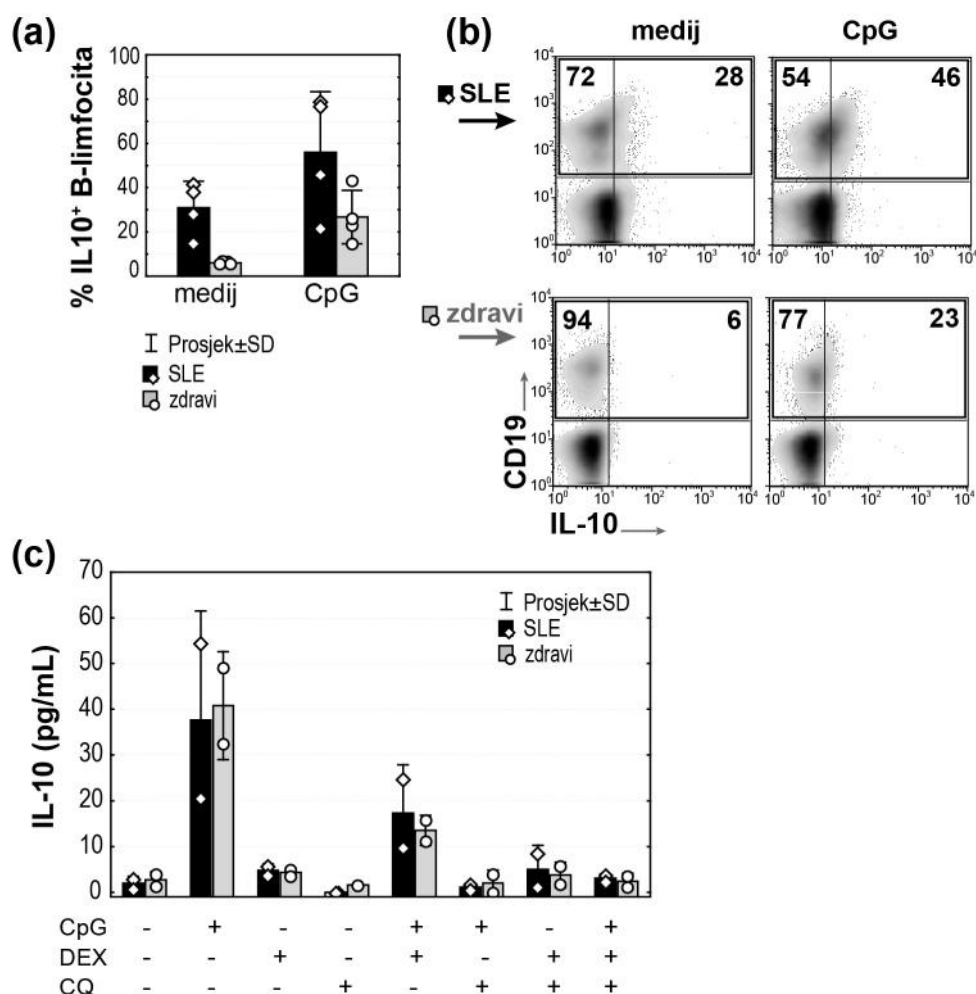
11 bolesnika i 4 od 11 kontrola. Bolesnici bez terapije imali su višu koncentraciju IL-10 u serumu nego zdrave kontrole ($p = 0,01$, Mann-Whitney U test). Koncentracija IL-10 značajno je pala nakon kortikosteroidnog liječenja ($p < 0,05$, Friedman ANOVA) te nakon kombinirane terapije (slika 6).



Slika 6. Koncentracija IL-10 u serumu bolesnika sa SLE-om i zdravih kontrola.

Koncentracija IL-10 u serumu SLE bolesnika ($n = 5$) prije i tijekom terapije te zdravih kontrola ($n=4$), izmjerena ELISA-om. Ø Tx = bez terapije, MP = metil-prednizolon, CQ = klorokin, zdravi = zdrave kontrole. Horizontalne linije označavaju statistički značajnu razliku.

SLE-bolesnici imali su u prosjeku 5 puta viši postotak B-limfocita koji su spontano stvarali IL-10 u kulturi PBMC-a, no razlike nakon aktivacije nije bilo (slika 7a i 7b). Također, nije bilo razlike u ukupnoj količini IL-10 u supernatantu kulture PBMC-a. Analogno izražaju CD86 na B-limfocitima, dexametazon je smanjio a klorokin potpuno inhibirao CpG-om induciranu sekreciju IL-10 (slika 7c).



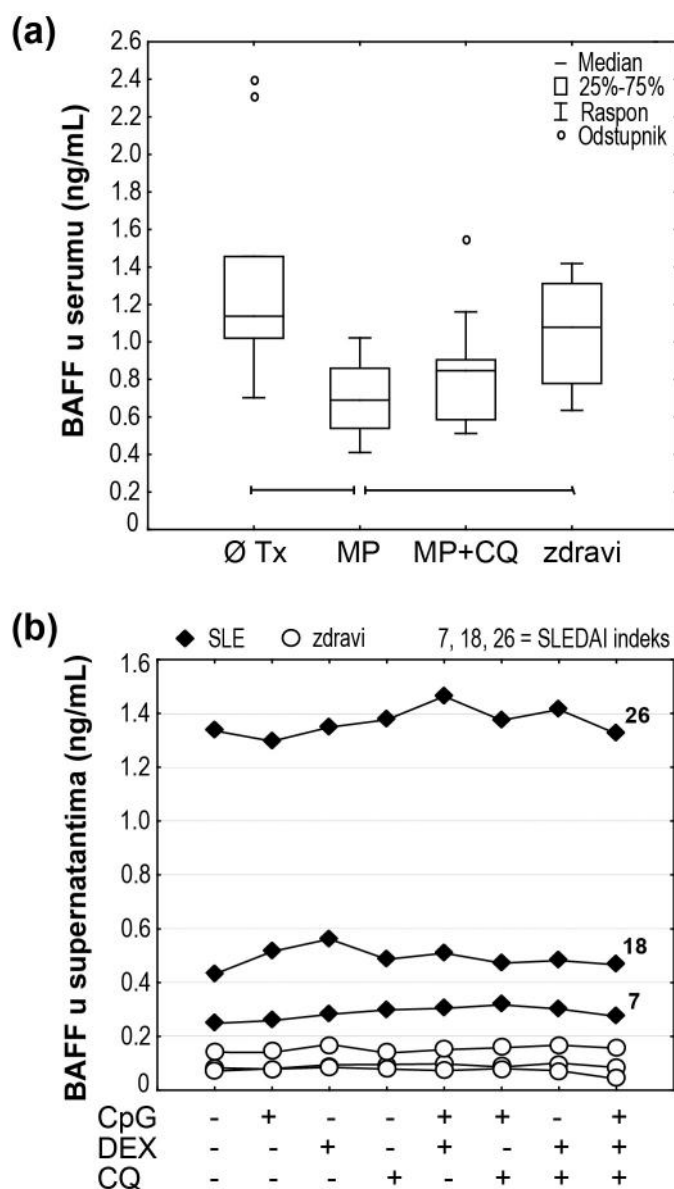
Slika 7. *In vitro* produkcija IL-10 u B limfocitima i supernatantima nakon aktivacije TLR9 signalnog puta sintetskom DNA.

PBMC-i bolesnika s aktivnim SLE (n=4) i zdravih kontrola (n=4) aktivirani su tijekom 18h u mediju ili sa CpG-om, te je protočnom citometrijom izmjerena unutarstanična razina IL-10 (a); reprezentativni prikaz uzorka jednog bolesnika i kontrole pokazan je u (b). Koncentracija IL-10 u supernatantima kulture PBMC-a bolesnika s aktivnim SLE (n = 2) i kontrola (n = 2) nakon 18h aktivacije CpG-om sa ili bez kortikosteroida (DEX) i klorokina (CQ) izmjerena je ELISA-om.

4.1.4. Koncentracija BAFF-au serumu i lučenje BAFF-a u kulturama PBMC-a nisu modulirane klorokinom ni kortikosteroidima, već koreliraju s aktivnosti bolesti

Slijedeće je ispitana koncentracija BAFF-a u serumu SLE-bolesnika i zdravih kontrola. Bolesnici koji suprimali samo kortikosteroidnu terapiju imali su nižu razinu BAFF-a u serumu od bolesnika prije terapije ($p = 0,001$, Friedman

ANOVA) te zdravih kontrola ($p = 0,009$, Mann-Whitney U test; slika 8a). Koncentracija BAFF-a blago je porasla po uvođenju klorokina i snižavanju doze kortikosteroida, no razlika nije bila statistički značajna. Zatim su PBMC-i bolesnika s aktivnim SLE-om aktivirani *in vitro* CpG-om u prisustvu deksametazona i/ili klorokina, te se BAFF kvantificirao u supernatantima kulture. Razina BAFF-a u supernatantima nije se mijenjala ovisno o uvjetima kulture (slika 8b), no razlikovala se među bolesnicima. PBMC-i bolesnika s visokom aktivnošću bolesti (SLEDAI = 26, nefritis CNS lupus) proizvodili su više BAFF-a od onih s nižom aktivnošću (SLEDAI = 18, nefritis; SLEDAI = 7, bez zahvaćenih vitalnih organa). Naknadno smo izmjerili BAFF u serumu i u SLE-bolesnika s težom kliničkom slikom ($n = 4$). Neliječeni bolesnici s aktivnim SLE-om imali su visoku koncentraciju BAFF-a u serumu (median 2,5, interkvartilni raspon 2,2 – 3,3 ng/mL), što je bilo više nego u neliječenih bolesnika s blagim do umjerenim SLE-om ($n = 11$) i zdravih kontrola (nije grafički prikazano).

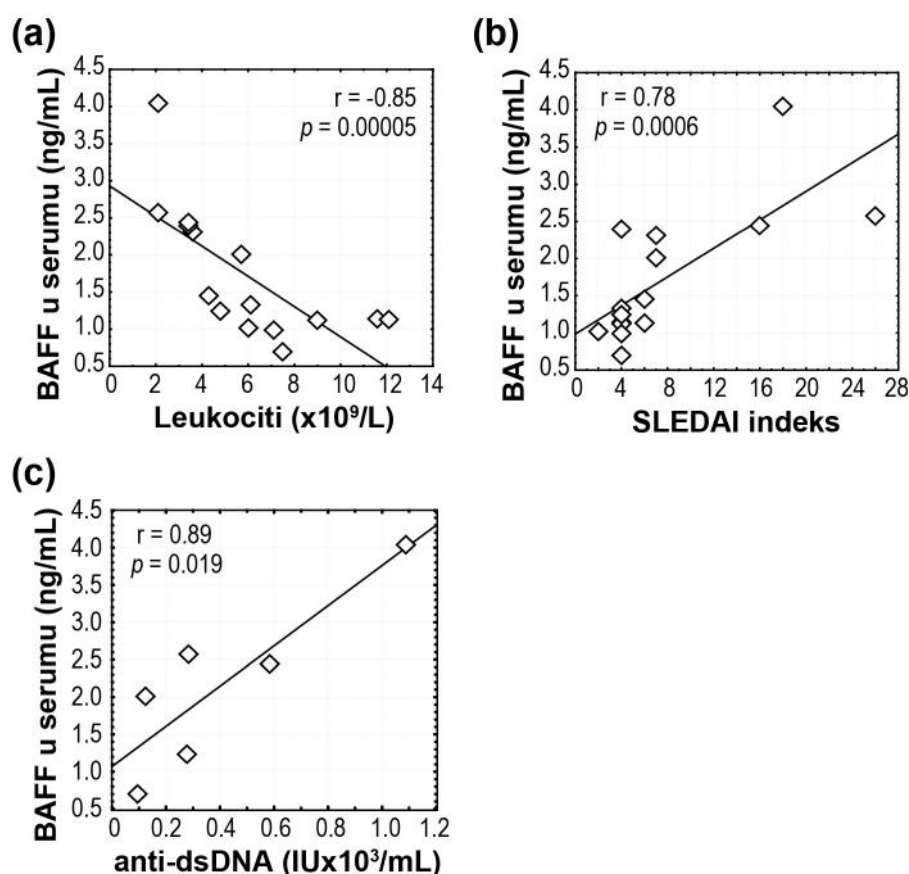


Slika 8. Koncentracija BAFF-a u serumu i u kulturi PBMC-a.

BAFF u serumu SLE-bolesnika ($n = 11$) prije i tijekom terapije te zdravih kontrola ($n=11$), izmjerena ELISA-om. Ø Tx = bez terapije, MP = metil-prednizolon, CQ = klorokin, zdravi = zdrave kontrole. Horizontalne linije označavaju statistički značajnu razliku (a). BAFF u supernatantima kulture PBMC-a bolesnika s aktivnim SLE-om ($n = 3$, zatvoreni rombi) i kontrola ($n = 3$, otvoreni krugovi) nakon 18h aktivacije CpG-om sa ili bez kortikosteroida (DEX) i klorokina (CQ) izmjerena je ELISA-om. Brojevi unutar grafa predstavljaju indeks SLEDAI pojedinog bolesnika (b).

Koncentracija BAFF-a u supernatantima kultura nije korelirala s koncentracijom BAFF-a u serumu bolesnika sa SLE-om. Istovremeno, BAFF u serumu svih neliječenih bolesnika sa SLE-om negativno je korelirao s

brojem leukocita (Spearman $r = -0,85$, $p = 0,00005$; slika 9a) i pozitivno sa indeksom SLEDAI (Spearman $r = 0,78$, $p = 0,0006$; slika 9b). U šest neliječenih bolesnika s prisutnim anti-dsDNA antitijelima (dva bolesnika s blagim i svi bolesnici s aktivnim SLE-om), BAFF u serumu korelirao je s titrom anti-dsDNA antitijela (Spearman $r = 0,89$, $p = 0,019$; slika 9c). Također smo izmjerili izražaj BAFF-receptora (BAFF-R) na B-limfocitima *ex vivo* i nakon kulture, no nismo pronašli značajne razlike (nije grafički prikazano).



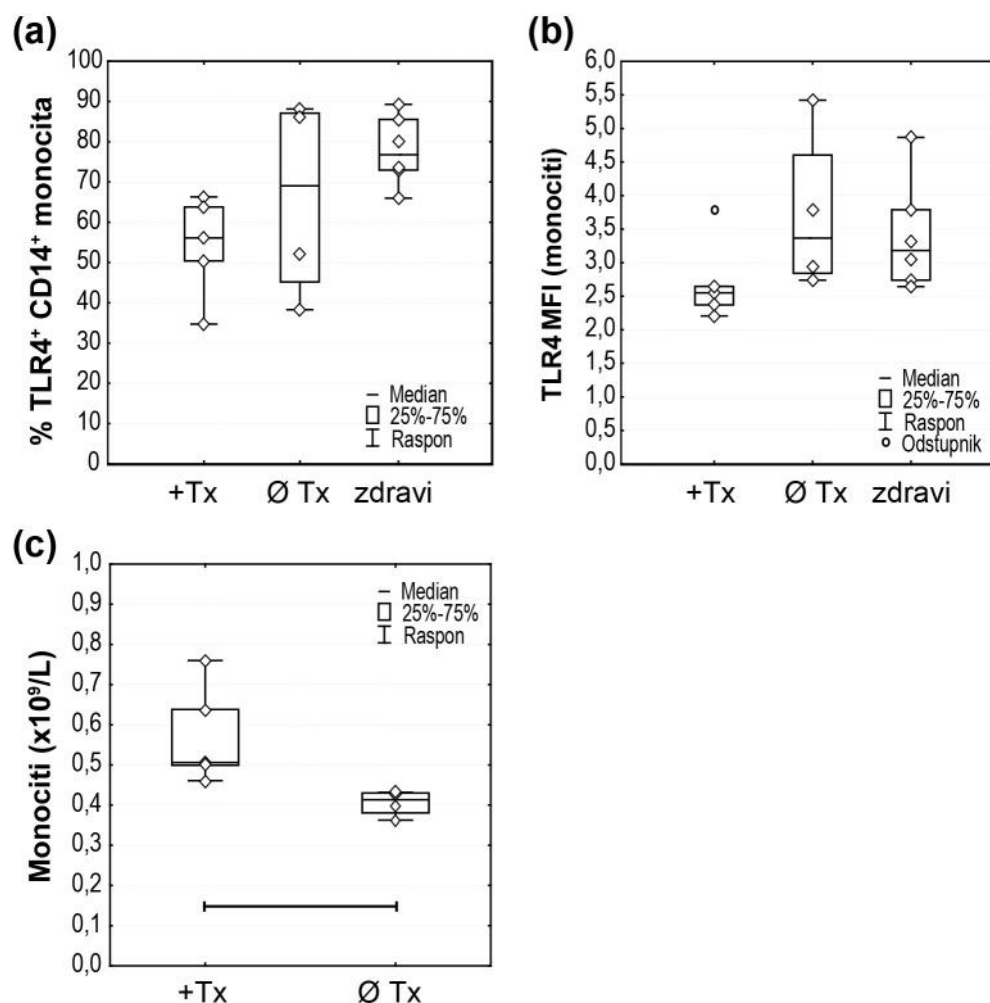
Slika 9. Korelacije između BAFF-a u serumu neliječenih bolesnika sa SLE-om i brojem leukocita, indeksom SLEDAI i anti-dsDNA antitijelima.

Koncentracija BAFF-a u serumima bolesnika s blagim ($n=11$) i aktivnim SLE-om ($n=4$) zajednički su korelirane s brojem leukocita u perifernoj krvi (a) i SLEDAI-indeksom (b). U šest bolesnika s prisutnim anti-dsDNA antitijelima prije liječenja, BAFF u serumu korelirao je s razinom anti-dsDNA antitijela (c).

4.2. Izražaj TLR4 na monocitima i utjecaj klorokina i kortikosteroida na aktivacijumonocita TLR4-ligandom lipopolisaharidom

4.2.1. Izražaj TLR4 na monocitima bolesnika sa SLE-om i zdravih kontrola

Izražaj TLR4 u monocitima periferne krvi mjeren je u skupini bolesnika s blagim SLE-om (9 od 11) nakon prosječno 2 godine od postavljanja dijagnoze. Pet bolesnika bilo je na terapiji kortikosteroidima (metil-prednizolon, 4 ili 8 mg/dnevno) i/ili klorokinom (250 mg/dnevno), dok su ostali bolesnici bili bez terapije ili na nesteroidnim protu-upalnim lijekovima. Prosječni indeks SLEDAI bio je 4, indicirajući nisku aktivnost bolesti ili remisiju. Postotak TLR4⁺ monocita u perifernoj krvi bolesnika na terapiji bio je niži nego u zdravih kontrola (median 56,1% naspram 76,8%), dok razlike između neliječenih bolesnika i zdravih kontrola nije bilo. Statistička analiza između tri skupine ispitanika nije pokazala značajnu razliku ($p = 0,08$, Kruskal-Wallis ANOVA, slika 10a). Paralelno postotku TLR4⁺ monocita, TLR4 MFI na monocitima bolesnika sa SLE-om bio je niži nego u zdravih kontrola, no nije bilo značajne razlike između tri skupine ispitanika ($p = 0,09$, Kruskal-Wallis ANOVA, slika 10b). Broj cirkulirajućih leukocita i monocita u bolesnika nije odstupao od normalnog raspona, no neliječeni bolesnici sa SLE-om imali su značajno niži broj cirkulirajućih monocita nego bolesnici na terapiji ($p = 0,01$, Mann Whitney U test, slika 10c).



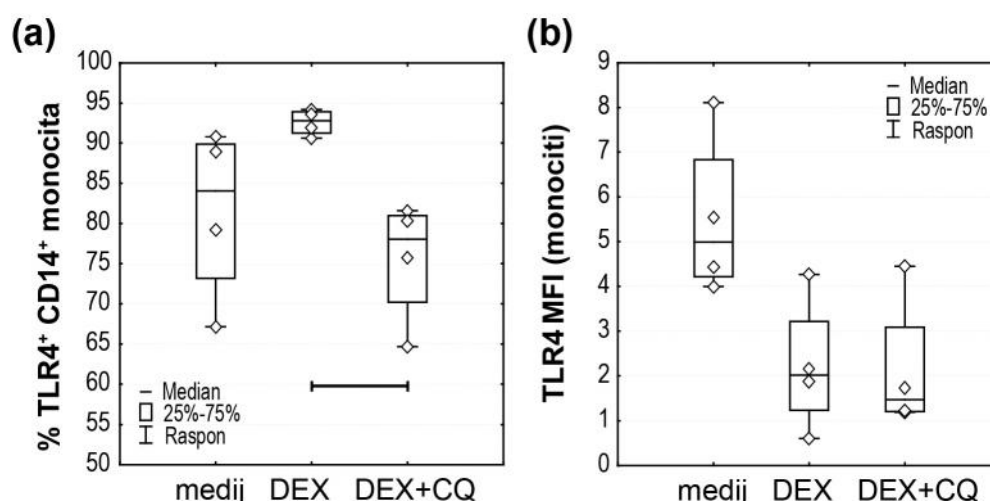
Slika 10. Izražaj TLR4 u monocitima periferne krvi SLE-bolesnika i zdravih kontrola.

Postotak cirkulirajućih TLR4⁺ monocita (a) i TLR4 MFI (od engl. mean fluorescence intensity; srednji intenzitet fluorescencije) (b) u bolesnika sa SLE-om na terapiji kortikosteroidima i klorokinom (+Tx), bez terapije (Ø Tx) te zdravih kontrola (zdravi) izmjeren je protočnom citometrijom. Broj monocita u perifernoj krvi bolesnika prikazan je u (c). Rombi predstavljaju pojedinačne uzorke, a horizontalna linija statistički značajnu razliku.

4.2.2. Utjecaj kortikosteroida i klorokina na izražaj TLR4 na monocitima zdravih kontrola

Da bi se istražilo mogu li lijekovi modulirati izražaj TLR4 na monocitima, PBMC-i zdravih kontrola inkubirani su s deksametazonom i/ili klorokinom tijekom 24 i 48h. Nakon 24h nije bilo razlike u razini izražaja TLR4 na monocitima između različitih uvjeta kulture. Nakon 48h, postotak TLR4⁺

monocita u kulturi s deksametazonom i klorokinom bio je niži nego u kulturi sa samim deksametazonom (median 78% nasuprot 92,8%; $p < 0,05$, Friedman ANOVA), no sličan kulturi u mediju bez dodataka (slika 11a). TLR4 MFI na monocitima nakon 48h kulture s deksametazonom bio je niži nego u mediju bez dodataka, no razlika nije bila statistički značajna (slika 11b). PBMC-i inkubirani s klorokinom imali su usporediv izražaj TLR4 na monocitima kao i u mediju bez dodataka (nije grafički prikazano).

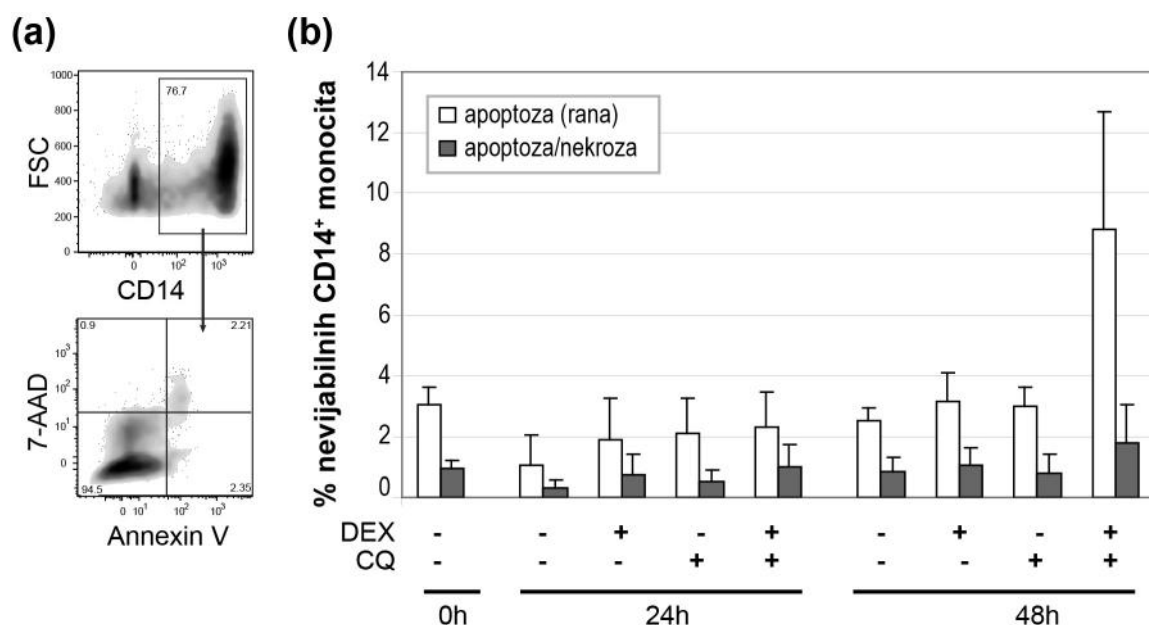


Slika 11. Izražaj TLR4 na monocitima u kulturi s deksametazonom i/ili klorokinom.

Postotak TLR4⁺ monocita (a) i TLR4 MFI (b) na monocitima u kulturi PBMC-azdravih kontrola nakon 48h inkubacije u mediju, s deksametazonom (DEX), ili deksametazonom i klorokinom (DEX+CQ) izmjeren je protočnom citometrijom. Rombi predstavljaju pojedinačne uzorke, a horizontalna linija statistički značajnu razliku.

S obzirom da je učinak deksametazona bio vidljiv tek nakon 48h kulture, provjerili smo da li izloženost kortikosteroidima kompromitira vijabilnost monocita. Deksametazon sam nije negativno utjecao na vijabilnost monocita, što je i očekivano prema prijašnjim studijama koje su pokazale da kortikosteroidi nemaju pro-apoptotski učinak u monocitima u usporedbi s

limfocitima.^{197,198} Klorokin također nije negativno utjecao na vijabilnost monocita. Nasuprot tome, deksametazon i klorokin u kombinaciji nakon 48h kulture doveli su do blagog porasta rane apoptoze detektabilne u $8,8 \pm 3,87$ % monocita (prosjeak $\pm$ SD; slika 12) što upućuje na moguću toksičnost, no nije poznato da li indukcija apoptoze direktno utječe na izražaj TLR4.



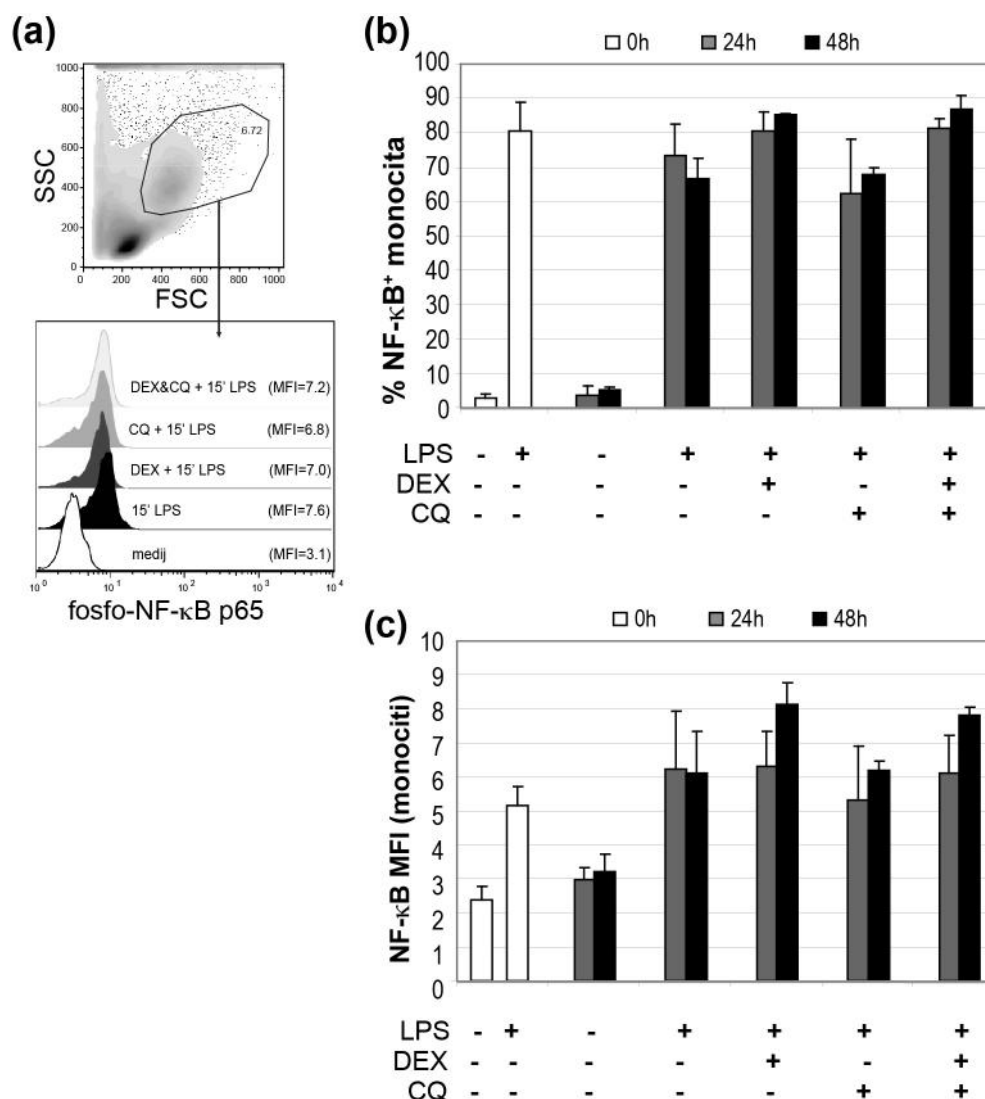
Slika 12. Vijabilnost monocita u kulturi PBMC-a u prisustvu kortikosteroida i/ili klorokina.

Reprezentativni prikaz vijabilnosti monocita zdravih kontrola nakon 24h inkubacije s deksametazonom (DEX) i klorokinom (CQ) nakon obilježavanja aneksinom/7-AAD, izmjeren protočnom citometrijom (a). Postotak ne-vijabilnih monocita u ranoj apoptozi (annexin V⁺) ili apoptozi/nekrozi (annexin V⁺/7-AAD⁺), prije i nakon 24 i 48h inkubacije deksametazonom (DEX) i/ili klorokinom (CQ). Stupići predstavljaju prosječnu vrijednost iz 3 različita pokusa, a okomite linije standardnu devijaciju.

4.2.3. Utjecaj deksametazona i klorokina na aktivaciju TLR4-signalnog puta

Vezanje liganda za TLR4 inducira signalnu kaskadu u čijem je centru transkripcijski faktor NF- κ B. Da bi se ispitalo utječu li kortikosteroidi ili

klorokin na fosforilaciju NF- κ B nakon aktivacije TLR4 u monocitima, PBMC-i zdravih kontrola prvo su inkubirani 24 i 48h u mediju i u prisustvu deksametazona i/ili klorokina, a zatim je dodan LPS, ligand za TLR4, kroz 15'. Kortikosteroidi i klorokin nisu značajno utjecali na LPS-om induciranu fosforilaciju podjedinice p65 NF- κ B (slika 13a), iako je postotak i MFI fosfo-p65⁺ monocita bio nešto niži ako su stanice inkubirane samo s klorokinom (slika 13b i 13c). Stoga u ovim eksperimentalnim uvjetima ni kortikosteroidi ni klorokin nisu modulirali ranu, NF- κ B-om posredovanu TLR4-signalnu kaskadu, što ne isključuje druge potencijalne protu-upalne učinke tih lijekova.^{199,200}

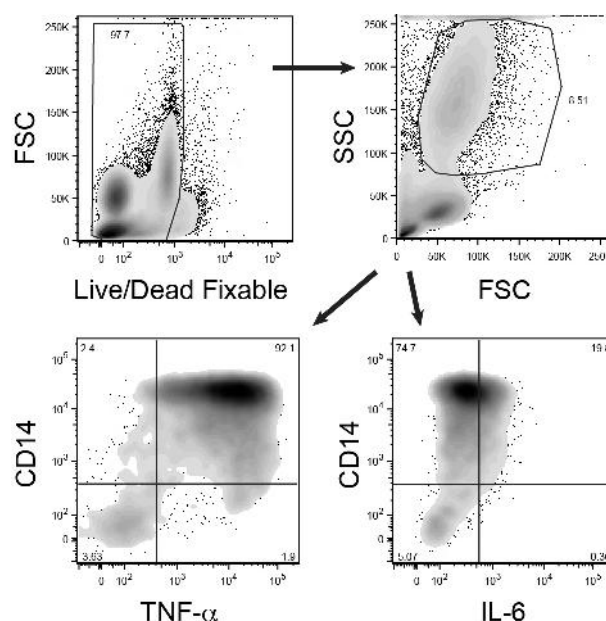


Slika 13. Fosforilacija NF- κ B p65-podjedinice u monocitima nakon aktivacije TLR4-signalnog puta lipopolisaharidom.

Primjer postavljanja ograde (engl. gate) oko monocita i histogramске analize fosforilacije NF- κ B p65 podjedinice nakon 24h pre-inkubacije u mediju i s deksametazonom (DEX) i/ili klorokinom (CQ) izmjerene protočnom citometrijom (a). Postotak fosfo-NF- κ B p65⁺ monocita (b) i fosfo-NF- κ B p65 MFI (engl. median fluorescence intensity, srednji intenzitet fluorescencije) (c) u nestimuliranim i LPS-om stimuliranim PBMC prije i nakon 24 i 48h kulture s deksametazonom (DEX) i/ili klorokinom (CQ) izmjeren protočnom citometrijom u monocitnoj ogradi. NF- κ B p65 monoklonsko antitijelo korišteno u obilježavanju prepoznaje fosforiliranu serin 529 trans-aktivacijsku domenu p65 podjedinice, koja je mjesto interakcije s inhibicijskim I κ B faktorom. Stupići predstavljaju prosječnu vrijednost iz 3 različita pokusa, a okomite linije standardnu devijaciju.

4.2.4. Utjecaj deksametazona i klorokina na produkciju pro-upalnih citokina nakon aktivacije TLR4-signalnog puta

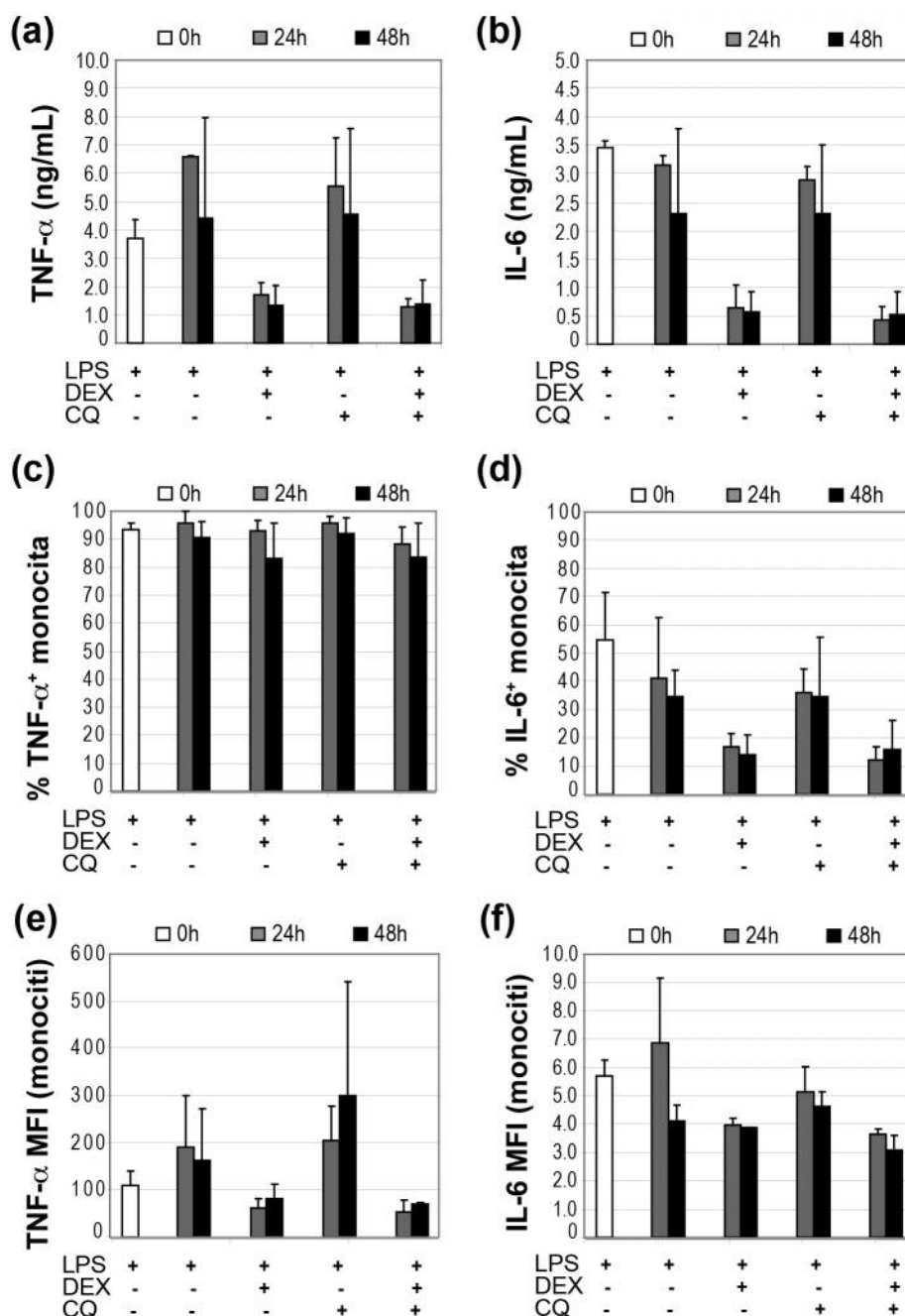
Da bi se ispitaio utjecaj deksametazona i klorokina na sekreciju pro-upalnih citokina posljedično aktivaciji TLR4-signalnog puta i fosforilaciji transkripcijskog faktora NF- κ B, PBMC-i zdravih kontrola opet su prvo inkubirani 24 i 48h u mediju i u prisustvu deksametazona i/ili klorokina prije 6h stimulacije s LPS-om. Nakon kulture prikupljeni su supernatanti za analizu koncentracije IL-6 i TNF- α ELISA-om, a intracelularna razina IL-6 i TNF- α u monocitima analizirana je protočnom citometrijom (reprezentativna analiza prikazana je na slici 14).



Slika 14. Primjer postavljanja ograda oko vijabilnih monocita i analiza izražaja TNF- α i IL-6 u CD14⁺ monocitima protočnom citometrijom.

Live/Dead Fixable je fluorescentna boja koja se veže za aminske skupine proteina, koji su koncentrirani u citoplazmi. Time se indirektno mjeri vijabilnost jer boja ulazi i nakuplja se u stanicama s kompromitiranom membranom, što je indicacija kasne apoptoze odnosno nekroze. Live/Dead Fixable⁺ stanice isključene su iz daljnje analize.

Za razliku od fosforilacije NF- κ B, inhibitorni učinak deksametazona na produkciju oba citokina bio je jasno vidljiv (slika 15), dok klorokin nije utjecao na LPS-om induciranu produkciju TNF- α i IL-6. Uočena je zanimljiva nepodudarnost između utjecaja deksametazona na produkciju TNF- α mjerenu protočnom citometrijom. Razlika nije uočena kad se mjerio postotak TNF- α^+ monocita, no TNF- α MFI bio je niži nakon inkubacije s deksametazonom, što je odgovaralo manjoj koncentraciji TNF- α u supernatantu. S obzirom da MFI odgovara količini antigena po pojedinoj stanici, slijedi da iako skoro svi monociti stvaraju TNF- α nakon stimulacije LPS-om, deksametazon smanjuje količinu stvorenog citokina po pojedinoj stanici.

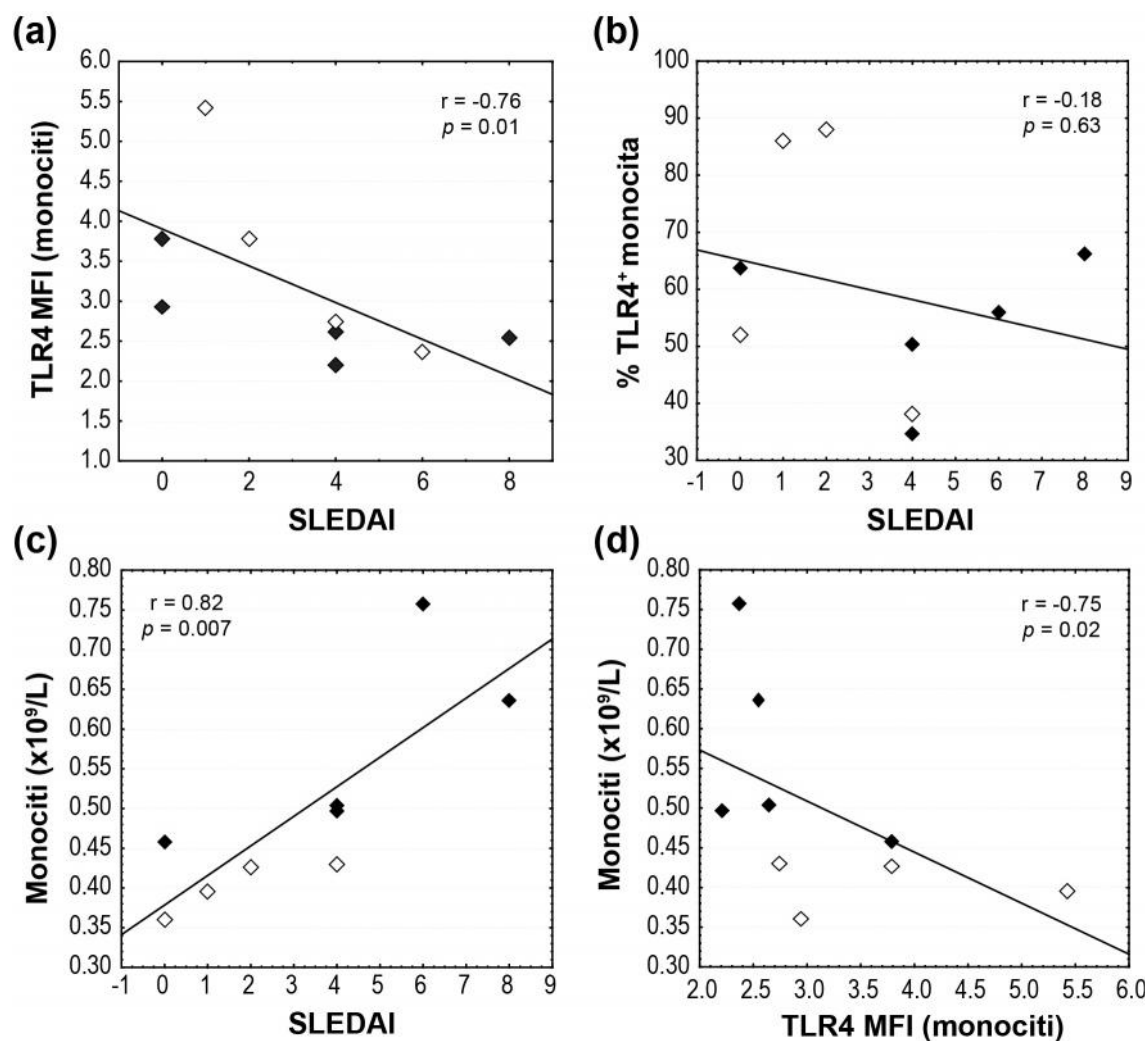


Slika 15. Stvaranje TNF- α i IL-6 nakon aktivacije TLR4 lipopolisaharidom.

Produkcija TNF- α i IL-6 prije i nakon 24 i 48h pre-inkubacije s deksametazonom (DEX) i/ili klorokinom (CQ) inducirana je tijekom 6h stimulacije s LPS-om. Koncentracija TNF- α (a) i IL-6 (b) u supernatantima kultura mjerena je ELISA-om, a unutarstanična produkcija u monocitima mjerena je protočnom citometrijom i izražena kao postotak TNF- α^+ odnosno IL-6 $^+$ CD14 $^+$ monocita (c, d) i TNF- α odnosno IL-6 MFI (e, f). Stupići predstavljaju prosječnu vrijednost 2 (ELISA) ili 3 (FACS) različitih pokusa, a okomite linije standardnu devijaciju.

4.2.5. Korelacija izražaja TLR4 na monocitima i kliničkih parametara bolesnika sa SLE-om

Srednji intenzitet fluorescencije (MFI) TLR4 na monocitima negativno je korelirao s aktivnošću bolesti mjerenom indeksom SLEDAI (Spearman $r = -0,77$, $p = 0,01$; slika 16a), dok postotak TLR4⁺ monocita nije pokazivao korelaciju s tim indeksom (slika 16b). Broj monocita u perifernoj krvi bolesnika pozitivno je korelirao s indeksom SLEDAI (Spearman $r = 0,82$, $p = 0,007$; slika 16c) i negativno s TLR4 MFI na monocitima (Spearman $r = -0,75$, $p = 0,02$; slika 16d). Svi bolesnici bez obzira na terapiju uključeni su u analizu.



Slika 16. Odnos SLEDAI-indeksa, izražaja TLR4 i broja cirkulirajućih monocita u ispitanika sa SLE-om.

Grafovi prikazuju korelaciju indeksa SLEDAI s TLR4 MFI (a), postotkom TLR4⁺ monocita (b) i brojem monocita u perifernoj krvi (c). Korelacija između broja monocita i TLR4 MFI na monocitima prikazana je u (d). Crni rombi označavaju bolesnike na terapiji, a bijeli neliječene bolesnike. Korelacije su izračunate koristeći Spearman test.

4.3. Analiza polimorfizama promotera za TNF- α i IL-10 gene u bolesnika sa SLE-om i zdravih kontrola

Pet od 14 bolesnika sa SLE-om imalo je polimorfizam u TNF- α promoteru na poziciji -308 A/G koji može pridonijeti riziku za SLE u bolesnika bijele rase (u jednog bolesnika nisu ispitani polimorfizmi).²⁰¹ Također je ispitano prisustvo polimorfizama u promotoru za IL-10 na poziciji -1082 G/A. Oba polimorfizma povezana su s poremećajima u sekreciji citokina nakon *in vitro* stimulacije limfocita,²⁰² no nije pronađena korelacija između polimorfizama i kliničkih odnosno laboratorijskih podataka.

Tablica 8. Distribucija polimorfizama u promoterima za IL-10 i TNF- α u bolesnika sa SLE-om

Skupina bolesnika	Šifra bolesnika	TNF -308 SNP	IL10 -1082 SNP
blagi do umjereni SLE	SLE11_01	AG	AG
	SLE11_02	GG	AG
	SLE11_03	GG	AA
	SLE11_04	GG	AG
	SLE11_05	GG	AA
	SLE11_06	GG	AA
	SLE11_07	GG	GG
	SLE11_08	AG	AA
	SLE11_09	AG	AG
	SLE11_10	AG	AG
aktivni SLE	SLE4_01	GG	AA
	SLE4_02	AG	AA
	SLE4_03	GG	AG
	SLE4_04	GG	AA
A = $\uparrow$ TNFα AA = $\downarrow$ IL-10 GG = $\uparrow$ IL-10			

SNP = single nucleotide polymorphism (od engl. polimorfizam jednog nukleotida). $\uparrow$ = SNP povezan s povišenom produkcijom citokina; $\downarrow$ = SNP povezan sa smanjenom produkcijom citokina.

4.4. Klinički podaci bolesnika sa SLE-om

Tablica 9. Detaljan prikaz kliničkih podataka obje skupine bolesnika u svim točkama uzorkovanja

Skupina bolesnika	Blagi SLE (n=11)								Aktivni SLE (n=4)		
Vrijeme uzorkovanja	1		2		3		4		1		
	median	IQR	median	IQR	median	IQR	median	IQR	median	IQR	Referentni interval
SE (mm/h)	25	14	12	7	10	8	15	15,5	59	11	< 21
E (10 ¹² /L)	4,42	0,54	4,72	0,51	4,42	0,38	4,64	0.,75	4,2	0,44	3,8 - 4,9
L (x10 ⁹ /L)	6,1	3,7	10,8	4.,75	7,9	2,1	7,06	4,37	2,75	1,87	4 - 10
Limfociti (%)	28	16,55	33	7	30,7	9,2	27	8,12	25,05	5.9	25 - 35
Monociti (%)	6.3	1,48	5	2,15	6,4	2,4	6,85	2,78	9,5	3,15	4 - 6
Klirens kreatinina (mL/min)	86,4	30,95	89,5	46,5	106	49,4	96,1	31,77	82,35	32,85	88 - 128
Proteinurija mg/24h)	120	108	139	45	137,75	117,63	80	142,5	2880	2350	< 150
SLEDAI	4	1	2	4	2	4	4	2,75	18	9,5	0
CRP (mg/L)	1,62	9,15	0,84	0,99	0,65	1,39	1,90	0,80	17,90	0	< 5
C3 (g/L)	1	0,21	0,99	0,24	0,91	0,31	1,20	0,34	0,55	0,14	0,9 - 1,8
C4 (g/L)	0,22	0.1	0,20	0,05	0,21	0,07	0,27	0,12	0,09	0,04	0,1 - 0,4
RF (IU/mL)	10,5	14,50	12,9	13,2	11,28	7,07	8,30	25,4	0	0	< 14
anti-dsDNA (IU/mL)	186	92	190	0	171	0	0	0	552	290,5	< 100
ANA (da/ne)	da (3/11 bolesnika)		da (3/11 bolesnika)		da (3/11 bolesnika)		da (2/11 bolesnika)		da (4/4 bolesnika)		
ENA-6 (da/ne)	ne		ne		ne		da (1/9 bolesnika, 2 različita antitijela)		da (3/4 bolesnika, s 3, 5 i 5 različitih antitijela		

Blagi SLE(n=11), 4 točke uzorkovanja (1, 2, 3 i 4); Aktivni SLE(n=4), 1 točka uzorkovanja; SE = sedimentacija eritrocita; E = broj eritrocita; L = broj leukocita; CRP = C-reaktivni protein; RF = reumatoidni faktor; ANA = anti-nuklearna antitijela. Numeričke vrijednosti kliničkih podataka izražene su kao medijan i kvartilni raspon (IQR; od engl. interquartile range).

RASPRAVA

5.1. Izražaj TLR9 u B-limfocitima i cirkulirajuće DNA te citokina stimulirajućih za B-limfocite u bolesnika sa SLE-om

U longitudinalnom istraživanju skupine novo-otkrivenih bolesnika sa SLE-om prije početka terapije istraženo je da li klorokin, antimalarik koji blokira signalizaciju putem TLR9, modulira razinu cirkulirajuće DNA, sekreciju citokina koji stimuliraju B-limfocite i izražaj TLR9 u B-lifocitima. *Ex vivo* rezultati su dalje istraženi u *in vitro* kulturama stanica bolesnika s aktivnim SLE-om (također novo-otkrivenih, prije početka terapije), te se rezultati usporedili s onima u zdravih kontrola.

Izražaj TLR9 u B-limfocitima bolesnika s SLE-om nije se promijenio nakon tretmana klorokinom, no bolesnici na kortikosteroidnoj terapiji imali su višu razinu TLR9 od zdravih kontrola. *In vitro*, inkubacija perifernih mononuklearnih stanica (PBMC) s kortikosteroidima tijekom 48h nije promijenila izražaj TLR9 u B-limfocitima. Razlike u *ex vivo* izražaju TLR9 mogu odražavati promijenjeni fenotip cirkulirajućih B-limfocita, jer je TLR9 mjeran u ukupnim CD19⁺ B limfocitima. Prethodne studije pokazale su da CD27⁺memorijski B-limfociti imaju najviši izražaj TLR9,²⁰³ i ujedno su najmanje osjetljivi na imunosupresivne lijekove.²⁰⁴ Nadalje, razina TLR9 nije pokazivala korelaciju s aktivnošću bolesti, titru autoantitijela ni drugim izmjerenim varijablama. Nasuprot tome, drugi istraživači pronašli su povišen

izražaj TLR9 u SLE-u.²⁰⁵⁻²⁰⁷ Razlika u dobivenim rezultatima može proistjecati iz karakteristika bolesnika, jer bolesnici u prijašnjim studijama nisu bili novo-otkriveni, većina ih je bila na kortikosteroidnoj terapiji i s velikim rasponom u aktivnosti bolesti.

Potom je istraženo da li je ligand za TLR9, DNA, prisutna u cirkulaciji SLE-bolesnika. DNA je kvantificirana indirektno, mjereći sekvence Alu Ya5 u serumu bolesnika i zdravih kontrola, koje imaju više od 2500 kopija u ljudskom genomu.²⁰⁸ Bez obzira na tretman, koncentracija cirkulirajuće DNA bila je značajno viša u bolesnika sa SLE-om u usporedbi sa zdravim kontrolama. Iako je razina cirkulirajuće DNA pala već nakon terapije kortikosteroidima, značajan pad dogodio se tek nakon uvođenja klorokina u terapijski protokol. Metoda korištena za izolaciju DNA iz seruma razgrađuje protein, tako da dobiveni rezultati obuhvaćaju slobodnu DNA i DNA u kompleksima s imunoglobulinima ili drugim proteinima.^{74,94,209}

Porijeklo cirkulirajuće DNA nije do kraja razjašnjeno. Jedna teorija je da potječe od apoptotskih stanica čiji ostaci nisu u potpunosti odstranjeni, jer veličina i fragmentiranje cirkulirajuće DNA sličí apoptotskoj DNA. Defekt u odstranjivanju apoptotske DNA često se implicira u patogenezi SLE-a.²¹⁰ Proturječno tome, masivna apoptoza izazvana tijekom terapije zračenjem solidnih tumora rezultira smanjenjem cirkulirajuće DNA.²¹¹ U mišjem modelu *in vivo* inducirane apoptoze, deksametazon inducira apoptozu timocita no istovremeno smanjuje razinu cirkulirajuće DNA.²¹² Alternativno, DNA može biti aktivno oslobađana iz proliferirajućih²¹¹ ili aktiviranih leukocita.²¹³

Autoantitijela mogu potaknuti neutrofile na oslobađanje NET-ova (od engl. neutrophil extracellular traps, neutrofilne izvanstanične zamke), koji se sastoje od neutrofilne DNA, histona i baktericidnih proteina. Neutrofili posljedično umiru staničnom smrti nazvanom netoza. U SLE-u je opisana sklonost neutrofila netozi u usporedbi s neutrofilima zdravih kontrola, te smanjena sposobnost degradacije NET-ova koji je korelirao s težinom bolesti.²¹³⁻²¹⁵ Shodno tome, DNA porijeklom iz neutrofila može biti jedan od izvora cirkulirajuće DNA u SLE-bolesnika. Nadalje, nedavno je pokazano da netoza u neutrofilima ovisi o procesu autofagije²¹⁶, a klorokin se često koristi u *in vitro* studijama autofagije jer blokira autofagijski tok.²¹⁷ Ova zanimljiva asocijacija nije još istražena, no i sami kortikosteroidi dovode do sniženja cirkulirajuće DNA (iako ne statistički značajnoj), što sugerira da opća kontrola sistemske upale pridonosi padu cirkulirajuće DNA.

Naredno je ispitana razina IL-10 u serumu bolesnika i *in vitro*, nakon stimulacije CpG oligonukleotidima. B-limfociti luče IL-10 nakon aktivacije TLR9 sintetskom DNA. IL-10 je uobičajeno smatran protu-upalnim citokinom radi supresivnog učinka na mijeloidne stanice i T-limfocite, no taj citokin djeluje proupalno u prisustvu interferona tipa I, koji uzrokuju karakteristični interferonski genski “potpis” SLE-a.²¹⁸ IL-10 također djeluje stimulatorno na B-limfocite, podržavajući proliferaciju, izotipsko prekapčanje, te sekreciju citokina i imunoglobulina potaknutu stimulacijom TLR9 ili drugog signalnog puta.⁸⁶⁻⁹¹ Koncentracija IL-10 u serumu bila je viša u neliječenih bolesnika s SLE-om nego u kontrola i snizila se nakon liječenja. U prijašnjim je studijama opisano da IL-10 u SLE-u pozitivno korelira s aktivnošću bolesti i razinom

anti-dsDNA antitijela,^{91,219} pa bi smanjenje koncentracije IL-10 u serumu bolesnika moglo reflektirati smanjenu sistemska upalu nakon terapije. Korelacije nisu potvrđene u ispitanoj kohorti SLE bolesnika, čemu možda pridonosi mali broj bolesnika kod kojih je detektiran IL-10 u serumu te niska aktivnost bolesti.

Produkcija IL-10 nakon aktivacije CpG-om *in vitro* nije se razlikovala između B-limfocita bolesnika i kontrola, no B-limfociti bolesnika stvarali su povećanu količinu IL-10 u usporedbi sa zdravim kontrolama bez stimulacije, samo nakon inkubacije u mediju. Taj nalaz nije bio reproduciran u supernatantima kulture PBMC-a, gdje su koncentracije IL-10 bile usporedive između bolesnika i kontrola. Uzrok su tome možda druge stanice unutar PBMC-a koje mogu stvarati IL-10 kao što su monociti, T-limfociti i dendritičke stanice. Dodavanjem kortikosteroida u kulturu PBMC-a reducirala se, a dodavanjem klorokina blokirala sekrecija IL-10.

Aktivacija B-limfocita, mjerena povećanjem izražaja CD86 ko-stimulacijske molekule, također se ispitala nakon stimulacije CpG-om u prisustvu kortikosteroida i klorokina. Sukladno učinku lijekova na sekreciju IL-10, kortikosteroidi su reducirali, a klorokin inhibirao porast izražaja CD86 na površini B-limfocita. Stoga, klorokin može blokirati sekreciju IL-10 kao i aktivaciju B-limfocita nakon aktivacije sintetskom DNA *in vitro*.

CpG-om inducirano povećanje izražaja CD86 na B-limfocitima bilo je usporedivo između bolesnika i kontrola, no klorokin se doimao manje

učinkovit u inhibiciji aktivacije B-limfocita bolesnika sa SLE-om nego u B-limfocita zdravih kontrola. To sugerira da su B-limfociti bolesnika sa SLE-om djelomično rezistentni na klorokin, ili na razinu aktivacije utječe zasad nepoznata tvar u autolognom serumu prisutnom u kulturi. Plazmacitoidne dendritičke stanice aktivirane putem TLR7 ili TLR9 imunokompleksima ili sintetskim ligandima rezistentne su na kortikosteroidima induciranu apoptozu i inhibiciju sekrecije IFN- α .²²⁰ Sukladno tome, aktivacija B-limfocita putem TLR9 ili izlaganje stimulirajućim citokinima kao što su IL-10, BAFF ili IFN- α mogla bi posredovati rezistenciju na učinke klorokina.

Jedan od važnih učinaka IL-10 na B-limfocite je indirektan, putem indukcije sekrecije BAFF-a iz stanica mijeloidne loze.^{221,222} BAFF je esencijalan faktor opstanka perifernih B-limfocita koji može podržati preživljavanje autoreaktivnih B-limfocita. Koncentracija BAFF-a u serumu neliječenih bolesnika s blagim SLE-om bila je usporediva onoj u zdravih kontrola, dok je u bolesnika na kortikosteroidnoj terapiji bila niža nego u zdravih kontrola. Razina BAFF-a u serumu neliječenih bolesnika pozitivno je korelirala sa indeksom SLEDAI i anti-dsDNA antijelima, potvrđujući nalaze iz prijašnjih studija.²²³⁻²²⁵ Biološki mehanizam u podlozi korelacije BAFF-a i anti-dsDNA antitijela nije razjašnjen. Zanimljivo objašnjenje moglo bi biti u direktnom učinku anti-dsDNA antitijela na stanice mijeloidne loze koje stvaraju BAFF, jer je u jednoj studiji pokazano da otpuštanje BAFF-a od stanične membrane može biti potaknuto umreženjem (eng. cross-linking) više Fc γ -receptora, npr. agregiranim humanim imunoglobulinima G.²²⁶

BAFF je spontano otpuštan u kulturi PBMC-a bez promjene nakon stimulacije CpG-om, vjerojatno jer stanice mijeloidne loze koje stvaraju BAFF unutar populacije PBMC-a ili nemaju izražen TLR9 (monociti), ili su prisutne u vrlo niskoj frekvenciji (dendritičke stanice).³⁰ Nadalje, niti su kortikosteroidi niti klorokin utjecali na spontano otpuštanje BAFF-*ain vitro*, no PBMC-i bolesnika sa SLE-om otpuštali su više BAFF-a od zdravih kontrola. Količina BAFF-a u supernatantima kultura rasla je usporedno s indeksom SLEDAI u bolesnika, sugerirajući da otpuštanje BAFF-a ovisi o aktivnosti bolesti. Koncentracija BAFF-a u supernatantima kultura bolesnika sa SLE-om nije korelirala sa serumskim BAFF-om u istih bolesnika. Nadalje, BAFF u serumu negativno je korelirao s brojem leukocita. To indicira da BAFF u perifernoj krvi djelomično potiče iz tkiva, a ne samo iz cirkulirajućih leukocita, što je implicirano i ranije u studiji koja je pronašla višu koncentraciju BAFF-a u sinovijskoj tekućini bolesnika s artritismom nego u njihovom serumu.²²⁵ Sukladno tome, studije koje su uspoređivale koncentraciju BAFF-a u serumu s količinom BAFF mRNA u cirkulirajućim leukocitima pronašle su umjerenu ili nikakvu korelaciju između istih.^{227,228} Također je moguće da mijeloidne stanice bolesnika, koje mogu biti reducirane brojem, imaju povišenu aktivnost transkripcije/smanjenu razinu degradacije BAFF mRNA i povećanu razinu sekrecije proteina BAFF. Važno je napomenuti da ranija istraživanja, za razliku od ovog, nisu pronašla inverznu korelaciju između BAFF-a i broja cirkulirajućih leukocita, no bolesnici u tim studijama nisu bili razdvojeni s obzirom na terapiju, aktivnost bolesti i zahvaćene organske sustave, što može objasniti različite rezultate.^{224,227,229}

5.2. Izražaj TLR4 na monocitima bolesnika sa SLE-om te utjecaj imunomodulatornih lijekova na aktivaciju TLR4 signalnog puta

Bakterijska infekcija je primaran uzrok smrti u do jedne trećine bolesnika sa SLE-om.²³⁰ Razni čimbenici u SLE-u mogu utjecati na rizik za razvoj bakterijske infekcije i neadekvatnu obranu. Aktivirani fenotip leukocita i povišena razina pro-upalnih citokina naizgled povećavaju otpornost organizma na infekciju,²³¹ a imunosupresivna terapija i deficijencija komplementa smanjuju.¹⁵ Lipopolisaharid ili endotoksin najbolje je opisan i izrazito imunogen PAMP porijeklom iz stijenke Gram⁻ bakterija, koji se prepoznaje putem TLR4 na monocitima, makrofazima i nekim dendritičkim stanicama.²³² Signalizacija putem TLR4 izaziva stanje tolerancije na endotoksin, koje se očituje reduciranom do inhibiranom produkcijom proupalnih citokina i gubitkom izražaja kostimulacijskih i antigen-prezentirajućih molekula pri ponovljenoj stimulaciji, i može trajati do 5 dana.²³³ Smatra se da je tolerancija na endotoksin odgovorna za drugu fazu bifazičnog tijeka sepse, koja je u početku obilježena sistemskom upalom (SIRS, od engl. systemic inflammatory response sndrome) praćenom s «citokinskom olujom» i zatajenjem organa.²³⁴ Slijedeća je faza sepse obilježena imunosupresijom (CARS, od engl. compensatory anti-inflammatory response) koja se smatra rezultatom tolerancije na endotoksin, popraćenom visokim rizikom za sekundarnu infekciju i visokom smrtnošću.²³⁵ Stanje tolerancije na endotoksin može se izazvati i endogenim ligandima kao što su HSP-90, DNA-vežući protein katelicidin ili LL37 i TNF- α , koji su prisutni u povećanoj količini u SLE bolesnika, a direktno se vežu za TLR4 ili

stimuliraju TLR4-signalni put. Takva «nespecifična» stimulacija može dovesti do posljedično smanjene otpornosti bolesnika s SLE-om na «prave» patogene.²³⁶⁻²³⁸

S obzirom na potencijalne endogene ligande TLR4 u SLE-u koji mogu teoretski modulirati količinu prisutnog receptora, ispitan je izražaj TLR4 na monocitima u bolesnika sa SLE-om, te utjecaj imunomodulatorne terapije na aktivaciju TLR4 signalnog puta i produkciju proupalnih citokina. Odabrana su dva citokina koja monociti obilato stvaraju nakon stimulacije LPS-om – TNF- α i IL-6 – prvi radi opisanih polimorfizama u SLE-u i mogućnosti indukcije tolerancije na endotoksin, a drugi jer je vrlo često povišen u serumu bolesnika, a nužan je za terminalnu diferencijaciju B-limfocita u plazma stanice.²³⁹

Razina izražaja TLR4 može predstavljati indikator spremnosti organizma za obranu od infekcije Gram⁻ bakterijama. Izražaj Tlr4 u nekoliko sojeva *tlr4* transgeničnih miševa s različitim brojem kopija *tlr4* gena korelirao je s opsegom imunološkog odgovora na stimulaciju LPS-om *in vivo* i *in vitro*,^{240,241} te sa sekrecijom IL-6 iz makrofaga.²⁴¹ Nadalje, u miševa s više kopija *tlr4* gena, reakcija na komenzalne crijevne bakterije, bez egzogene infekcije, dovodi do razvitka bolesti slične SLE-u.²⁴² U ovoj studiji nije pronađena statistički značajna razlika u izražaju TLR4 na monocitima između bolesnika i kontrola, što je sukladno rezultatima prijašnjih studija.^{205,206,243} Izražaj TLR4 bio je nešto niži u bolesnika na terapiji, no zbog malog broja bolesnika u svakoj skupini teško je zaključiti da li je to radi tretmana ili heterogenosti u

populaciji bolesnika. Imunomodulatorna terapija nije vjerojatan razlog nižeg postotka TLR4⁺ monocita, jer inkubacija PBMC-a s kortikosteroidima i/ili klorokinom nije rezultirala u značajnim promjenama u izražaju TLR4 na monocitima. Iznimka je 48-satna inkubacija, no ovdje su lijekovi u kombinaciji počeli iskazivati negativan učinak na vijabilnost stanica, što je moglo utjecati na rezultate. Kultura PBMC-a s kortikosteroidima i/ili klorokinom također nije utjecala na signalizaciju putem NF- κ B transkripcijskog faktora u monocitima nakon stimulacije LPS-om. Stoga se čini da niti kortikosteroidi niti klorokin ne utječu na rani NF- κ B-signalni put posredovan aktivacijom adaptora MyD88.

S obzirom da TLR4-signalni put nakon aktivacije LPS-om uključuje i signalizaciju putem MAP-kinaza (od engl. mitogen-activated protein kinase; mitogenom-aktivirana proteinska kinaza) i MyD88-neovisni put putem adaptora TRIF koji nisu ispitivani u ovom istraživanju, provjereno je da li je jedan od krajnjih rezultata signalizacije – sekrecija proupalnih citokina – modulirana kortikosteroidima ili klorokinom. Pre-inkubacija s kortikosteroidima (sa ili bez klorokina) smanjila je sekreciju TNF- α i IL-6 u supernatantima kulture PBMC-a i produkciju istih u monocitima nakon stimulacije LPS-om. Klorokin sam nije imao mjerljiv učinak na produkciju citokina. To je u suprotnosti s više prijašnjih studija,²⁴⁴⁻²⁴⁹ no koncentracija klorokina korištena u ovom istraživanju prilagođena je koncentraciji u krvi bolesnika liječenih klorokinom²⁵⁰ i dostatna da spriječi signalizaciju putem unutarstaničnih TLR-a.²⁵¹ Koncentracije korištene u ranijim studijama bile su često i do 50 puta više, uključivale pre-inkubaciju,^{244-247,249} ili vrlo različite eksperimentalne uvjete.²⁴⁸ Uobičajena koncentracija klorokina od 100 μ M korištena u ranijim

istraživanjima koja je blokirala produkciju citokina uzrokovala je skoro kompletnu depleciju monocita u kulturi PBMC-a već nakon 24h, izmjerenu protočnom citometrijom kao gotovo potpun gubitak monocitne populacije na “forward scatter” i “side scatter” detektorima te 80%-tnu redukciju u broju CD14⁺ stanica. Stoga je moguće da je klorokinom-inducirana redukcija sekrecije citokina pronađena u ranijim studijama zapravo odraz opće redukcije u kapacitetu stvaranja proteina radi toksičnosti visoke koncentracije klorokina.

Iako nije pronađena razlika u TLR4 MFI (koja odražava količinu TLR4 molekula po pojedinoj stanici) između bolesnika i kontrola, TLR4 MFI negativno je korelirao s aktivnošću bolesti mjerenoj indeksom SLEDAI kad su svi bolesnici uključeni u analizu. TLR4 MFI također je negativno korelirao s brojem cirkulirajućih monocita, a broj cirkulirajućih monocita pozitivno je korelirao sindeksom SLEDAI. To implicira da je broj TLR4 po pojedinom monocitu ovisan o sistemske upali, endogenim ligandima ili drugim, zasad nepoznatim čimbenicima, dok liječenje ima mali do nikakav utjecaj. Nadalje, monociti su uz neutrofile primarne stanice koje migriraju iz cirkulacije u tkiva nakon aktivacije i kemotaktičnih signala, gdje se terminalno diferenciraju u efektorske stanice,²⁵² stoga opažene promjene mogu reflektirati različitu tkivnu distribuciju i/ili diferencijaciju monocita. Makrofagi i dendritičke stanice diferencirane iz monocita *in vitro* imaju povećan odnosno snižen izražaj TLR4 u usporedbi s primarnom populacijom monocita iz koje su proistekli.^{253,254}

Iako je broj monocita u bolesnika sa SLE-om bio u normalnom rasponu, bolesnici su imali veći udio TLR4-negativnih monocita, što bi moglo smanjiti adekvatan imunološki odgovor na infekciju Gram⁻ patogenima. Razlog za viši broj monocita u bolesnika pod terapijom nije jasan, jer kortikosteroidi ne utječu na razvoj monocita u koštanoj srži.^{198,255} Alternativno objašnjenje može biti u drugačijem fenotipu monocita, jer monociti u SLE-u mogu predočavati antigen, a serum bolesnika sa SLE-om može inducirati diferencijaciju monocita u dendritičke stanice.¹²³ Korelacija između aktivnosti bolesti i broja monocita može biti rezultat mobilizacije monocita na periferiju tijekom sistemske upale.

Prisutnost -308A/G TNF- α genotipa u gotovo polovice bolesnika, koji je u pojedinim prijašnjim studijama povezan s povećanom produkcijom TNF- α ,²⁵⁶ nije korelirala s mjerenim podacima. Rezultati multiplih istraživanja veze između polimorfizama TNF- α promotera, sekrecije TNF- α i težine infekcije kontradiktorni su, a koncentracija cirkulirajućeg TNF- α (često povišenog u SLE-u) ne korelira s polimorfizmima.²⁵⁷ Stoga nije mjerena razina citokina u serumu bolesnika. Također, ranije studije ispitivale su povišene razine TNF- α i IL-6 u kontekstu aktivnosti bolesti i patogeneze, dok odnos prema otpornosti na infekciju nije još istražen.²⁵⁸⁻²⁶⁰

Stoga, iako nije pronađena direktna veza između izražaja TLR9, TLR4 i autoimunosti u SLE-bolesnika, pokazano je da klorokin, lijek koji blokira signalizaciju putem unutarstaničnih TLR-a, pridonosi redukciji cirkulirajuće DNA, inhibira aktivaciju B-limfocita sintetskom DNA i sekreciju IL-10, te

ujedno ne utječe na prepoznavanje i imunoreakciju na komponente Gram⁻ bakterija, čime se ne smanjuje sposobnost adekvatne obrane od bakterijske infekcije.

ZAKLJUČCI

Ovo istraživanje imalo je dva aspekta: prvo se ispitao izražaj TLR9 u perifernim B-limfocitima bolesnika sa SLE-om prije i tijekom terapije klorokinom i kortikosteroidima, utjecaj klorokina na aktivaciju B-limfocita TLR9-ligandom *in vitro*, prisutnost potencijalno endogenog TLR9 liganda – cirkulirajuće DNA – u serumu bolesnika, te razina citokina stimulatornih za B-limfocite *ex vivo* i *in vitro*. Bolesnici na terapiji klorokinom imali su značajno nižu razinu cirkulirajuće DNA nego prije terapije i u usporedbi sa zdravim kontrolama, što do sada nije bilo opisano u literaturi. S obzirom da je klorokin istovremeno izrazito uspješno blokirao aktivaciju B-limfocita sintetskom DNA *in vitro*, intrigantna je mogućnost da je uspjeh klorokina u terapiji SLE-a posljedica blokade TLR9-signalnog puta i aktivacije B-limfocita. U vidu nedavnih publikacija o neutrofilima kao potencijalnom izvoru endogene DNA u SLE-u, a neutrofili također izražavaju TLR9,²⁶¹ zanimljivo bi bilo ispitati učinak klorokina na aktivaciju neutrofila i netozu, te da li neutrofilna DNA može aktivirati B-limfocite.

Također nov, do sada neopisan rezultat je spontano otpuštanje BAFF-a u kulturama PBMC-a, koji ovisi o aktivnosti bolesti. S obzirom na nužnost BAFF-a za preživljavanje perifernih i potencijalno autoreaktivnih B-limfocita, u slijedećim će studijama biti važno ispitati da li je povećana produkcija BAFF-a intrinzična stanicama mijeloidne loze (npr. regulirana epigenetskim mehanizmima kao što je mikroRNA), ili ovisi o zasada nepoznatom čimbeniku prisutnom u serumu SLE-bolesnika, što bi moglo dovesti do

razvoja novih, specifičnih lijekova u SLE-u koji bi blokirali hiperaktivaciju B-limfocita.

Drugi aspekt ovog istraživanja fokusirao se na izražaj TLR4 na perifernim monocitima bolesnika sa SLE-om i zdravih kontrola, te modulaciju aktivacije TLR4-signalnog puta klorokinom i kortikosteroidima *in vitro*. Nije pronađena razlika u izražaju TLR4 *ex vivo* na monocitima između bolesnika bez i na terapiji, te između bolesnika i kontrola. *In vitro* pokusi u kulturama PBMC-a zdravih kontrola pokazali su da kortikosteroidi reduciraju produkciju proupalnih citokina TNF- α i IL-6. Ti se rezultati trebaju potvrditi i na kulturama stanica SLE-bolesnika, no može se pretpostaviti da bi kortikosteroidi mogli smanjiti sekreciju citokina tijekom invazije Gram⁻ bakterijama, unatoč tome što je prepoznavanje patogena i rana aktivacija intaktna. Ovaj je zaključak limitiran na TLR4 signalni put, jer nisu ispitani drugi receptori koji mogu prepoznati Gram⁻ bakterije, niti receptori za komponente Gram⁺ bakterija ili virusa. Usprkos ključnoj ulozi LPS-a u infekciji Gram⁻ bakterijama, ti drugi receptori – koji možda nisu osjetljivi na učinak kortikosteroida - mogli bi kompenzirati deficijenciju u produkciji citokina induciranu kortikosteroidima.

Važan nalaz ove studije je potpuna neučinkovitost klorokina u inhibiciji aktivacije signalnog puta NF- κ B i sekrecije citokina, što je u suprotnosti s rezultatima više prijašnjih istraživanja. Koncentracija klorokina korištena u ovom istraživanju odgovara onoj u cirkulaciji bolesnika liječenih klorokinom i dostatna je za potpunu blokadu signalizacije putem unutarstaničnih TLR-a, te pokazuje minimalnu toksičnost tijekom 72h kulture. Prijašnje studije koristile

su klorokin u znatno višim koncentracijama, stoga je moguće da je inhibicija sekrecije proupalnih citokina i aktivacije signalnog puta NF- κ B opisana u tim studijama posljedica toksičnosti visoke koncentracije klorokina.

Nadalje, ovo istraživanje pokazuje da i «blaga» imunomodulatorna terapija niskim dozama kortikosteroida i klorokinom može značajno utjecati na razinu mjerenih imunoloških parametara, što upućuje na važnost uključivanja neliječenih bolesnika u istraživanja bolesti imunološkog sustava; ili ukoliko je to nemoguće, na pažljivu stratifikaciju bolesnika s obzirom na terapiju. Rezultati s klorokinom posebice su ohrabrujući naspram biološke opravdanosti terapije klorokinom u SLE-u, pošto klorokin snižava cirkulirajuću DNA, inhibira aktivaciju B-limfocita putem TLR9 i ujedno ne utječe na sekreciju proupalnih citokina važnih za obranu od bakterijskih infekcija, koje su jedan od vodećih uzroka mortaliteta u SLE-u. Ovo istraživanje ukazuje na nužnost daljnjih i temeljitih studija urođene imunosti u sistemskom eritemskom lupusu.

SAŽETAK

Sistemi eritemski lupus (SLE) je autoimunosna bolest karakterizirana hiperreaktivnim B-limfocitima od kojih neki stvaraju auto-antitijela na nukleinske kiseline i srodne antigene, te povećanim rizikom za infekcije. Animalni modeli SLE-a pokazali su da aktivacija Toll-u sličnog receptora 9 (TLR9) DNA-imunokompleksima stimulira i diferencira autoreaktivne B-limfocite. To se dokida blokadom TLR9 signalnog puta klorokinom, koji se uspješno koristi u liječenju SLE-a. Aktivacija urođene imunosti nakon prepoznavanja bakterijskih komponenata putem TLR4 pak je ključna za adekvatnu obranu od Gram⁻ bakterija, važnog uzroka smrtnosti u SLE-u. Ovdje je istraženo da li liječenje klorokinom i niskim dozama kortikosteroida modulira izražaj TLR9 i TLR4 u B-limfocitima odnosno monocitima SLE-bolesnika, te cirkulirajuću DNA i citokine koji aktiviraju B-limfocite (IL-10 i BAFF) *ex vivo*. *In vitro* je ispitan utjecaj lijekova na aktivaciju B-limfocita sintetskom DNA i produkciju IL-10 i BAFF-a, te na aktivaciju monocita i sekreciju TNF- α i IL-6 stimulacijom TLR4 signalnog puta lipopolisaharidom. Rezultati su pokazali da klorokin inhibira aktivaciju TLR9 u B-limfocitima *in vitro*, te pridonosi sniženju razine cirkulirajuće DNA, potencijalnog TLR9 liganda, *ex vivo*. Klorokin ujedno ne ometa prepoznavanje komponenata Gram⁻ bakterija i sekreciju proupalnih citokina važnih za obranu od infekcije. Razumijevanje aktivacije i signalizacije receptora urođene imunosti važno je za razumijevanje patogeneze SLE-a i razvoj ciljanih terapija.

THESIS TITLE: Toll-like receptors in pathogenesis of systemic lupus erythematosus (2012)**AUTHOR: Alma-Martina Cepika**

THESIS ABSTRACT: Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by hyperreactive B cells that produce autoantibodies against nucleic acids and related structures. In lupus-prone mice, Toll-like receptor 9 (TLR9) stimulation with DNA-containing immune complexes leads to autoreactive B cell survival and differentiation which could be abolished by chloroquine, a TLR9 signaling inhibitor otherwise used in SLE treatment. Also, patients are at increased risk of an infection. Activation of innate immunity via TLR4 is necessary for the resistance to Gram⁻ bacteria, one of the leading causes of mortality in SLE. Here we investigated if chloroquine and low-dose corticosteroid treatment modulate the expression of TLR9 in B cells, TLR4 on monocytes, levels of circulating DNA and B-cell stimulatory cytokines in peripheral blood of SLE patients and controls. *In vitro*, we interrogated if chloroquine or steroids modulate B cell activation by synthetic TLR9 ligand CpG or monocyte activation by TLR4 ligand LPS. Results suggest that chloroquine inhibits TLR9-induced B cell activation *in vitro* and contributes to a decrease in serum DNA level *ex vivo*, without affecting the pro-inflammatory cytokine production vital for the adequate response to bacterial infection. Thus, investigation of activation and signalization mechanisms of the innate immune system receptors in patients contributes to understanding of SLE pathogenesis.

LITERATURA

1. Murphy, K., Travers, P., Walport, M. & Janeway, C. *Janeway's immunobiology*, (Garland Science, New York, 2008).
2. Thomas, R. The balancing act of autoimmunity: central and peripheral tolerance versus infection control. *Int Rev Immunol***29**, 211-233 (2010).
3. Sakaguchi, S. Regulatory T cells: history and perspective. *Methods Mol Biol***707**, 3-17 (2011).
4. Maldonado, R.A. & von Andrian, U.H. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv Immunol***108**, 111-165 (2010).
5. Goodnow, C.C., Sprent, J., Fazekas de St Groth, B. & Vinuesa, C.G. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature***435**, 590-597 (2005).
6. Medzhitov, R. Approaching the asymptote: 20 years later. *Immunity***30**, 766-775 (2009).
7. Janeway, C.A., Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol***54 Pt 1**, 1-13 (1989).
8. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M. & Hoffmann, J.A. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell***86**, 973-983 (1996).
9. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C.A., Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature***388**, 394-397 (1997).

10. Poltorak, A., *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science***282**, 2085-2088 (1998).
11. Kawai, T. & Akira, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity***34**, 637-650 (2011).
12. Liu, L., *et al.* Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science***320**, 379-381 (2008).
13. Manavalan, B., Basith, S. & Choi, S. Similar Structures but Different Roles - An Updated Perspective on TLR Structures. *Front Physiol***2**, 41 (2011).
14. Martinez Valle, F., Balada, E., Ordi-Ros, J. & Vilardell-Tarres, M. DNase 1 and systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity Reviews***7**, 359-363 (2008).
15. Walport, M.J. Complement and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res***4 Suppl 3**, S279-293 (2002).
16. Leadbetter, E.A., *et al.* Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature***416**, 603-607 (2002).
17. Viorritto, I.C., Nikolov, N.P. & Siegel, R.M. Autoimmunity versus tolerance: can dying cells tip the balance? *Clin Immunol***122**, 125-134 (2007).
18. Barton, G.M., Kagan, J.C. & Medzhitov, R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol***7**, 49-56 (2006).

19. Muzio, M., Ni, J., Feng, P. & Dixit, V.M. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science***278**, 1612-1615 (1997).
20. Yamamoto, M., *et al.* Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol***169**, 6668-6672 (2002).
21. Gay, N.J., Gangloff, M. & O'Neill, L.A. What the Myddosome structure tells us about the initiation of innate immunity. *Trends Immunol***32**, 104-109 (2011).
22. Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. & Akira, S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity***11**, 115-122 (1999).
23. Horng, T., Barton, G.M. & Medzhitov, R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol***2**, 835-841 (2001).
24. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol***11**, 373-384 (2010).
25. Oppenheim, J.J., Feldmann, M. & Durum, S.K. *Cytokine reference : a compendium of cytokines and other mediators of host defense*, (Academic Press, San Diego, 2001).
26. Kagan, J.C., *et al.* TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol***9**, 361-368 (2008).
27. Husebye, H., *et al.* The Rab11a GTPase controls Toll-like receptor 4-induced activation of interferon regulatory factor-3 on phagosomes. *Immunity***33**, 583-596 (2010).

-
28. Barbalat, R., Lau, L., Locksley, R.M. & Barton, G.M. Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nat Immunol***10**, 1200-1207 (2009).
 29. Sasai, M., Linehan, M.M. & Iwasaki, A. Bifurcation of Toll-like receptor 9 signaling by adaptor protein 3. *Science***329**, 1530-1534 (2010).
 30. Hornung, V., *et al.* Quantitative Expression of Toll-Like Receptor 1-10 mRNA in Cellular Subsets of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Sensitivity to CpG Oligodeoxynucleotides. *J Immunol***168**, 4531-4537 (2002).
 31. Nishimura, M. & Shinsaku, N. Tissue-specific mRNA expression profiles of human Toll-like receptors and related genes. *Biol Pharm Bull***28**, 886-892 (2005).
 32. Deban, L., Jaillon, S., Garlanda, C., Bottazzi, B. & Mantovani, A. Pentraxins in innate immunity: lessons from PTX3. *Cell Tissue Res***343**, 237-249 (2011).
 33. Thiel, S. & Gadjeva, M. Humoral pattern recognition molecules: mannan-binding lectin and ficolins. *Adv Exp Med Biol***653**, 58-73 (2009).
 34. Huysamen, C. & Brown, G.D. The fungal pattern recognition receptor, Dectin-1, and the associated cluster of C-type lectin-like receptors. *FEMS Microbiol Lett***290**, 121-128 (2009).
 35. Kato, H., Takahasi, K. & Fujita, T. RIG-I-like receptors: cytoplasmic sensors for non-self RNA. *Immunol Rev***243**, 91-98 (2011).
 36. Kim, T., *et al.* Aspartate-glutamate-alanine-histidine box motif (DEAH)/RNA helicase A helicases sense microbial DNA in human

-
- plasmacytoid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A***107**, 15181-15186 (2010).
37. Zhang, Z., *et al.* DDX1, DDX21, and DHX36 helicases form a complex with the adaptor molecule TRIF to sense dsRNA in dendritic cells. *Immunity***34**, 866-878 (2011).
 38. Zhang, Z., *et al.* The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nat Immunol***12**, 959-965 (2011).
 39. Zhang, Z., Yuan, B., Lu, N., Facchinetti, V. & Liu, Y.J. DHX9 pairs with IPS-1 to sense double-stranded RNA in myeloid dendritic cells. *J Immunol***187**, 4501-4508 (2011).
 40. Philpott, D.J. & Girardin, S.E. Nod-like receptors: sentinels at host membranes. *Curr Opin Immunol***22**, 428-434 (2010).
 41. Schroder, K. & Tschopp, J. The inflammasomes. *Cell***140**, 821-832 (2010).
 42. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science***327**, 291-295 (2010).
 43. Robinson, M.J., *et al.* Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. *Journal of Experimental Medicine***206**, 2037-2051 (2009).
 44. Ishii, K.J., *et al.* TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature***451**, 725-729 (2008).
 45. Kumar, H., Koyama, S., Ishii, K.J., Kawai, T. & Akira, S. Cutting edge: cooperation of IPS-1- and TRIF-dependent pathways in poly IC-

- enhanced antibody production and cytotoxic T cell responses. *J Immunol***180**, 683-687 (2008).
46. Longhi, M.P., *et al.* Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4⁺ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. *Journal of Experimental Medicine***206**, 1589-1602 (2009).
47. Kobayashi, K.S., *et al.* Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science***307**, 731-734 (2005).
48. Blander, J.M. & Medzhitov, R. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature***440**, 808-812 (2006).
49. Flach, T.L., *et al.* Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity. *Nat Med***17**, 479-487 (2011).
50. Lambrecht, B.N., Kool, M., Willart, M.A. & Hammad, H. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Curr Opin Immunol***21**, 23-29 (2009).
51. Yarovinsky, F., Kanzler, H., Hieny, S., Coffman, R.L. & Sher, A. Toll-like receptor recognition regulates immunodominance in an antimicrobial CD4⁺ T cell response. *Immunity***25**, 655-664 (2006).
52. Dempsey, P.W., Allison, M.E., Akkaraju, S., Goodnow, C.C. & Fearon, D.T. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science***271**, 348-350 (1996).
53. Jiang, D., *et al.* Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat Med***11**, 1173-1179 (2005).

-
54. Schaefer, L., *et al.* The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest***115**, 2223-2233 (2005).
 55. Johnson, G.B., Brunn, G.J., Kodaira, Y. & Platt, J.L. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J Immunol***168**, 5233-5239 (2002).
 56. van Beijnum, J.R., Buurman, W.A. & Griffioen, A.W. Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis***11**, 91-99 (2008).
 57. Tsung, A., *et al.* The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *Journal of Experimental Medicine***201**, 1135-1143 (2005).
 58. Taylor, K.R., *et al.* Recognition of hyaluronan released in sterile injury involves a unique receptor complex dependent on Toll-like receptor 4, CD44, and MD-2. *J Biol Chem***282**, 18265-18275 (2007).
 59. Rodriguez-Pinto, D. B cells as antigen presenting cells. *Cell Immunol***238**, 67-75 (2005).
 60. Pasare, C. & Medzhitov, R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature***438**, 364-368 (2005).
 61. Ruprecht, C.R. & Lanzavecchia, A. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur. J. Immunol.***36**(2006).

-
62. Wardemann, H., *et al.* Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science***301**, 1374-1377 (2003).
 63. Schiemann, B., *et al.* An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science***293**, 2111-2114 (2001).
 64. Lesley, R., *et al.* Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF. *Immunity***20**, 441-453 (2004).
 65. Mackay, F., *et al.* Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med***190**, 1697-1710 (1999).
 66. Thien, M., *et al.* Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity***20**, 785-798 (2004).
 67. Groom, J., *et al.* Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjogren's syndrome. *The Journal of clinical investigation***109**, 59-68 (2002).
 68. Pers, J.O., *et al.* BAFF overexpression is associated with autoantibody production in autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci***1050**, 34-39 (2005).
 69. Tangye, S.G., Bryant, V.L., Cuss, A.K. & Good, K.L. BAFF, APRIL and human B cell disorders. in *Seminars in Immunology*, Vol. 18 305-317 (Elsevier, 2006).
 70. Brinkmann, V., *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science***303**, 1532-1535 (2004).

-
71. Barbalat, R., Ewald, S.E., Mouchess, M.L. & Barton, G.M. Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annu Rev Immunol***29**, 185-214 (2011).
 72. Viglianti, G.A., *et al.* Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. *Immunity***19**, 837-847 (2003).
 73. Chaturvedi, A., Dorward, D. & Pierce, S.K. The B cell receptor governs the subcellular location of Toll-like receptor 9 leading to hyperresponses to DNA-containing antigens. *Immunity***28**, 799-809 (2008).
 74. Means, T.K., *et al.* Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J Clin Invest***115**, 407-417 (2005).
 75. Scaffidi, P., Misteli, T. & Bianchi, M.E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature***418**, 191-195 (2002).
 76. Wang, H., *et al.* HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science***285**, 248-251 (1999).
 77. Ivanov, S., *et al.* A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA. *Blood***110**, 1970-1970 (2007).
 78. Tian, J., *et al.* Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nature Immunology***8**, 487-496 (2007).
 79. Yanai, H., *et al.* HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. *Nature***462**, 99-103 (2009).

-
80. Ganguly, D., *et al.* Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med***206**, 1983-1994 (2009).
 81. Lande, R., *et al.* Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature***449**, 564-569 (2007).
 82. Krug, A. Nucleic acid recognition receptors in autoimmunity. *Handb Exp Pharmacol*, 129-151 (2008).
 83. Arbuckle, M.R., *et al.* *Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus*, (2003).
 84. Azizah, M.R., Azila, M.N., Zulkifli, M.N. & Norita, T.Y. The prevalence of antinuclear, anti-dsDNA, anti-Sm and anti-RNP antibodies in a group of healthy blood donors. *Asian Pac J Allergy Immunol***14**, 125-128 (1996).
 85. Yurasov, S., *et al.* Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med***201**, 703-711 (2005).
 86. Gantner, F., *et al.* CD40-dependent and -independent activation of human tonsil B cells by CpG oligodeoxynucleotides. *Eur. J. Immunol.***33**, 1576-1585 (2003).
 87. Vollmer, J., *et al.* Oligodeoxynucleotides lacking CpG dinucleotides mediate Toll-like receptor 9 dependent T helper type 2 biased immune stimulation. *Immunology***113**, 212-223 (2004).
 88. Wagner, M., *et al.* IL-12p70-Dependent Th1 Induction by Human B Cells Requires Combined Activation with CD40 Ligand and CpG DNA. *J Immunol***172**, 954-963 (2004).

-
89. Beebe, A.M., Cua, D.J. & de Waal Malefyt, R. The role of interleukin-10 in autoimmune disease: systemic lupus erythematosus (SLE) and multiple sclerosis (MS). *Cytokine Growth Factor Rev***13**, 403-412 (2002).
 90. Chun, H.Y., *et al.* Cytokine IL-6 and IL-10 as biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol***27**, 461-466 (2007).
 91. Houssiau, F.A., *et al.* Serum interleukin 10 titers in systemic lupus erythematosus reflect disease activity. *Lupus***4**, 393-395 (1995).
 92. Chung, E.Y., Liu, J., Zhang, Y. & Ma, X. Differential expression in lupus-associated IL-10 promoter single-nucleotide polymorphisms is mediated by poly (ADP-ribose) polymerase-1. *Genes Immun***8**, 577-589 (2007).
 93. Ronnelid, J., Tejde, A., Mathsson, L., Nilsson-Ekdahl, K. & Nilsson, B. Immune complexes from SLE sera induce IL10 production from normal peripheral blood mononuclear cells by an FcγRII dependent mechanism: implications for a possible vicious cycle maintaining B cell hyperactivity in SLE. *Ann Rheum Dis***62**, 37-42 (2003).
 94. Leadbetter, E.A., *et al.* Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors.[see comment]. *Nature***416**, 603-607 (2002).
 95. Sanz, I. & Lee, F.E. B cells as therapeutic targets in SLE. *Nat Rev Rheumatol***6**, 326-337 (2010).

-
96. Turner-Stokes, T., *et al.* The efficacy of repeated treatment with B-cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: an evaluation. *Rheumatology (Oxford)***50**, 1401-1408 (2011).
 97. Ruiz-Irastorza, G., Ramos-Casals, M., Brito-Zeron, P. & Khamashta, M.A. Clinical efficacy and side effects of antimalarials in systemic lupus erythematosus: a systematic review. *Ann Rheum Dis***69**, 20-28 (2010).
 98. Siso, A., *et al.* Previous antimalarial therapy in patients diagnosed with lupus nephritis: Influence on outcomes and survival. *Lupus***17**, 281-281 (2008).
 99. Lee, S.J., Silverman, E. & Bargman, J.M. The role of antimalarial agents in the treatment of SLE and lupus nephritis. *Nat Rev Nephrol***7**, 718-729 (2011).
 100. Ruddy, S., Harris, E.D., Sledge, C.B. & Kelley, W.N. *Kelley's textbook of rheumatology*, (W.B. Saunders Co., Philadelphia, 2001).
 101. Tan, E.M., *et al.* The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum***25**, 1271-1277 (1982).
 102. O'Neill, S. & Cervera, R. Systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol***24**, 841-855 (2010).
 103. Pons-Estel, G.J., Alarcon, G.S., Scofield, L., Reinlib, L. & Cooper, G.S. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum***39**, 257-268 (2010).
 104. Harley, I.T., Kaufman, K.M., Langefeld, C.D., Harley, J.B. & Kelly, J.A. Genetic susceptibility to SLE: new insights from fine mapping and genome-wide association studies. *Nat Rev Genet***10**, 285-290 (2009).

-
105. Crow, Y.J. & Rehwinkel, J. Aicardi-Goutieres syndrome and related phenotypes: linking nucleic acid metabolism with autoimmunity. *Hum Mol Genet***18**, R130-136 (2009).
 106. Stetson, D.B. Connections between antiviral defense and autoimmunity. *Curr Opin Immunol***21**, 244-250 (2009).
 107. Stetson, D.B., Ko, J.S., Heidmann, T. & Medzhitov, R. Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell***134**, 587-598 (2008).
 108. Gall, A., *et al.* Autoimmunity initiates in nonhematopoietic cells and progresses via lymphocytes in an interferon-dependent autoimmune disease. *Immunity***36**, 120-131 (2012).
 109. Ballestar, E., Esteller, M. & Richardson, B.C. The epigenetic face of systemic lupus erythematosus. *J Immunol***176**, 7143-7147 (2006).
 110. Zandman-Goddard, G., Solomon, M., Rosman, Z., Peeva, E. & Shoenfeld, Y. Environment and lupus-related diseases. *Lupus***21**, 241-250 (2012).
 111. Tsokos, G.C., Magrath, I.T. & Balow, J.E. Epstein-Barr virus induces normal B cell responses but defective suppressor T cell responses in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol***131**, 1797-1801 (1983).
 112. Kang, I., *et al.* Defective control of latent Epstein-Barr virus infection in systemic lupus erythematosus. *J Immunol***172**, 1287-1294 (2004).
 113. Poole, B.D., Scofield, R.H., Harley, J.B. & James, J.A. Epstein-Barr virus and molecular mimicry in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity***39**, 63-70 (2006).

-
114. Smith-Bouvier, D.L., *et al.* A role for sex chromosome complement in the female bias in autoimmune disease. *J Exp Med***205**, 1099-1108 (2008).
 115. Urowitz, M.B., Gladman, D.D., Farewell, V.T., Stewart, J. & McDonald, J. Lupus and pregnancy studies. *Arthritis Rheum***36**, 1392-1397 (1993).
 116. Doria, A., *et al.* Steroid hormones and disease activity during pregnancy in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum***47**, 202-209 (2002).
 117. Chang, D.M., Lan, J.L., Lin, H.Y. & Luo, S.F. Dehydroepiandrosterone treatment of women with mild-to-moderate systemic lupus erythematosus: a multicenter randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum***46**, 2924-2927 (2002).
 118. Gateva, V., *et al.* A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet***41**, 1228-1233 (2009).
 119. Illei, G.G., *et al.* Current state and future directions of autologous hematopoietic stem cell transplantation in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis***70**, 2071-2074 (2011).
 120. Alexander, T., *et al.* Depletion of autoreactive immunologic memory followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system. *Blood***113**, 214-223 (2009).

121. Tsokos, G.C. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med***365**, 2110-2121 (2011).
122. Chavele, K.M. & Ehrenstein, M.R. Regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *FEBS Lett***585**, 3603-3610 (2011).
123. Blanco, P., Palucka, A.K., Gill, M., Pascual, V. & Banchereau, J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science***294**, 1540-1543 (2001).
124. Decker, P., Singh-Jasuja, H., Haager, S., Kotter, I. & Rammensee, H.G. Nucleosome, the main autoantigen in systemic lupus erythematosus, induces direct dendritic cell activation via a MyD88-independent pathway: consequences on inflammation. *J Immunol***174**, 3326-3334 (2005).
125. Liu, Y.J. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol***23**, 275-306 (2005).
126. Crow, M.K. Type I interferon in systemic lupus erythematosus. *Curr Top Microbiol Immunol***316**, 359-386 (2007).
127. Baechler, E.C., *et al.* Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A***100**, 2610-2615 (2003).
128. Bennett, L., *et al.* Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med***197**, 711-723 (2003).
129. Crow, M.K. & Wohlgemuth, J. Microarray analysis of gene expression in lupus. *Arthritis Res Ther***5**, 279-287 (2003).

-
130. Han, G.M., *et al.* Analysis of gene expression profiles in human systemic lupus erythematosus using oligonucleotide microarray. *Genes Immun***4**, 177-186 (2003).
131. Farkas, L., Beiske, K., Lund-Johansen, F., Brandtzaeg, P. & Jahnsen, F.L. Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *Am J Pathol***159**, 237-243 (2001).
132. Feng, X., *et al.* Association of increased interferon-inducible gene expression with disease activity and lupus nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum***54**, 2951-2962 (2006).
133. Lee, H.S. & Bae, S.C. What can we learn from genetic studies of systemic lupus erythematosus? Implications of genetic heterogeneity among populations in SLE. *Lupus***19**, 1452-1459 (2010).
134. Ozaki, K., *et al.* Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J Immunol***173**, 5361-5371 (2004).
135. Taylor, K.E., *et al.* Risk alleles for systemic lupus erythematosus in a large case-control collection and associations with clinical subphenotypes. *PLoS Genet***7**, e1001311 (2011).
136. Merrill, J.T., *et al.* Efficacy and safety of rituximab in moderately-to-severely active systemic lupus erythematosus: the randomized, double-blind, phase II/III systemic lupus erythematosus evaluation of rituximab trial. *Arthritis & Rheumatism***62**, 222-233 (2010).

-
137. Anolik, J.H., *et al.* Delayed memory B cell recovery in peripheral blood and lymphoid tissue in systemic lupus erythematosus after B cell depletion therapy. *Arthritis & Rheumatism***56**, 3044-3056 (2007).
 138. Dorner, T., Giesecke, C. & Lipsky, P.E. Mechanisms of B cell autoimmunity in SLE. *Arthritis Res Ther***13**, 243 (2011).
 139. Lee, J., Kuchen, S., Fischer, R., Chang, S. & Lipsky, P.E. Identification and characterization of a human CD5+ pre-naive B cell population. *J Immunol***182**, 4116-4126 (2009).
 140. Yurasov, S., *et al.* Persistent expression of autoantibodies in SLE patients in remission. *J Exp Med***203**, 2255-2261 (2006).
 141. Odendahl, M., *et al.* Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J Immunol***165**, 5970-5979 (2000).
 142. Medina, F., Segundo, C., Campos-Caro, A., Gonzalez-Garcia, I. & Brieva, J.A. The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood***99**, 2154-2161 (2002).
 143. Odendahl, M., *et al.* Perturbations of peripheral B lymphocyte homeostasis in children with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis***62**, 851-858 (2003).
 144. Grammer, A.C., *et al.* Abnormal germinal center reactions in systemic lupus erythematosus demonstrated by blockade of CD154-CD40 interactions. *The Journal of clinical investigation***112**, 1506-1520 (2003).

-
145. Baumann, I., *et al.* Impaired uptake of apoptotic cells into tingible body macrophages in germinal centers of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism***46**, 191-201 (2002).
 146. Gaip, U.S., *et al.* Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE). *J Autoimmun***28**, 114-121 (2007).
 147. Herrmann, M., *et al.* Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum***41**, 1241-1250 (1998).
 148. Rovere, P., *et al.* Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function. *J Immunol***161**, 4467-4471 (1998).
 149. Hom, G., *et al.* Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX. *N Engl J Med***358**, 900-909 (2008).
 150. Kimberly, R.P. Immune complexes in the rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am***13**, 583-596 (1987).
 151. Li, X., Ptacek, T.S., Brown, E.E. & Edberg, J.C. Fcγ receptors: structure, function and role as genetic risk factors in SLE. *Genes Immun***10**, 380-389 (2009).
 152. Hedberg, A., Mortensen, E.S. & Rekvig, O.P. Chromatin as a target antigen in human and murine lupus nephritis. *Arthritis Res Ther***13**, 214 (2011).
 153. Leijh, P.C., van den Barselaar, M.T., van Zwet, T.L., Daha, M.R. & van Furth, R. Requirement of extracellular complement and immunoglobulin for intracellular killing of micro-organisms by human monocytes. *The Journal of clinical investigation***63**, 772-784 (1979).

-
154. Manson, J.J., *et al.* Relationship between anti-dsDNA, anti-nucleosome and anti-alpha-actinin antibodies and markers of renal disease in patients with lupus nephritis: a prospective longitudinal study. *Arthritis Res Ther***11**, R154 (2009).
 155. Shivakumar, S., Tsokos, G.C. & Datta, S.K. T cell receptor alpha/beta expressing double-negative (CD4-/CD8-) and CD4+ T helper cells in humans augment the production of pathogenic anti-DNA autoantibodies associated with lupus nephritis. *J Immunol***143**, 103-112 (1989).
 156. Brucato, A., Cimaz, R., Caporali, R., Ramoni, V. & Buyon, J. Pregnancy outcomes in patients with autoimmune diseases and anti-Ro/SSA antibodies. *Clin Rev Allergy Immunol***40**, 27-41 (2011).
 157. Kowal, C., *et al.* Human lupus autoantibodies against NMDA receptors mediate cognitive impairment. *Proc Natl Acad Sci U S A***103**, 19854-19859 (2006).
 158. Lee, J.Y., *et al.* Neurotoxic autoantibodies mediate congenital cortical impairment of offspring in maternal lupus. *Nat Med***15**, 91-96 (2009).
 159. Ruiz-Irastorza, G., Crowther, M., Branch, W. & Khamashta, M.A. Antiphospholipid syndrome. *Lancet***376**, 1498-1509 (2010).
 160. Girardi, G., Redecha, P. & Salmon, J.E. Heparin prevents antiphospholipid antibody-induced fetal loss by inhibiting complement activation. *Nat Med***10**, 1222-1226 (2004).
 161. Liu, K., *et al.* Kallikrein genes are associated with lupus and glomerular basement membrane-specific antibody-induced nephritis in

-
- mice and humans. *The Journal of clinical investigation***119**, 911-923 (2009).
162. Manderson, A.P., Botto, M. & Walport, M.J. The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol***22**, 431-456 (2004).
 163. Urowitz, M.B., *et al.* Atherosclerotic vascular events in a multinational inception cohort of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res (Hoboken)***62**, 881-887 (2010).
 164. Valdivielso, P., *et al.* Lupus-associated endothelial dysfunction, disease activity and arteriosclerosis. *Clin Exp Rheumatol***26**, 827-833 (2008).
 165. Mayadas, T.N., Tsokos, G.C. & Tsuboi, N. Mechanisms of immune complex-mediated neutrophil recruitment and tissue injury. *Circulation***120**, 2012-2024 (2009).
 166. Rajagopalan, S., *et al.* Endothelial cell apoptosis in systemic lupus erythematosus: a common pathway for abnormal vascular function and thrombosis propensity. *Blood***103**, 3677-3683 (2004).
 167. Costedoat-Chalumeau, N., Leroux, G., Piette, J.C. & Amoura, Z. Why all systemic lupus erythematosus patients should be given hydroxychloroquine treatment? *Joint Bone Spine***77**, 4-5 (2010).
 168. Yildirim-Toruner, C. & Diamond, B. Current and novel therapeutics in the treatment of systemic lupus erythematosus. *J Allergy Clin Immunol***127**, 303-312; quiz 313-304 (2011).
 169. Chatham, W.W. & Kimberly, R.P. Treatment of lupus with corticosteroids. *Lupus***10**, 140-147 (2001).

-
170. Parker, B.J. & Bruce, I.N. High dose methylprednisolone therapy for the treatment of severe systemic lupus erythematosus. *Lupus***16**, 387-393 (2007).
171. Cervera, R., Khamashta, M.A. & Hughes, G.R. The Euro-lupus project: epidemiology of systemic lupus erythematosus in Europe. *Lupus***18**, 869-874 (2009).
172. Nossent, J., *et al.* Disease activity and damage accrual during the early disease course in a multinational inception cohort of patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus***19**, 949-956 (2010).
173. Gladman, D.D., *et al.* The Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR) Damage Index for Systemic Lupus Erythematosus International Comparison. *J Rheumatol***27**, 373-376 (2000).
174. Lau, C.S. & Mak, A. The socioeconomic burden of SLE. *Nat Rev Rheumatol***5**, 400-404 (2009).
175. Bombardier, C., Gladman, D.D., Urowitz, M.B., Caron, D. & Chang, C.H. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum***35**, 630-640 (1992).
176. Hochberg, M.C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus.[see comment]. *Arthritis Rheum***40**, 1725 (1997).
177. World Medical, A. World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects. *Bull World Health Organ***79**, 373-374 (2001).

-
178. Webster, J.I., Tonelli, L. & Sternberg, E.M. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol***20**, 125-163 (2002).
 179. Agarwal, S.K. & Marshall, G.D., Jr. Glucocorticoid-induced type 1/type 2 cytokine alterations in humans: a model for stress-related immune dysfunction. *J Interferon Cytokine Res***18**, 1059-1068 (1998).
 180. Cepika, A.M., *et al.* Expression of chemokine receptor CX3CR1 in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Pediatr Allergy Immunol***19**, 148-156 (2008).
 181. Meszaros, K., Aberle, S., White, M. & Parent, J.B. Immunoreactivity and bioactivity of lipopolysaccharide-binding protein in normal and heat-inactivated sera. *Infect Immun***63**, 363-365 (1995).
 182. Krutzik, P.O. & Nolan, G.P. Intracellular phospho-protein staining techniques for flow cytometry: monitoring single cell signaling events. *Cytometry A***55**, 61-70 (2003).
 183. McCarthy, D.A. & Macey, M.G. *Cytometric analysis of cell phenotype and function*, (Cambridge University Press, Cambridge, U.K. ; New York, 2001).
 184. Cacev, T., Radosevic, S., Krizanac, S. & Kapitanovic, S. Influence of interleukin-8 and interleukin-10 on sporadic colon cancer development and progression. *Carcinogenesis***29**, 1572-1580 (2008).
 185. Ivancic-Jelecki, J., Brgles, M., Santak, M. & Forcic, D. Isolation of cell-free DNA from plasma by chromatography on short monolithic columns and quantification of non-apoptotic fragments by real-time polymerase chain reaction. *J Chromatogr***1216**, 2717-2724 (2009).

-
186. Umetani, N., Hiramatsu, S. & Hoon, D.S. Higher amount of free circulating DNA in serum than in plasma is not mainly caused by contaminated extraneous DNA during separation. *Ann N Y Acad Sci***1075**, 299-307 (2006).
 187. Walker, J.A., *et al.* Human DNA quantitation using Alu element-based polymerase chain reaction. *Anal Biochem***315**, 122-128 (2003).
 188. Nicklas, J.A. & Buel, E. Development of an Alu-based, real-time PCR method for quantitation of human DNA in forensic samples. *J Forensic Sci***48**, 936-944 (2003).
 189. Batzer, M.A., Alegria-Hartman, M. & Deininger, P.L. A consensus Alu repeat probe for physical mapping. *Genet Anal Tech Appl***11**, 34-38 (1994).
 190. Abu Al-Soud, W. & Radstrom, P. Capacity of nine thermostable DNA polymerases To mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Appl Environ Microbiol***64**, 3748-3753 (1998).
 191. Al-Soud, W.A., Jonsson, L.J. & Radstrom, P. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J Clin Microbiol***38**, 345-350 (2000).
 192. Al-Soud, W.A. & Radstrom, P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol***39**, 485-493 (2001).
 193. Wolffs, P., Grage, H., Hagberg, O. & Radstrom, P. Impact of DNA polymerases and their buffer systems on quantitative real-time PCR. *J Clin Microbiol***42**, 408-411 (2004).

-
194. Urban, C., *et al.* A systematic and quantitative analysis of PCR template contamination. *J Forensic Sci***45**, 1307-1311 (2000).
 195. Bijl, M., Horst, G., Limburg, P.C. & Kallenberg, C.G. Expression of costimulatory molecules on peripheral blood lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis***60**, 523-526 (2001).
 196. Dolff, S., *et al.* Peripheral circulating activated B-cell populations are associated with nephritis and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Scan J Immunol***66**, 584-590 (2007).
 197. Ehrchen, J., *et al.* Glucocorticoids induce differentiation of a specifically activated, anti-inflammatory subtype of human monocytes. *Blood***109**, 1265-1274 (2007).
 198. Trottier, M.D., Newsted, M.M., King, L.E. & Fraker, P.J. Natural glucocorticoids induce expansion of all developmental stages of murine bone marrow granulocytes without inhibiting function. *Proceedings of the National Academy of Sciences***105**, 2028-2033 (2008).
 199. Clark, A.R. Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. *Mol Cell Endocrinol***275**, 79-97 (2007).
 200. Savarino, A., Boelaert, J.R., Cassone, A., Majori, G. & Cauda, R. Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases? *The Lancet Infectious Diseases***3**, 722-727 (2003).
 201. Lee, Y.H., Harley, J.B. & Nath, S.K. Meta-analysis of TNF-alpha promoter -308 A/G polymorphism and SLE susceptibility. *Eur J Hum Genet***14**, 364-371 (2006).

-
202. Lopez, P., Gutierrez, C. & Suarez, A. IL-10 and TNFalpha genotypes in SLE. *J Biomed Biotechnol***2010**, 838390 (2010).
 203. Bernasconi, N.L., Onai, N. & Lanzavecchia, A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood***101**, 4500-4504 (2003).
 204. Odendahl, M., *et al.* Disturbed Peripheral B Lymphocyte Homeostasis in Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol***165**, 5970-5979 (2000).
 205. Papadimitraki, E.D., *et al.* Expansion of toll-like receptor 9-expressing B cells in active systemic lupus erythematosus: implications for the induction and maintenance of the autoimmune process. *Arthritis Rheum***54**, 3601-3611 (2006).
 206. Migita, K., *et al.* Toll-like receptor expression in lupus peripheral blood mononuclear cells. *J Rheumatol***34**, 493-500 (2007).
 207. Nakano, S., *et al.* Role of pathogenic auto-antibody production by Toll-like receptor 9 of B cells in active systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)***47**, 145-149 (2008).
 208. Batzer, M.A. & Deininger, P.L. Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet***3**, 370-379 (2002).
 209. Boule, M.W., *et al.* Toll-like Receptor 9–Dependent and –Independent Dendritic Cell Activation by Chromatin–Immunoglobulin G Complexes. *J Exp Med***199**, 1631-1640 (2004).
 210. Munoz, L.E., *et al.* Autoimmunity and chronic inflammation - two clearance-related steps in the etiopathogenesis of SLE. *Autoimmunity Reviews***10**, 38-42 (2010).

-
211. van der Vaart, M. & Pretorius, P.J. Circulating DNA. Its origin and fluctuation. *Ann N Y Acad Sci***1137**, 18-26 (2008).
212. Jiang, N. & Pisetsky, D.S. The effect of dexamethasone on the generation of plasma DNA from dead and dying cells. *Am J Pathol***164**, 1751-1759 (2004).
213. Garcia-Romo, G.S., *et al.* Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med***3**, 73ra20 (2011).
214. Lande, R., *et al.* Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med***3**, 73ra19 (2011).
215. Hakkim, A., *et al.* Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A***107**, 9813-9818 (2010).
216. Remijssen, Q., *et al.* Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res***21**, 290-304 (2011).
217. Barth, S., Glick, D. & Macleod, K.F. Autophagy: assays and artifacts. *J Pathol***221**, 117-124 (2010).
218. Sharif, M.N., *et al.* IFN-alpha priming results in a gain of proinflammatory function by IL-10: implications for systemic lupus erythematosus pathogenesis. *J Immunol***172**, 6476-6481 (2004).
219. Grondal, G., *et al.* Cytokine production, serum levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol***18**, 565-570 (2000).

-
220. Guiducci, C., *et al.* TLR recognition of self nucleic acids hampers glucocorticoid activity in lupus. *Nature***465**, 937-941 (2010).
221. Ogden, C.A., *et al.* Enhanced Apoptotic Cell Clearance Capacity and B Cell Survival Factor Production by IL-10-Activated Macrophages: Implications for Burkitt's Lymphoma. *J Immunol***174**, 3015-3023 (2005).
222. Nardelli, B., *et al.* Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood***97**, 198-204 (2001).
223. Petri, M., *et al.* Association of plasma B lymphocyte stimulator levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum***58**, 2453-2459 (2008).
224. Becker-Merok, A., Nikolaisen, C. & Nossent, H.C. B-lymphocyte activating factor in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in relation to autoantibody levels, disease measures and time. *Lupus***15**, 570-576 (2006).
225. Cheema, G.S., Roschke, V., Hilbert, D.M. & Stohl, W. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis and rheumatism***44**, 1313-1319 (2001).
226. Li, X., *et al.* Immune opsonins modulate BLyS/BAFF release in a receptor-specific fashion. *J Immunol***181**, 1012-1018 (2008).
227. Eilertsen, G.O., Van Ghelue, M., Strand, H. & Nossent, J.C. Increased levels of BAFF in patients with systemic lupus erythematosus are associated with acute-phase reactants, independent of BAFF genetics: a case-control study. *Rheumatology***50**, 2197-2205 (2011).

-
228. Collins, C., *et al.* B lymphocyte stimulator (BLyS) isoforms in systemic lupus erythematosus: disease activity correlates better with blood leukocyte BLyS mRNA levels than with plasma BLyS protein levels. *Arthritis Res Ther***8**, R6 (2005).
229. Ritterhouse, L.L., *et al.* B lymphocyte stimulator levels in systemic lupus erythematosus: higher circulating levels in African American patients and increased production after influenza vaccination in patients with low baseline levels. *Arthritis and rheumatism***63**, 3931-3941 (2011).
230. Zandman-Goddard, G. & Shoenfeld, Y. Infections and SLE. *Autoimmunity***38**, 473-485 (2005).
231. Anolik, J.H. & Aringer, M. New treatments for SLE: cell-depleting and anti-cytokine therapies. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol***19**, 859-878 (2005).
232. Roger, T., *et al.* Protection from lethal gram-negative bacterial sepsis by targeting Toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A***106**, 2348-2352 (2009).
233. Biswas, S.K. & Lopez-Collazo, E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol***30**, 475-487 (2009).
234. Adib-Conquy, M. & Cavaillon, J.M. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost***101**, 36-47 (2009).
235. Monneret, G., Venet, F., Pachot, A. & Lepape, A. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol Med***14**, 64-78 (2008).

-
236. Kilmartin, B. & Reen, D.J. HSP60 induces self-tolerance to repeated HSP60 stimulation and cross-tolerance to other pro-inflammatory stimuli. *Eur J Immunol***34**, 2041-2051 (2004).
237. Park, S.H., Park-Min, K.H., Chen, J., Hu, X. & Ivashkiv, L.B. Tumor necrosis factor induces GSK3 kinase-mediated cross-tolerance to endotoxin in macrophages. *Nat Immunol***12**, 607-615 (2011).
238. Pinheiro da Silva, F., Gallo, R.L. & Nizet, V. Differing effects of exogenous or endogenous cathelicidin on macrophage toll-like receptor signaling. *Immunol Cell Biol***87**, 496-500 (2009).
239. Tackey, E., Lipsky, P.E. & Illei, G.G. Rationale for interleukin-6 blockade in systemic lupus erythematosus. *Lupus***13**, 339-343 (2004).
240. Bihl, F., *et al.* Overexpression of Toll-like receptor 4 amplifies the host response to lipopolysaccharide and provides a survival advantage in transgenic mice. *J Immunol***170**, 6141-6150 (2003).
241. Kalis, C., *et al.* Toll-like receptor 4 expression levels determine the degree of LPS-susceptibility in mice. *Eur J Immunol***33**, 798-805 (2003).
242. Liu, B., *et al.* TLR4 up-regulation at protein or gene level is pathogenic for lupus-like autoimmune disease. *J Immunol***177**, 6880-6888 (2006).
243. Komatsuda, A., *et al.* Up-regulated expression of Toll-like receptors mRNAs in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol***152**, 482-487 (2008).
244. Hong, Z., *et al.* Chloroquine protects mice from challenge with CpG ODN and LPS by decreasing proinflammatory cytokine release. *International immunopharmacology***4**, 223-234 (2004).

-
245. Jang, C.H., Choi, J.H., Byun, M.S. & Jue, D.M. Chloroquine inhibits production of TNF-alpha, IL-1beta and IL-6 from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes/macrophages by different modes. *Rheumatology (Oxford)***45**, 703-710 (2006).
246. Jeong, J.Y. & Jue, D.M. Chloroquine inhibits processing of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *The Journal of Immunology***158**, 4901-4907 (1997).
247. Karres, I., *et al.* Chloroquine inhibits proinflammatory cytokine release into human whole blood. *Am J Physiol***274**, R1058-1064 (1998).
248. Picot, S., *et al.* Chloroquine-induced inhibition of the production of TNF, but not of IL-6, is affected by disruption of iron metabolism. *Immunology***80**, 127-133 (1993).
249. Weber, S.M. & Levitz, S.M. Chloroquine interferes with lipopolysaccharide-induced TNF-alpha gene expression by a nonlysosomotropic mechanism. *The Journal of Immunology***165**, 1534-1540 (2000).
250. Tett, S.E., Cutler, D.J., Day, R.O. & Brown, K.F. Bioavailability of hydroxychloroquine tablets in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol***27**, 771-779. (1989).
251. Macfarlane, D.E. & Manzel, L. Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *J Immunol***160**, 1122-1131 (1998).
252. Tacke, F. & Randolph, G.J. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology***211**, 609-618 (2006).

-
253. O'Mahony, D.S., Pham, U., Iyer, R., Hawn, T.R. & Liles, W.C. Differential constitutive and cytokine-modulated expression of human Toll-like receptors in primary neutrophils, monocytes, and macrophages. *Int J Med Sci***5**, 1-8 (2008).
254. Visintin, A., *et al.* Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol***166**, 249-255 (2001).
255. Laakko, T. & Fraker, P. Rapid changes in the lymphopoietic and granulopoietic compartments of the marrow caused by stress levels of corticosterone. *Immunology***105**, 111-119 (2002).
256. Hajeer, A.H. & Hutchinson, I.V. Influence of TNFalpha gene polymorphisms on TNFalpha production and disease. *Hum Immunol***62**, 1191-1199 (2001).
257. Elahi, M.M., Asotra, K., Matata, B.M. & Mastana, S.S. Tumour necrosis factor alpha-308 gene locus promoter polymorphism: an analysis of association with health and disease. *Biochim Biophys Acta***1792**, 163-172 (2009).
258. Davas, E.M., *et al.* Serum IL-6, TNFalpha, p55 srTNFalpha, p75srTNFalpha, srIL-2alpha levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol***18**, 17-22 (1999).
259. Grondal, G., *et al.* Cytokine production, serum levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol***18**, 565-570 (2000).
260. Studnicka-Benke, A., Steiner, G., Petera, P. & Smolen, J.S. Tumour necrosis factor alpha and its soluble receptors parallel clinical disease

-
- and autoimmune activity in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol***35**, 1067-1074 (1996).
261. Hayashi, F., Means, T.K. & Luster, A.D. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood***102**, 2660-2669 (2003).

ŽIVOTOPIS

Alma-Martina Cepika rođena je 1978.g. u Zagrebu, gdje završava osnovnu školu, glazbenu školu i V. prirodoslovno-matematičku gimaziju. Pohađa Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu od 1996. do 2002.g. i diplomira s odličnim uspjehom. Pripravnički staž obavlja u Kliničkoj bolnici Dubrava u Zagrebu, stiče licencu za rad, te se zapošljava kao znanstveni novak Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa u Imunološkom zavodu u Zagrebu. Pod mentorstvom dr. Alenke Gagro vrši istraživanja u sklopu projekta "Utjecaj B-limfocita na diferencijaciju T-limfocita (MZOŠ 0021004), a od 2007.g. u sklopu projekta "Modulacija funkcije ljudskih regulacijskih T-limfocita" (MZOŠ 072-108-0229-0337). Istovremeno je polaznik znanstvenog poslijediplomskog studija "Biomedicina i zdravstvo", nakon čega završava stručni studij "Menadžment u zdravstvu" Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom 2009.g. nastavlja rad na projektu dr. Gagro kao znanstveni novak Klinike za dječje bolesti u Zagrebu.

Za vrijeme svog poslijediplomskog usavršavanja Alma-Martina Cepika istraživala je bazičnu imunobiologiju B-limfocita, imunoreakcije na virusnu infekciju u dojenčadi, regulacijske T-limfocite i ulogu receptora urođene imunosti u autoimunskim bolestima, što je i tema njene doktorske disertacije. Autor je i koautor više znanstvenih radova te poglavlja u knjizi. Aktivno je sudjelovala na brojnim znanstvenim skupovima i radionicama u zemlji i inozemstvu. Dobitnica je nagrada za najbolju prezentaciju postera na kongresu European Science Foundation/European Molecular Biology

Organization (ESF/EMBO) i na kongresu Hrvatskog Imunološkog društva, više putnih stipendija, te Rektorove nagrade Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu za najbolji studentski znanstveni rad. Od 2010.g. je na znanstvenom usavršavanju u Baylor Institute for Immunology Research u Dallasu, SAD.

Odabrane publikacije:

1. Boisson B, Laplantine E, Prando C, Giliani S, Israelsson E, Xu Z, Abhyankar A, Israël L, Trevejo-Nunez G, Bogunovic D, Cepika AM, Macduff D, Chrabieh M, Hubeau M, Bajolle F, Debré M, Mazzolari E, Vairo D, Agou F, Virgin HW, Bossuyt X, Rambaud C, Facchetti F, Bonnet D, Quartier P, Fournet JC, Pascual V, Chaussabel D, Notarangelo LD, Puel A, Israël A, Casanova JL, Picard C. *Immunodeficiency, autoinflammation and amylopectinosis in humans with inherited HOIL-1 and LUBAC deficiency*. Nat Immunol 2012; Oct 28. doi: 10.1038/ni.2457.
2. Cepika AM, Soldo Jureša D, Morović Vergles J, Malenica B, Šantak M, Kapitanović S, Mayer M, Anić B, Sentić M, Gagro A. *Decrease in circulating DNA, IL-10 and BAFF levels in newly-diagnosed SLE patients after corticosteroid and chloroquine treatment*. Cell Immunol 2012; 276:196-203.
3. Cepika AM, Bendelja K, Morović Vergles J, Malenica B, Kapitanović S, Gagro A. *Monocyte response to LPS after exposure to corticosteroids and chloroquine with implications for systemic lupus erythematosus*. Scand J Immunol 2010; 72:434-43.
4. Cepika AM, Gagro A, Baće A, Tješić-Drinković D, Kelečić J, Baričić-Voskresensky T, Matić M, Draženović V, Marinić I, Mlinarić-Galinović G, Tješić-Drinković D, Vrtar Z, Rabatić S. *Expression of chemokine receptor CX3CR1 in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis*. Pediatr Allergy Immunol 2008; 19:148-56.
5. Cepika AM, Marinić I, Morović Vergles J, Soldo-Jureša D, Gagro A. *Effect of steroids on the frequency of regulatory T cells and expression of FOXP3 in a patient with systemic lupus erythematosus: a two-year follow-up*. Lupus 2007; 16:374-7.
6. Gagro A, Servis D, Cepika AM, Toellner KM, Grafton G, Taylor DR, Branica S, Gordon J. *Type I cytokine profiles of human naïve and memory B lymphocytes: a potential for memory cells to impact polarization*. Immunology 2006; 118:66-77.