

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

EMINA PUŠKAR

**ŠTUDIJA FUNKCIONALNEGA ANTAGONIZMA
ALOSTERIČNIH MODULATORJEV KEMOKINSKIH
RECEPTORJEV CXCR4 IN CXCR3.**

**FUNCTIONAL ANTAGONISM STUDY OF ALLOSTERIC
MODULATORS OF THE CHEMOKINE RECEPTORS
CXCR4 AND CXCR3.**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Laboratorijski del magistrske naloge sem opravila na Zavodu RS za Transfuzijsko Medicino pod mentorstvom **doc. dr. Urbana Švajgerja, mag. farm.**

ZAHVALA

Iskrena hvala mentorju doc. dr. Urbanu Švajgerju, mag. farm., za vso predano znanje, organizacijo in potrpežljivost tekom nastajanja magistrske naloge. Moja velika zahvala za vso podporo, pomoč, spodbudo in potrpežljivost gre mojim staršem. Zahvalila bi se tudi prijateljem in fantu za spodbudo in lepe trenutke med študijem.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Urbana Švajgerja, mag. farm.

Emina Puškar

Predsednica komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm.

Članica komisije: doc. dr. Tanja Gmeiner, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO SLIK	IV
KAZALO PREGLEDNIC	V
POVZETEK	VI
ABSTRACT	VII
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
UVOD	1
1. Imunski sistem	1
2. Kemokini.....	2
3. CXCR4/CXCL12-kemokinska os	7
3.1 CXCR4 in rak.....	8
3.2 CXCR4 in HIV	8
4. CXCR3/CXCL10-kemokinska os	10
4.1 CXCR3 in kronična vnetna črevesna bolezen	11
5. Kemokinski receptorji kot terapevtska tarča	13
6. Zdravila v razvoju	15
NAČRT ZA DELO	16
MATERIALI IN METODE	17
EKSPERIMENTALNO DELO.....	19
1. Priprava raztopin in določanje topnosti.....	20
2. Izolacija in gojenje primarnih človeških levkocitov	24
3. Določanje fenotipa celic.....	25
4. Test citotoksičnosti.....	26
5. Dokazovanje T-bet	27
6. Določanje IFN- γ	27
7. Test migracije celic »transwell«.....	28
REZULTATI IN RAZPRAVA	31
1. Topnost.....	31
2. Določanje fenotipa celic.....	32
3. Test citotoksičnosti.....	33
4. Dokazovanje T-bet	37
5. Dokazovanje IFN- γ	38
6. Test migracije celic »transwell«.....	40
SKLEP.....	43
VIRI	44

KAZALO SLIK

<i>Slika 1: Tridimenzionalna struktura kemokinskih receptorjev in grški ključ</i>	3
<i>Slika 2: Struktura družin kemokinskih receptorjev</i>	4
<i>Slika 3: Humani kemokini in njihovi receptorji</i>	5
<i>Slika 4: Ključne lastnosti kemokinskega sistema</i>	6
<i>Slika 5: CXCR4 kot koreceptor za virus HIV</i>	10
<i>Slika 6: Celice in receptorji pri KVČB</i>	12
<i>Slika 7: a) Struktura učinkovine pleriksafor (derivat biciklama); b) struktura ciklama</i>	15
<i>Slika 8: Struktura 7-AAD in princip njegovega delovanja</i>	26
<i>Slika 9: Fotografija plošče »transwell«</i>	29
<i>Slika 10: Princip migracijskega testa »transwell«</i>	30
<i>Slika 11: Določanje fenotipa PBMC in limfocitov T tipa CD4⁺</i>	32
<i>Slika 12: Citotoksičnost spojin – kontrolna vzorca</i>	33
<i>Slika 13: Citotoksičnost spojin – spojine, ki smo jih testirali izključno na CXCR3c</i>	34
<i>Slika 14: Citotoksičnost spojin – spojini smo testirali na CXCR3 in na CXCR4</i>	35
<i>Slika 15: Citotoksičnost spojin – spojine smo testirali izključno na CXCR4</i>	37
<i>Slika 16: Rezultati določanja nivoja izražanja transkripcijskega dejavnika T-bet</i>	38
<i>Slika 17: Rezultati določanja IFN-γ in drugih citokinov (interlevkina 2 (IL-2), IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A in tumorje nekrotizirajočega dejavnika α (TNF α))</i>	39
<i>Slika 18: Rezultati migracijskega testa v kontekstu receptorja CXCR3</i>	41
<i>Slika 19: Rezultati migracijskega testa v kontekstu receptorja CXCR4</i>	42

KAZALO PREGLEDNIC

Tabela I:Spojine za testiranja na CXCR3 – antagonistI.....	21
Tabela II :Spojine za testiranja na CXCR4 – antagonisti.....	22
Tabela III: Koncentracije osnovnih alikvotov spojin pri katerih so spojine še topne pri sobni temperaturi tako v DMSO kot tudi po dodatku 1% v/v alikvota v celični medij...	30

POVZETEK

Imunski sistem omogoča stabilno notranje okolje in preživetje kljub nenehni izpostavljenosti različnim patogenim mikrobov. Pomemben del imunskega sistema so tudi majhni funkcionalni proteini, imenovani kemokini, pa tudi njihovi pripadajoči receptorji. Kemokinski sistem nadzoruje migracijo in pozicioniranje imunskih celic, pomembnih pri homeostatski cirkulaciji levkocitov, akutnem vnetju, celični/humoralni imunosti, pa tudi sekundarnih odzivih. V magistrskem delu smo se osredotočili na kemokinska receptorja CXCR3 in CXCR4 ter njuno modulacijo z izbranimi manjšimi molekulami v kontekstu njihovih naravnih ligandov, CXCL10 oziroma CXCL12. Oba receptorja sta aktivno udeležena v vrsti hudih kroničnih bolezni, kot so multipla skleroza, luskavica, rak, revmatoidni artritis, AIDS in kronična vnetna črevesna bolezen.

V magistrskem delu smo biološko ovrednotili spojine pri primarnih človeških levkocitih, ki so jih pred tem v sodelovanju s Katedro za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo sintetizirali in ocenili njihovo funkcionalno delovanje. Spojinam, ki so kazale delovanje na kemokinske receptorje, smo najprej določili topnost in citotoksičnost. Nato smo ovrednotili njihovo sposobnost inhibicije migracije celic s testom »transwell«. Antagonistično aktivnost smo določali na izoliranih CD4⁺ celicah T pri kemokinskem receptorju CXCR4 in na perifernih mononuklearnih celicah (PBMC) pri receptorju CXCR3.

V primeru CXCR3 je najmočnejše delovanje izkazovala spojina **35**, pri receptorju CXCR4 pa spojina **32**. Spojini **35** in **39** kažeta dvojno alosterično modulacijo z inhibicijo aktivnosti obeh receptorjev, CXCR3 in CXCR4. Vse spojine so dobro izhodišče za nadaljnje raziskave kemokinskih receptorjev. Zlasti sta zanimivi spojini **35** in **39**, ki sta tudi dobro izhodišče za raziskave potencialnih novih dvojnih modulatorjev.

Ključne besede: antagonisti, kemokinski receptorji, test migracije »transwell«, dvojni modulatorji

ABSTRACT

The immune system enables stable internal environment and survival despite constant exposure to various pathogenic microbes. A very important part of the immune system are also small functional proteins called chemokines, as well as their respective receptors.

Chemokine system orchestrating migration and positioning of the immune cells.

Chemokines are important for homeostatic circulating leukocytes in acute inflammation, the cellular / humoral immunity as well as the secondary responses. In this master's thesis, we focused on the chemokine receptor CXCR3 and CXCR4, and their modulation of the selected small molecules in the context of their natural ligands, CXCL10, or CXCL12.

Both receptors are actively involved in a number of severe chronic diseases such as multiple sclerosis, psoriasis, cancer, rheumatoid arthritis, AIDS, and inflammatory bowel disease.

In this master's thesis we was evaluate the bioavailability of the compound in the primary human leukocytes which are previously synthesized and evaluated their functional performance in collaboration with the Department of Pharmaceutical Chemistry at the Faculty of Pharmacy. Selected compounds, which have shown the operation of the chemokine receptors, we first determine the solubility and cytotoxicity. The next step was to evaluate their ability to inhibit the migration of cells by using the "transwell" migration test. Antagonistic activity was determined in isolated CD4⁺ T cells in the case of chemokine receptor CXCR4 and peripheral mononuclear cells (PBMCs) in the case of the receptor CXCR3.

After performing the measurements, the strongest agonistic activity of all compounds showed compound **39** in the case of both receptors. Compounds **35** and **39** show a double-allosteric modulation of the inhibition of both receptors, CXCR3 and CXCR4. In any case, all compounds represent a good starting point for further research of chemokine receptors. Compounds **35** and **39** are particularly interesting and are a good starting point for research of potential new dual modulators.

Key words: antagonists, chemokine receptors, »transwell« migration test , double modulators

SEZNAM OKRAJŠAV

AIDS - aktivirani imunski deficitarni sindrom (angl.: Acquired Immune Deficiency Syndrome)

BRET metoda - angl. Bioluminescence Resonance Energy Transfer

Buffy coat - zgoščena levkocitna plast

cAMP - ciklični adenzin monofosfat

CD4⁺ - zrela celica T pomagalka, ki izraža CD4 glikoprotein

CD8⁺ - zrela celica T pomagalka, ki izraža CD8 glikoprotein

CXCR3 - CXC kemokinski receptor 3

CXCR4 - CXC kemokinski receptor 4

DMSO - dimetil sulfoksid

DPBS - raztopina fosfatnega pufru (angl.: Dulbescco's Phosphate-Buffered Saline)

FBS – goveji fetalni serum (angl. fetal bovine serum)

FITC – fluorescein izotiocianat

FOXD3 – transkripcijski faktor FOXD3 (angl. forkhead box transcription factor D3)

HIF-1 - hipoksijo-inducirajoči faktor 1

HIV - virus humane imunske pomanjkljivosti (angl. human immunodeficiency virus)

IFN - interferon

IL – interlevkin

KVČB - kronična vnetna črevesna bolezen

NK - celica naravna ubijalka (angl: natural killer cell)

PAX3 – transkripcijski faktor PAX3 (angl. paired box transcription factor 3)

PBMC - mononuklearne celice periferne krvi (angl peripheral blood mononuclear cells)

PE – fikoeritrin

SDF-1 – angl. stromal-derived factor 1

siRNA - mala interferirajoča RNA (angl: small interfering RNA)

Th - celica T pomagalka (angl: helper T cell)

TLR - Toll-u podobni receptor (angl: Toll –like receptor)

TNF - dejavnik tumorske nekroze (angl.:tumor necrosis factor)

USP14 - ubikvintinsko specifična proteaza 14

7-AAD - 7-amino-aktino-micin

UVOD

1. Imunski sistem

Med evolucijo so vretenčarji razvili kompleksen obrambni mehanizem, ki ščiti pred patogeni in omogoča vzdrževanje homeostaze organizma. Ta mehanizem imenujemo imunski sistem ter omogoča stabilno notranje okolje in preživetje kljub stalni izpostavljenosti različnim patogenim mikrobov (bakterije, virusi, glivice in praživali). Imunski sistem je skupek različnih mehanizmov in akterjev (imunskih celic), ki ščitijo organizem pred okužbami s patogeni in njihovimi toksini, ki lahko prodrejo v telo skozi telesne odprtine in ob namnožitvi v njem povzročijo različne bolezni. Imunski sistem delimo na prirojeno in pridobljeno vejo imunskega odgovora, ki dejansko nista ločena, ampak prepletena s številnimi mediatorji in mehanizmi (1, 2, 3).

Osnovna obramba organizma so anatomske ovire. To sta predvsem koža in sluznični epitelij, ki mejita na zunanje okolje in sta tudi prva faza prirojenega imunskega sistema. Koža že mehansko prepreči vdor patogenov v organizem, pri čemer ji dodatno pomagajo kemične in biološke snovi v sluznicah (encimi, komenzalne bakterije, kisli pH želodca, RNaze, DNaze, mlečna kislina, ki se izloča na koži, defenzini itd). Če patogeni obidejo anatomske ovire in prodrejo v telo, se odzove celična komponenta in sproži prirojeni imunski odziv, čemur sledi akutno vnetje. Gre za nespecifičen, zaščitni mehanizem organizma, katerega cilj je omejiti ter odstraniti škodljive dejavnike in komponente poškodovanih celic. Ključno vlogo v tej fazi imajo tkivni bazofilci, makrofagi, nevtrofilci, celice naravne ubijalke (NK) in fagociti. Aktivirajo se še proteini komplemента in kaskada kinin-kalikrein. Celice se zbirajo na mestu vnetja in izločajo različne mediatorje, kot so eikozanoidi, citokini, kemokini, histamin in neuropeptidi. Ti aktivirajo levkocite, ki se začnejo aktivno gibati v smeri večje koncentracije kemotaktičnih dejavnikov (kemotaksa). Kot se vidi iz napisanega, se prirojen imunski sistem hitro odzove, vendar je v najboljšem primeru selektiven do skupnih molekulskih vzorcev patogenov in nima sposobnosti antigenskega prepoznavanja. Lahko se zgodi, da ob neravnovesju (čezmernem delovanju) napade tudi lastne celice (3, 4, 5, 6).

Druga linija obrambe je pridobljeni imunski sistem. Lahko bi rekli, da je nadgradnja prirojene imunosti, saj se je razvil šele pri vretenčarjih. Dve glavni komponenti

pridobljenega imunskega sistema sta humoralna in celična imunost. Poglavitne celice pri tej vrsti obrambe so limfociti tipa T in B. Pridobljena imunost se začne s prestavitvijo antigena na antigene predstavljajočih celicah (glavno vlogo imajo dendritične celice) naivnim limfocitom T. Po prepoznavi antigena in stimulaciji se limfociti T, tipa CD4⁺ ali CD8⁺ razvijejo v celice pomagalke ali ubijalke, v tem zaporedju. To, ali se bodo naivni limfociti T tipa CD4⁺ polarizirali v smer Th1 oziroma Th2 (podvrsti celic T-pomagalk), je odvisno od citokinov v mikrookolju, ki spremlja antigensko predstavitev. IL-2 (interlevkin 2) in IFN- γ (interferon gama) in zlasti IL-12 spodbujajo razvoj Th1, za nastanek Th2 pa je potreben IL-4. T-bet je transkripcijski dejavnik, specifičen za celice Th1, ki uravnava značilne Th1-citokine, npr. IFN- γ . Ekspresija T-bet korelira z ekspresijo IFN- γ pri celicah Th1 in NK. Ektopična ekspresija T-bet transaktivira gen za IFN- γ in tudi inducira endogeno proizvodnjo IFN- γ (7, 8).

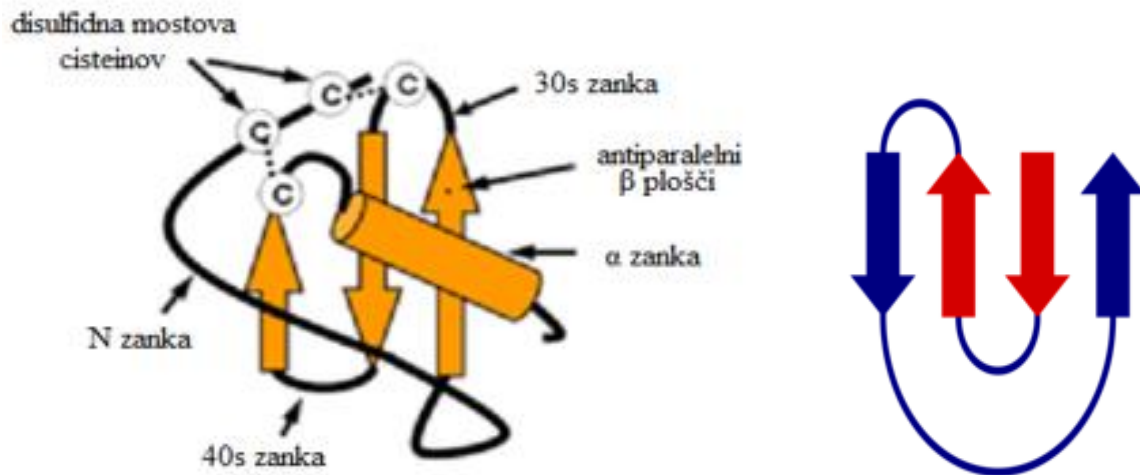
Že po prvem stiku z antigenom se tvorijo spominski limfociti T in B. Spominske celice lahko preživijo več let v limfatičnih organih in stimulirajo proizvodnjo limfocitov z enakimi imunskimi receptorji. To ob morebitnem kasnejšem vdoru istega patogena omogoči bistveno hitrejši in učinkovitejši odziv. Pridobljeni imunski sistem je torej bolj specifičen. Celice Th1 aktivirajo in sodelujejo pri celični imunosti, celice Th2 pa aktivirajo humoralno, s protitelesi povezano imunost, tako da spodbudijo proliferacijo limfocitov B, ki dozori v plazmatke, ki tvorijo protitelesa (3, 5, 6).

2. Kemokini

Beseda kemokini je okrajšava za besedno zvezo kemotaktični citokini. Gre za veliko družino strukturno homolognih majhnih citokinov (8-10kDa), ki stimulirajo migracijo levkocitov in spodbujajo prehod levkocitov iz krvi v tkiva. Kemokinski sistem nadzoruje migracijo in pozicioniranje imunskih celic – pomembni so pri homeostatski cirkulaciji levkocitov, akutnem vnetju, celični/humoralni imunosti, pa tudi sekundarnih odzivih. Izražajo se v limfatičnih in nelimfatičnih tkivih. Zaradi vseh teh lastnosti jih lahko v funkcijskem smislu razdelimo na vnetne in homeostatske, odvisno od vzorcev ekspresije in s tem povezane funkcije v organizmu. Vnetne kemokine proizvajajo različne celice, kot so levkociti, epitelne in endotelijske celice ter fibroblasti. Sekretijo kemokinov iz teh celic inducirajo mikrobi na podlagi TLR (Toll-u podobni receptorji)-signaliziranja in vnetni citokini, kot sta TNF (dejavnik tumorske nekroze – angl. *tumor necrosis factor*) in IL-1. Nekateri kemokini, ki jih proizvajajo z antigenom stimulirane celice T, so povezava med

pridobljeno imunostjo in drugimi vnetnimi levkociti. Homeostatski kemokini, ki stalno nastajajo v limfatičnih organih (brez vnetnih stimulusov), so ključni za fiziološko migracijo limfocitov skozi organe in ohranjanje homeostaze. Ob neuravnoteženi ekspresiji kemokinov in njihovih receptorjev se lahko razvijejo različne bolezni, kot so avtoimunske in kronične vnetne bolezni, pa tudi imunske pomanjkljivosti in rak (4, 9, 10, 12).

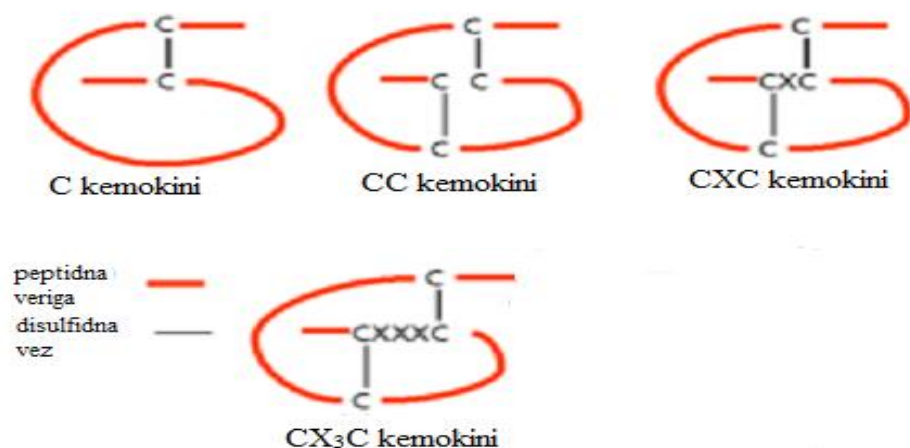
Ali je določen citokin kemokin, je odvisno od njegove strukture. Kemokini imajo v svoji zgradbi vsaj 2 cisteina, povezana z disulfidnimi vezmi. Večina kemokinov ima 4 cisteine, zato se tvorita 2 disulfidni vezi. Prva dva cisteina sta blizu skupaj na N-terminalnem koncu, tretji cistein je v centru molekule in četrti v bližini C-terminalnega konca. Cisteini so ključni za terciarno strukturo teh proteinov, ki je v obliki grškega ključa (4 zaporedne antiparalelne β -plošče, povezane z α -vijačnicami). Kemokini so vedno zviti tako, da je pri tridimenzionalni strukturi α -vijačnica od spredaj, β -plošče pa od zadaj – slika 1 (13, 14).



Slika 1: Tridimenzionalna struktura kemokinskih receptorjev in grški ključ – antiparalelna struktura, povezana z disulfidnimi vezmi (prirejeno po 11)

Do zdaj so odkrili približno 50 kemokinov in 20 kemokinskih receptorjev, razdeljenih v 4 družine glede na število in pozicijo N-terminalnih cisteinov (slika 2):

- CC-družina: 1. in 2. cistein sta eden zraven drugega; velika družina kemokinov;
- CXC-družina: med 1. in 2. cisteinom je ena aminokislina; znani so številni kemokini;
- C-družina: nimajo 1. in 3. cisteina, zato imajo le eno disulfidno vez; poznamo le 2 takšna kemokina;
- CX₃C-družina: med 1. in 2. cisteinom imajo 3 aminokislina; za zdaj je znan samo en takšen kemokin.

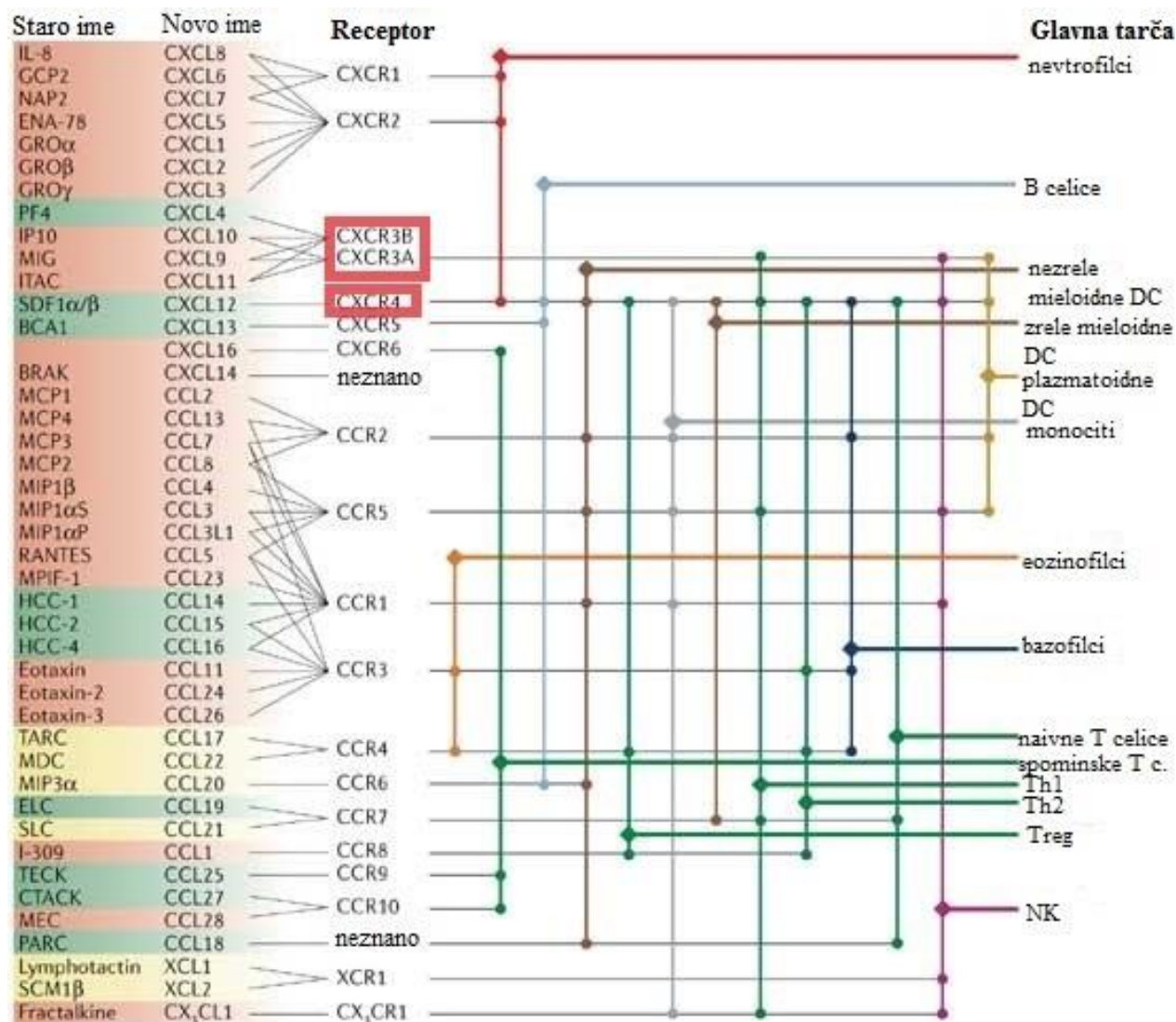


Slika 2: Struktura družin kemokinskih receptorjev; družine kemokinskih receptorjev se razlikujejo po številu cisteinov v strukturi in s tem tudi po številu disulfidnih vezi, ki jih tvorijo cisteinski ostanki (prirejeno po 11)

Kemokini se vežejo na polisaharid heparan-sulfat proteoglikan, ki je eden ključnih polisaharidov na površini endotelijskih celic. Tako so vedno na voljo cirkulirajočim levkocitom (15, 16). Kemokini izvajajo svoje kemotaktične funkcije z vezavo na kemokinske receptorje, ki so z G-proteinom sklopljeni receptorji s 7 transmembranskimi α -vijačnicami. Kemokinski receptorji so predstavniki A-družine receptorjev GPCR (17).

Funkcije kemokinov v telesu so torej raznolike (slika 3):

- usmerjajo celice imunskega sistema na mesto infekcije;
- regulirajo migracijo limfocitov in drugih levkocitov prek perifernih limfatičnih tkiv;
- promovirajo angiogenezo in celjenje ran (CXC-družina);
- vključeni so v razvoj različnih nelimfoidnih tkiv (miši so denimo brez CXCR4-receptorja razvile hude defekte pri razvoju srca in možganov);
- sodelujejo tudi pri rekrutaciji celic in vnetju (18, 19).

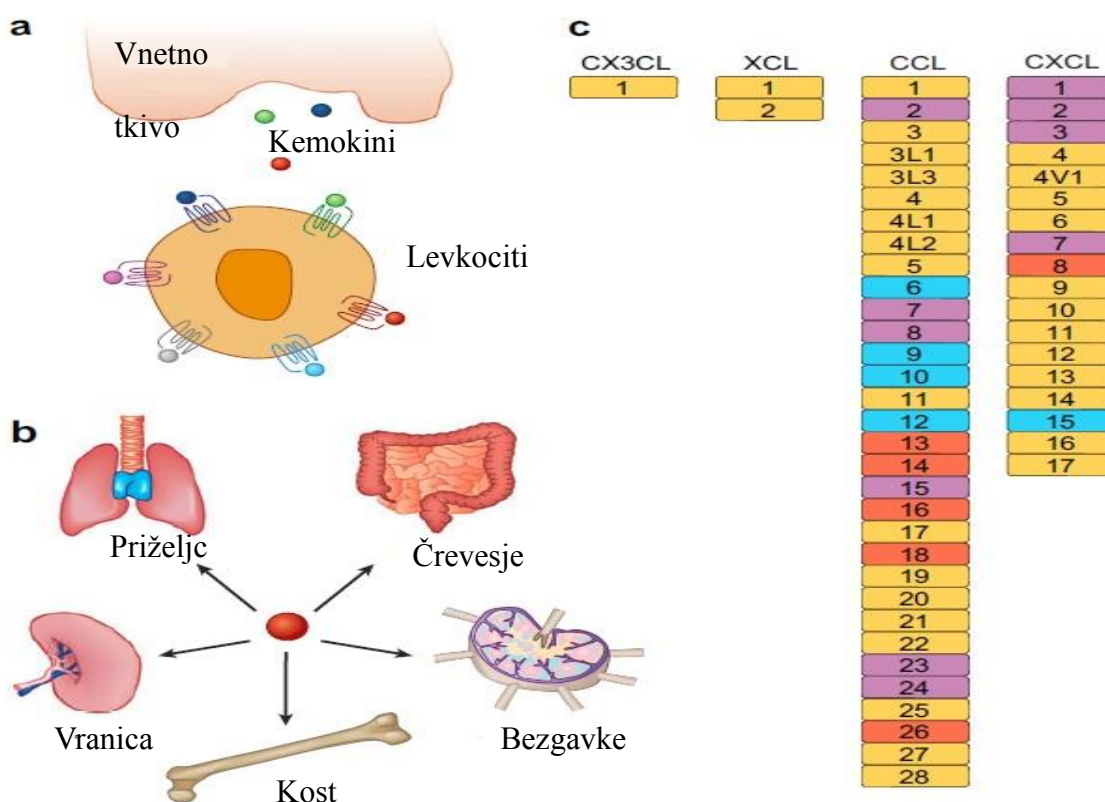


Slika 3: Humani kemokini in njihovi receptorji; za vsak kemokin je navedeno staro in novo ime, specifični receptor(ji) in glavne levkocitne tarče (prirejeno po 9)

Vezava endogenih kemokinov na pripadajoče receptorje povzroči aktivacijo G α i-razreda G-proteinov. Posledica tega so kemotaksa, inhibicija adenilat ciklaze in tudi nižja koncentracija cikličnega adenozin monofosfata (cAMP). To pa privede do rekrutacije β -arestina (20, 21).

Ena od lastnosti kemokinskega sistema je tudi redundanca. To pomeni, da lahko vsaka celična populacija izraža več receptorjev za različne kemokine in da posamezni receptor veže več ligandov. Zato se tudi ligandi lahko vežejo na več receptorjev. Druga pomembna lastnost kemokinskega sistema je pleiotropizem – posamezni kemokin lahko deluje na različne celične populacije in ima številne učinke. To pomeni, da so različni kemokini

odgovorni tudi za enake fiziološke funkcije na različnih receptorjih. V smislu načrtovanja sinteznih ligandov pomeni to, da en antagonist na le enem receptorju nikoli ne zadostuje za doseganje ustreznega učinka. Obe lastnosti sta pomembni pri odkrivanju novih zdravil, saj se lahko zgodi, da tudi zelo potentni inhibitorji na določenem receptorju nimajo zadovoljivega pozitivnega učinka. Redundanca in pleiotropizem sta lahko tudi ovira za terapijo, ker zaradi nespecifične vezave pride do nezaželenih učinkov. Toksični učinki kemokinskih antagonistov so zelo pomembni za nadaljnji razvoj podobnih učinkovin. Obstajajo poročila o povečani dovzetnosti za infekcije in poslabšanju simptomov bolezni po aplikaciji antagonistov kemokinskih receptorjev. Znan je tudi primer ustavitve klinične študije za zdravljenja HIV (humani imunodeficitarni virus)-infekcije s plerixaforjem zaradi kardiovaskularnih zapletov pri bolnikih – slika 4 (4, 9, 10, 22).



Slika 4: Ključne lastnosti kemokinskega sistema: a) redundanca; b) pleiotropizem; c) vrstna nespecifičnost – rumena barva: humani kemokini, ki imajo ustrezen ekvivalent pri miših; rdeča barva: kemokini, ki so značilni samo za ljudi; modra barva: kemokini, ki so značilni samo za miši; vijolična barva: kemokini, ki imajo različne funkcije pri ljudeh in miših (prirejeno po 9)

3. CXCR4/CXCL12-kemokinska os

CXC-kemokinski receptor 4 (CXCR4) je receptor za SDF-1 (angl. *stromal-derived factor 1*), znan tudi pod oznako CXCL12. Matične celice izražajo CXCR4 med embrionalnim razvojem in to jim omogoča migracijo do končnega cilja, kjer se bodo diferencirale v tkiva in organe. Pri poskusih na miših, ki niso izražale CXCR4/CXCL12-osi so odkrili letalni fenotip. To dokazuje, da je os CXCR4/CXCL12 kritično pomembna za embrionalni razvoj. Izkazalo se je tudi, da CXCR4 sodeluje pri razvoju nevronov med embriogenezo, pa tudi pri odraslih, pri katerih ima pomembno vlogo pri nevrnalnih usmeritvah. Miši z mutiranim genom za CXCR4 so imele nepravilno distribucijo nevronov. To povezujejo z epilepsijo (23). Tudi fagociti iz prirojenega imunskega sistema, kot so nevtrofilci in makrofagi, izražajo CXCR4. To jim omogoča, da se gibljejo proti povečanemu gradientu CXCL12, ki je na mestu vnetja. Nedavni podatki kažejo, da je tudi ubikvitin naravni ligand za CXCR4. Ubikvitin je majhen protein, sestavljen iz 76 aminokislin ter najbolj znan po tem, da označuje in usmerja določene proteine ter s tem omogoča njihovo razgradnjo na podlagi ubikvitinsko-proteasomskega sistema (ubikvitinacija). Navzoč je povsod v evkariontskem organizmu. Sodeluje pri različnih celičnih procesih, kot so degradacija proteinov, odziv na stres, regulacija celičnega cikla, prenos proteinov, signaliziranje v endocitozi, in pri regulaciji transkripcije. Deluje kot signalna molekula in sprejemnik informacij. To se kaže z mono- ali poliubikvitiniranim lizinom. Ubikvitin je protivnetni imunski modulator in endogeni antagonist provnetnih poškodb. CXCR4 interagira s USP14, ki je ubikvitinsko specifična proteaza 14. Miši z mutacijo in s tem reducirano ekspresijo tega proteina so zaostajale v rasti, imele so paralizo udov in poginile v starosti 6 do 10 tednov (24, 25).

Intenzivnejše izražanje CXCR4 je povezano s spremembami pri rastnih faktorjih, transkripcijskimi faktorji in hipoksijo-inducirajočimi faktorji. V primerjavi z normalnimi organi je oksigenacija tumorskih tkiv slabo regulirana in koncentracija kisika v krvi značilno nizka. Slednja povzroči intenzivnejše izražanje HIF-1 (hipoksijo-inducirajoči faktor 1) v rakavih celicah. HIF-1 pa inducira ekspresijo CXCR4 (26). PAX3 je transkripcijski dejavnik, ki rekrutira proteine za delovanje v aktivacijskem ali represorskem kompleksu. FOXD3 je njegov kofaktor. Oba se izražata v melanomskih celicah ter direktno interagirata in spodbujata ekspresijo CXCR4 (26). V 90. letih so odkrili, da je CXCR4 koreceptor za virus HIV. Njegov pomen pri prepoznavanju HIV bo

podrobneje opisan v nadaljevanju. Kot vidimo, ima pomembno vlogo pri različnih fizioloških in patoloških stanjih (4, 28, 30, 31).

3.1 CXCR4 in rak

Rak je posledica različnih bolezenskih sprememb, ki sta jim skupna nenormalna celična rast in sposobnost, da se širijo v okoliško tkivo. Benigni tumorji se ne širijo in ne pomenijo take hude nevarnosti za pacienta. Tumor, ki se začne širiti v oddaljene organe, se imenuje rak. Povezava med tumorjem in njegovim mikrookoljem je ključna pri tumorogenezi, invaziji in metastaziranju. Interakcije med spremenjenimi epitelijskimi celicami in signali iz mikrookolja vplivajo na razvoj raka ter njegovo preživetje in migracijo. CXCR4 in CXCL12 vplivata na sposobnost celične rasti, metastaziranja, angiogeneze ter interakcije med celicami in mikrookoljem. Pretirano izražanje CXCR4 povezujejo z več kot 20 vrstami raka, všteti rak dojke, jajčnikov, prostate, ezofagealni rak, mielom, nevroblastom in rak na ledvicah. Povezujemo ga tudi z metastaziranjem v tkiva, ki imajo veliko koncentracijo CXCL12, kot so pljuča, jetra in kostni mozeg (32).

Ekspresija CXCR4 je povezana z metastazami. Navadno pomeni agresivno obliko raka in slabe možnosti za preživetje. Z aktivacijo intracelularnih signalnih poti, kot so PI3K, MAPK in Erk1/2, ima CXCR4 ključno vlogo pri preživetju rakavih celic, njihovi proliferaciji, invaziji in migraciji. Blokada interakcij med CXCR4/CXCL12 z antagonistami CXCR4 ali uporaba »utišalcev« CXCR4 prek siRNA sta zelo pomembni pri preprečevanju rasti primarnega tumorja in redukciji metastaz, zlasti v kombinaciji s kemo- in radioterapijo. Nekatere študije so pokazale, da CXCR4 spodbuja metastaziranje na podlagi limfatičnega sistema. Izražanje v tkivih je povezano tudi s ponovitvami. Lahko bi ga uporabljali kot prognostični marker (4, 28, 30, 31).

3.2 CXCR4 in HIV

HIV (virus humane imunske pomanjkljivosti) je povzročitelj aidsa (aktivirani imunski deficitarni sindrom, angl. *acquired immune deficiency syndrome*). Zanj sta značilni izrazita imunosupresija s povezanimi oportunističnimi okužbami in malignimi tumorji ter degeneracija centralnega živčnega sistema. Okuženost s HIV ima že razsežnosti

pandemije. Vsak dan je približno 14.000 novih primerov okužbe. HIV spada v lentivirusno družino živalskih retrovirusov. Njegov genom je namreč zapisan v RNK. Okuži različne celice imunskega sistema, kot so CD4⁺-celice T-pomagalk, makrofagi in dendritične celice. Ko vstopi v celico, se njegov RNK prepíše v DNK. Prepis povzroči encim reverzna transkriptaza, ki ga virus prenese s sabo v svoji kapsuli. Pri prepisovanju se pojavljajo številne napake. To privede do tega, da se virus izredno hitro spreminja in temu organizem ne more slediti. Virus nenehno spreminja svoj genom in s tem povezane antigene ter se tako izmakne imunskemu sistemu. Zato lahko preživi vsak silovit napad celic B in T. Virus HIV zniža število imunskih celic z različnimi mehanizmi, kot sta piroptoza okuženih celic in apoptoza neokuženih celic. Sčasoma se v teh celicah začnejo pojavljati in nizati napake ter postajajo čedalje manj učinkovite. Vse manj jih je sposobnih prepoznati virus in nanj ustrezno reagirati. S tem se imunski sistem sčasoma sesuje (33, 34).

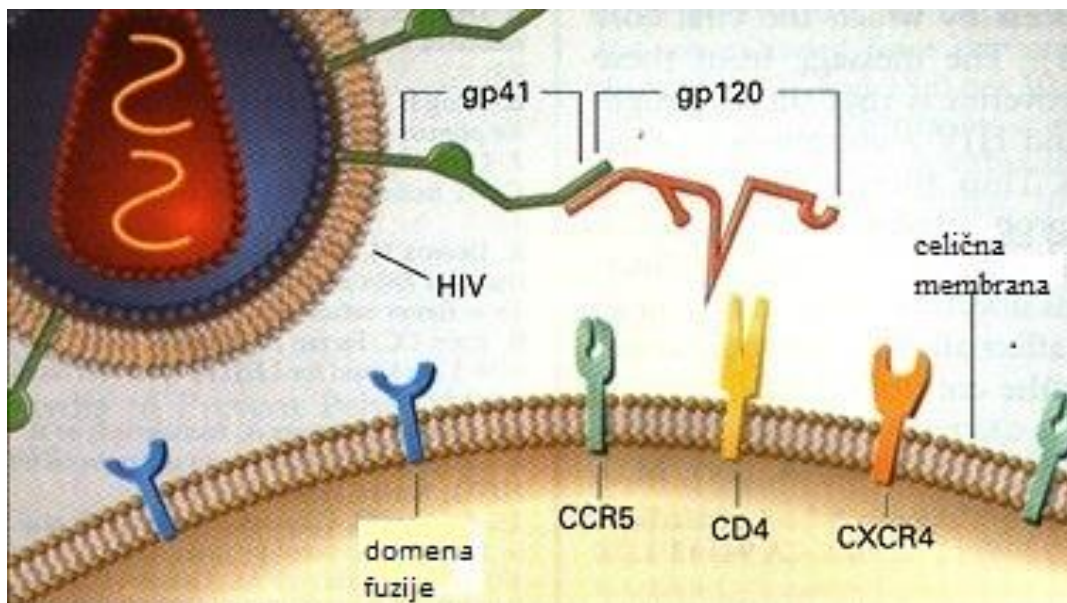
Aids se običajno razvije po več letih inkubacijske dobe. Po okužbi se v 2 do 6 tednih pojavi akutni HIV-sindrom oziroma gripi podobno stanje. Protitelesa je mogoče odkriti v krvi 4 do 12 tednov po okužbi. Z virusom se lahko okužimo s krvjo, semensko tekočino, izločkom bulbouretralne žleze, nožničnim izločkom in materinim mlekom. Najpogostejše so okužbe pri nezaščitenem spolnem odnosu in z uporabo nerazkuženih igel. V nerazvitem svetu se veliko otrok okuži z materinim mlekom. V razvitem svetu je okužba pri transfuziji krvi skoraj nemogoča zaradi strogega nadzora nad darovano krvjo. Okužba s slino, znojem ali solzami ni znana. Poznamo dva tipa tega virusa: HIV-1 in HIV-2. Prvi prevladuje po vsem svetu, drugi pa je najpogostejši na območju zahodne Afrike (4, 35, 36).

Virus HIV vstopa v celico v tem zaporedju:

- vezava virusne plaščne beljakovine gp120 na celični receptor CD4;
- konformacijska sprememba beljakovine gp120, ki povzroči večjo afiniteto do koreceptorja ter hkrati izpostavi beljakovino gp41;
- vezava gp41 na koreceptor (CCR5 ali CXCR4);
- prodiranje beljakovine gp41 skozi celično membrano, s čimer se membrani virusa HIV in gostiteljeve celice dovolj približata za zlitje;
- vstop virusne sredice v gostiteljevo celico.

Pri vstopu virusa v gostiteljevo celico sodeluje več ključnih beljakovin, v tem diplomskem delu sta za nas najbolj zanimivi CCR5 in CXCR4. Druge pa so še: CD4 – beljakovinski

receptor, ki je na površini celic pomagalk (celic T CD4), gp120 – beljakovina na površini virusa HIV, ki se veže na receptor CD4 in gp41 – beljakovina virusa HIV, ki je vezana na gp120 in omogoči prodiranje (penetracijo) skozi celično membrano – slika 5 (4, 37).



Slika 5: CXCR4 kot koreceptor za virus HIV; pri adsorpciji virusa najprej pride do interakcije med glikoproteinom gp120, ki je na virusni ovojnici in med receptorjem CD4, ki je na celični membrani; nato se gp120 veže na koreceptor CXCR4 in omogoči prodiranje skozi celično membrano (prirejeno po 38)

Protein gp120 je pomemben za vezavo virusa na celični receptor CD4 in tudi na koreceptorje CXCR4 in CCR5. Pri primarni okužbi z virusom HIV-1 je glavni koreceptor navadno CCR5. Med podvojevanjem v telesu virus spreminja uporabo koreceptorja in začne bolj izkoriščati CXCR4. Ta preklon je pogosto povezan z izražanjem simptomov aidsa in poslabšanjem prognoze za bolnika (4, 29, 38, 39, 40).

4. CXCR3/CXCL10-kemokinska os

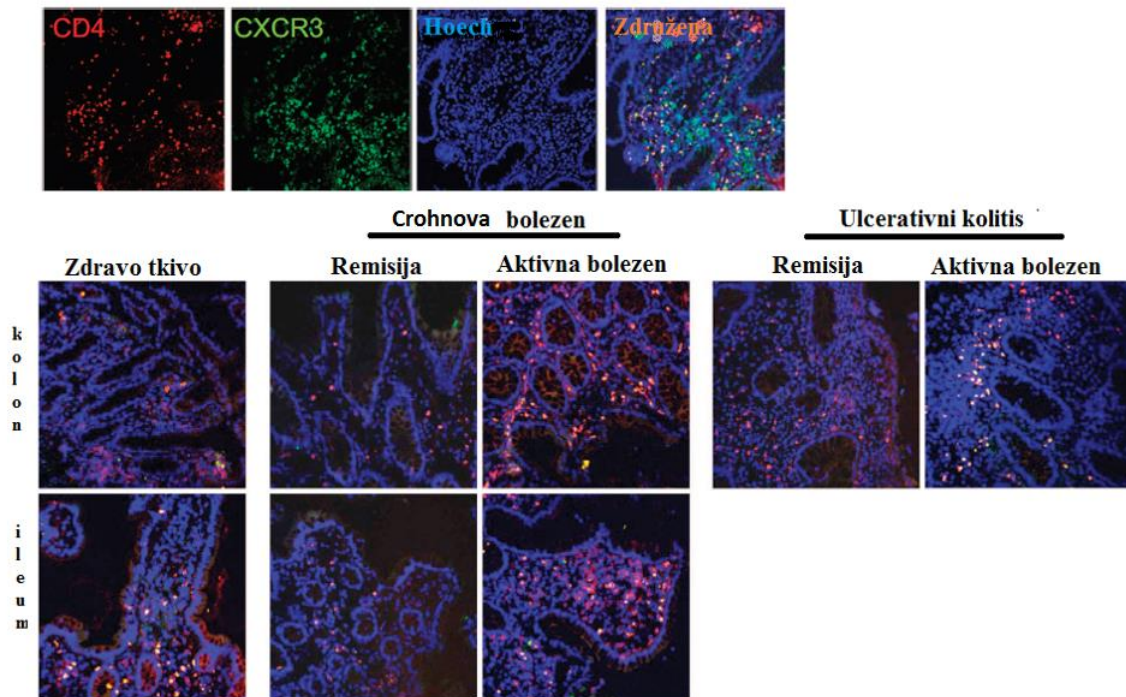
CXC-kemokinski receptor 3 (CXCR3) je receptor za CXCL10, znan tudi kot IP-10. CXCR3 je znan tudi kot GPR9 (z G-proteinom sklopljen receptor) in CD183. Tudi CXCR3 veže kemokine CXCL9 (MIG) in CXCL11 (I-TAC). Pri ljudeh obstajajo 3 izoforme receptorja CXCR3: CXCR3-A, CXCR3-B in CXCR3 – alternativni receptor (CXCR3-alt). CXCR3 izražajo zlasti aktivirani limfociti T, celice NK in nekatere epiteljske celice. Nedavno so odkrili, da ga izražajo tudi gladke mišice žil. Zdi se, da je pomemben pri nadzoru fiziološko žilne regulacije. CXCR3 in CCR5 sta primarno izražena na celicah Th1.

Osnovna funkcija CXCR3 je regulacija migracije levkocitov. Sodeluje pri rekrutaciji vnetnih celic in je pomemben pri celjenju ran. Povezan je z večino avtoimunskih bolezni, kot so ateroskleroza, multipla skleroza, pljučna fibroza, diabetes tipa 1, avtoimunska huda miastenija, nefrotoksični nefritis, Chronova bolezen in morda celiakija (41, 42, 43).

Sklepajo, da je CXCR3-A prevladujoča oblika v hematopoetskih celicah za posredovanje tumorske »go«-signalizacije s spodbujanjem proliferacije celic, preživetja, kemotakse, invazije in metastaz, CXCR3-B pa je glavna izoforma na epitelijskih celicah in promovira tumorsko »stop«-signalizacijo s spodbujanjem zaježitve rasti, apoptoze in atrofije žil (44).

4.1 CXCR3 in kronična vnetna črevesna bolezen

Za kronično vnetno črevesno bolezen (KVČB) je značilno kronično nekontrolirano vnetje v intestinalni mukozni. Sem spadata tudi Crohnova bolezen in ulcerativni kolitis. KVČB lahko prizadene katerikoli del prebavne cevi, od ust do anusa. Pogosti znaki vključujejo bolečine v spodnjem delu trebuha, diarejo (lahko tudi krvave driske), vročino in izgubo telesne mase. Pojavljajo se tudi razjede v ustih. Druge pridružene bolezni, značilne za KVČB, so anemija, kožni izpuščaji, artritis, vnetja očesa, nekroza tkiva in kronična utrujenost. Pri pacientih s KVČB je večja verjetnost, da bodo dobili raka na črevesju. Dokazali so intenzivnejše izražanje CXCR3-receptorja v vnetnem tkivu KVČB. Gladke mišične celice črevesja bolj izražajo CXCR3-receptor kot druge kemokinske receptorje. Kemokinski receptor CXCR3 je napovednik aktivne oziroma napredovane Crohnove bolezni (45, 46). Wadva in sod. so odvzeli biopsijske vzorce zdravega tkiva kolona in ileuma ter jih primerjali z vzorci pacientov z remisijo Crohnove bolezni oziroma ulcerativnega kolitisa ter s pacienti z aktivno obliko bolezni. PBMC-celice so najprej označili s protitelesi proti CD4⁺ in CXCR3. Barvilo Hoechst so uporabili za barvanje celičnih jeder. Nato so celice iz vzorčnih tkiv testirali s pretočnim citometrom in dokazali, da so pri aktivnih oblikah obeh bolezni navzoče številne CD4⁺CXCR3⁺-celice T – slika 6 (42).



Slika 6: Celice in receptorji pri KVČB; intenzivnejše izražanje CXCR3⁺ na limfocitih T tipa CD4⁺ in vnetja črevesna mukoza pri pacientih z vnetno črevesno boleznijo; v zgornji vrstici so na 4ih slikah prikazani različni primeri označevanja celic; v spodnjih dveh vrsticah so primeri označevanja celic, ki so jih pridobili iz biopsijskih vzorcev tkiv; primerjali so 5 različnih vzorcev: izražanje CD4⁺ CXCR3⁺ na zdravem tkivu, pri pacientih s Crohnovo boleznijo v fazi remisije, pri pacientih s Crohnovo boleznijo z aktivno obliko bolezni, pri pacientih z ulcerativnim kolitisom v fazi remisije in pacientih z ulcerativnim kolitisom z aktivno obliko bolezni; jasno so pokazali, da so v vnetnem tkivu črevesne mukoze prisotne CD4⁺CXCR3⁺-celice T (prirejeno po 42)

Do zdaj še niso znani vzroki za bolezen. Predvidevajo, da so za KVČB odgovorni kombinacija dejavnikov iz okolja, imunski in bakterijski dejavniki ter genetska dovzetnost posameznika. Iz tega izhaja imunski odziv telesa proti lastnim celicam v GIT-u in s tem kronična vnetna motnja. Čeprav je imunski odziv ključen za sprožitev bolezni, Crohnova bolezen ni avtoimunska bolezen, ker imunskega odziva ne sproži telo samo proti sebi. Zdi se, da pride, do kroničnega vnetja ko skuša pridobljeni imunski sistem nadomestiti pomanjkljivo delovanje prirojenega imunskega sistema (48). Crohnova bolezen je pogostejša v razvitem svetu (Severna Amerika in Evropa) kot v manj razvitih delih sveta (Afrika, Azija). Njena pojavnost narašča od leta 1970. Bolezen se najpogosteje pojavi med 15. in 30. letom starosti, pojavi pa se lahko kadarkoli.

Če se bolezen pojavi že v otroški dobi, so značilni zastoji v rasti in pogosta vročinska stanja. Kot je bilo že rečeno, je bolezen kompleksna ter ohromi bolnika in vso družino. Navadno prizadene bolnika v najbolj obetavnem obdobju življenja, zato je treba nujno ugotoviti prave vzroke in odkriti zdravila, ki bi bolezen vsaj zajezila, če ne že ozdravila. V eni od študij so ugotovili, da sistemska blokada CXCR3-receptorja z antagonistom privede

do izrazite omejitve resnosti bolezni. Trenutno je več hipotez, ki skušajo razložiti vzroke za nastanek Crohnove bolezni. Ena od njih je, da je Crohnova bolezen primarno avtoimunska bolezen celic T. Po novejših hipotezah je Crohnova bolezen rezultat pomanjkljivega delovanja prirojenega imunskega sistema. Možni vzrok je tudi oslABLJENO izločanje citokinov iz makrofagov. To prispeva k pomanjkljivemu delovanju prirojene imunosti in vodi to trajnega vnetnega odziva, ki ga aktivirajo mikrobi v kolonu, kjer je velika bakterijska obremenitev. Po drugi teoriji naj bi vnetje pri Crohnovi bolezni povzročala pretirana aktivacija citokinov, povezanih s celicami Th1 in Th17. Potrjeno je, da CXCR3 inhibira proliferacijo intestinalnih epitelnih celic. Ena od številnih teorij poudarja, da je človeški organizem vedno izpostavljen parazitom in da so ekstremne higienske navade v sodobnem svetu drastično zmanjšale izpostavljenost parazitom, tudi navadno navzočim in potrebnim za normalno delovanje črevesja. To je oslABELO imunski sistem in povzročilo njegovo pretirano reakcijo na neškodljive parazite (47, 48, 49, 50, 51).

5. Kemokinski receptorji kot terapevtska tarča

Razvoj nove učinkovine je zahteven in pri tem morajo biti zadovoljeni osnovni pogoji. Seznan zahtev je sicer dolg, v nadaljevanju pa se bomo osredotočili na osnovne:

- Tarčna specifičnost – spojina mora izkazovati veliko specifičnost za določeno tarčo, na primer encim, receptor itd.
- Vrstna specifičnost – spojine načrtujemo na osnovi humanih tarčnih proteinov. Nato moramo ugotoviti nehumane ekvivalente, na katerih lahko izvajamo učinkovita testiranja. Se pravi, da je treba imeti ustrezen sistem za preverjanje učinkovitosti, ki je vrstno specifičen.
- Ustrezna farmakokinetika – da bi dosegli terapevtsko delovanje, mora spojina po aplikaciji doseči tarčo in na tej poti lahko naleti na veliko izzivov, kot so absorpcija, distribucija, metabolizem in izločanje učinkovine.
- Ustrezna farmakodinamika – za doseganje zaželenega učinka moramo aplicirati ustrezen odmerek zdravila, odvisen od biološkega odziva na spojino.
- Toksičnost – predvsem so problematični toksični učinki spojine na jetra in ledvice, neželeni učinki na CŽS, mutageni in teratogeni potencial, hemodinamične

spremembe itd. Potencialne nevarnosti je treba skrbno proučiti in izključiti mogoči škodljivi učinek na človeka.

Pri razvoju spojin, ki se vežejo na z G-proteinom sklopljenimi receptorji, se pogosto pojavi težava z navzkrižno reaktivnostjo antagonistov kemokinskih receptorjev z drugimi člani GPCR-družine, denimo majhna molekula antagonista lahko reagira z drugimi člani iste družine oziroma lahko interagira s člani druge družine. Druga resna težava je, da imajo majhne molekule antagonistov majhno afiniteto za nehumane receptorje. To precej otežuje testiranje na živalskih modelih. Za zdaj še ne poznamo dobro kompleksnih mehanizmov kemokinskega delovanja in večkrat spregledamo to, da ima vsaka kombinacija kemokin/receptor/celična membrana specifično vlogo v fiziološkem in patološkem smislu. Zavedamo se, da kažejo kemokinski receptorji zapleteno in pristransko signalizacijo do določenih ligandov ter da so ligandi lahko agonisti za en receptor in hkrati antagonisti za drugega. Majhne molekule antagonistov so v bistvu alosterični modulatorji in se lahko vežejo na številna mesta na receptorjih. To privede do nepredvidenih posledic. Drugi vidik, ki ga je treba upoštevati pri izbiri kemokinskih receptorjev, ki sodelujejo pri bolezni, je možnost spremembe ekspresijskega vzorca, zlasti po aktivaciji levkocitov. Izpostavljenost IFN- γ *in vitro* lahko recimo inducira ekspresijo CCR1 in CCR2 na nevtrofilcih, nevtrofilci pa infiltrirajo vneta pljuča (pacienti s KOPB) ali sklepe (pacienti z revmatoidnim artritisom) ter okrepijo odziv nekaterih kemokinskih receptorjev, ki niso normalno povezani s temi celicami (22). Takšne nepričakovane ekspresije kemokinskih receptorjev so lahko klinično pomembne.

Za zdaj obstaja le eno registrirano zdravilo, ki ima kot učinkovino antagonist kemokinskega receptorja. Učinkovina je pleriksafor, makrociklična učinkovina, derivat biciklama (slika 7), ki je selektivni reverzibilni antagonist CXCR4-receptorja in blokira vezavo CXCL12. Pleriksafor je tudi alosterični agonist CXCR7-receptorja. Zdravilo se imenuje Mozobil in je na voljo samo v bolnišnicah kot raztopina za injiciranje (53).

NAČRT ZA DELO

Na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo, so pod vodstvom izr. prof. Marka Anderluha sintetizirali potencialne antagoniste na podlagi izhodnih spojin, za katere je bilo ugotovljeno, da delujejo kot negativni alosterični modulatorji kemokinskih receptorjev CXCR4 in CXCR3. Testiranje učinka so opravili v sodelovanju s prof. dr. Nuško Tschammer na oddelku za kemijo in farmacijo univerze Friedrich Alexander Erlangen-Nürnberg. Odkrili so nekaj obetavnih alosteričnih modulatorjev, ki so izkazali selektivno delovanje. Njihova testiranja in rezultati so predstavljeni na začetku eksperimentalnega dela kot podlaga za naša nadaljnja testiranja.

Omenjene spojine (selektivne modulatorje receptorjev CXCR3 in CXCR4) želimo ovrednotiti tudi s funkcijskim testom antagonizma z uporabo primarnih človeških imunskih celic. Biološko vrednotenje smo izvedli na Zavodu RS za transfuzijsko medicino. Njihov potencialni antagonizem (sposobnost inhibicije kemokinskega delovanja naravnih ligandov SDF-1 in CXCL10) smo proučevali z migracijskim testom »transwell« *in vitro*.

Najprej smo ovrednotili topnost spojin v DMSO in celičnem mediju ter citotoksičnost spojin na tarčnih celicah (CD4⁺ limfocitih T), ki sta nujna parametra za nadaljnje delo. Določili smo tudi fenotip receptorjev CXCR3 in CXCR4, da bi dokazali, da se izražata na celicah, s katerimi smo delali. Po tem smo s tako imenovanim testom »transwell« preverili sposobnost migracije imunskih celic, ki izražajo kemokinski receptor CXCR4 ali CXCR3 v dvoprekatni gojilni posodi s poroznim dnom prvega prekata. Antagonizem spojin smo nato določali na podlagi njihove sposobnosti, da inhibirajo migracijo celic, ki izražajo CXCR4, v smer koncentracijskega gradienta naravnega liganda CXCR4, kemokina SDF-1. Antagonizem spojin na receptorju CXCR3 smo preverili z enako metodologijo, vendar z uporabo kemokina CXCL10, ki je naravni ligand receptorja CXCR3.

Na podlagi dobljenih rezultatov smo skušali ugotoviti delovanje spojin na receptorje in povezavo med njihovo topnostjo, citotoksičnostjo in aktivnostjo. Rezultati bodo pripomogli k nadaljnjemu raziskovanju in lažjemu ter bolj usmerjenemu načrtovanju učinkovin na kemokinskih receptorjih.

MATERIALI IN METODE

Biološko vrednotenje aktivnosti spojin smo izvedli na tarčnih celicah ($CD4^+$ -limfocitih T ali celokupnih perifernih mononuklearnih celicah (PBMC)), ki smo jih izolirali iz periferne krvi darovalcev. Vsak dan smo pridobili zgoščene levkocitne plasti (Buffy coat) na Zavodu RS za transfuzijsko medicino (v okviru stalne krvodajalske aktivnosti) od zdravih odraslih. Tehnično osebje ZTM darovano kri rutinsko pred uporabo obdela v predelovalnem laboratoriju tako, da eritrocite loči od levkocitov z gradientnim centrifugiranjem. S tem se doseže sedimentacija rdečih krvnih celic. Ker imajo eritrociti največjo specifično gostoto, se posedejo prvi. Z vrha sedimentiranih eritrocitov se nato iztisne tako imenovani »buffy-coat« ali plast, bogata z levkociti. Zgoščena levkocitna plast, ki smo jo uporabljali za nadaljnje analize, je bila pripravljena sveže na dan eksperimenta ter pridobljena anonimno od prostovoljcev različnih spolov in krvnih skupin, po internih navodilih in standardih ZTM. 50 mL tako pripravljene zgoščene levkocitne plasti smo uporabili za nadaljnje delo. Pri delu smo uporabljali naslednje aparature in materiale:

Laboratorijska oprema

- Komora z laminarnim pretokom zraka (LAF-komora) Biosafe 7-130-1 proizvajalca Ehret,
- pretočni citometer FACSCalibur (Becton Dickinson),
- centrifuga Heraeus Sepatech Megafuge 1.0,
- mala centrifugirka MiniSpin (Eppendorf),
- avtomatski števec za štetje celic Vi-Cell™ XR, Cell Viability Analyzer (Beckman Coulter),
- hladilnik in zamrzovalnik (Electrolux, Nemčija),
- mešalo vorteks Vibromix 113,
- optični mikroskop Nikon Eclipse TE2000-S,
- inkubator Heraeus Hera Cell 150,
- krovna stekelca (Brand),
- avtomatske pipete 0,5-10 μ L, 2-20 μ L, 10-100 μ L, 100-1000 μ L (Corning Lambda),
- nastavki za pipete Eppendorf,
- Pasteurjeve pipete Copan
- elektronski pipetor PIPETBOY Comfort,

- 10-mL-sterilne serološke pipete (Greiner Bio-One),
- 25-mL- in 50-mL-centrifugirke (Sarstedt),
- gojitvene posodice TC Flask T75 (Sarstedt),
- tkivne plošče z 12 in 24 polji (Nunc, Thermo Fisher Scientific),
- mikrotitrne ploščice BioLite 96 Well Multidish,
- mikrotitrne ploščice za gojenje celic in test migracije (Thermo Fischer Scientific),
- magnetno stojalo, magnet in kolona MidiMACS MicroBeads (Miltenyi Biotec) in
- krioviale (Greiner Bio One).

Kemikalije

- Denaturirani alkohol za razkuževanje Kleralcohol (Ecolab),
- topilo dimetil sulfoksid (DMSO) (Wak-chemie medical GmbH),
- celični medij RPMI 1640 (Lonza, Belgija),
- celični pufer DPBS (Gibco, ZDA),
- medij za izolacijo celic Lympholyte-H (Cedarlane, Kanada),
- fetalni goveji serum (FBS) (Gibco),
- CD4⁺ MicroBeads (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Nemčija),
- 7-AAD,
- GlutaMAX,
- antibiotik gentamicin,
- SDF-1 in CXCL10 (Peprotech, London, Velika Britanija),
- anti-CD4⁺-FITC,
- anti-CXCR4-PE,
- anti-CXCR3-PE,
- anti-CD25-PE in anti-T-bet-PE (vsa protitelesa od Miltenyi Biotec),
- makrokroglice z anti-CD2, anti-CD3 in anti-CD28 (Miltenyi Biotec),
- komplet reagentov kroglic za pretočno citometrijo CBA Th1/Th2/Th17 (Beckton Dickinson).

EKSPERIMENTALNO DELO

Osnovna testiranja učinka so opravili na oddelku za kemijo in farmacijo univerze Friedrich Alexander Erlangen-Nürnberg v sodelovanju s prof. dr. Nuško Tschammer. Spojine so načrtovali, sintetizirali in biološko ovrednotili. Odkrili so nekaj obetavnih alosteričnih modulatorjev, ki so kazali selektivno delovanje. Negativno modulacijo teh spojin so ovrednotili z dvema testoma: rekrutacija β -arestina 2 in cAMP test na osnovi metode BRET (ang. *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*).

Dokazovanje rekrutacije β -arestina 2 temelji na tem, da kemokin povzroči rekrutacijo β -arestina 2 na receptor in pride do združitve dveh β -galaktozidaznih fragmentov. Ta združitev privede do generacije aktivnega encima, ki nato hidrolizira PathHunter detekcijski reagent (DiscoverX), in pride do oddajanja kemiluminiscenčnega signala, ki ga merimo. Opazovali so povečanje signala po stimulaciji z CXCL10 oziroma z CXCL12.

Test cAMP na osnovi metode BRET je zelo uporaben za merjenje aktivnosti receptorjev na podlagi inhibicije adenilat ciklaze, ki je glavna tarča CXCR3- in CXCR4-G-proteinov. Merili so prenos energije z donorskega encima (v tem primeru *Renilla luciferase* (Rluc)) na donorja (fluorescentni protein (YFP)), oba pa sta kondenzirana na biosenzor CAMYEL, ki drastično spremeni konfiguracijo po vezavi cAMP. Prenos energije je prostorsko pogojen in če sta donator in akceptor predaleč narazen, ni mogoč.

Za nadaljnjo karakterizacijo alosteričnega profila novih spojin so izračunali ravnotežno disociacijsko konstanto pK_b z algoritmom in Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). pK_b vrednosti obeh setov spojin so primerljive.

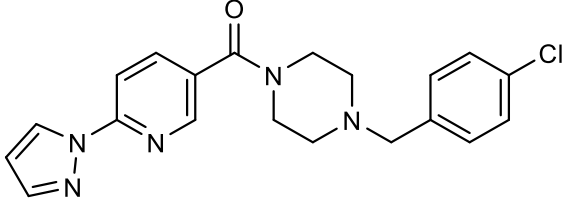
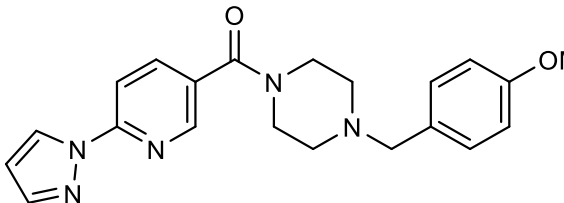
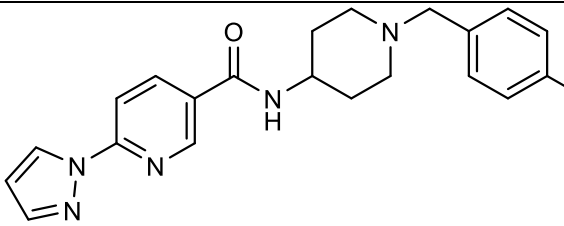
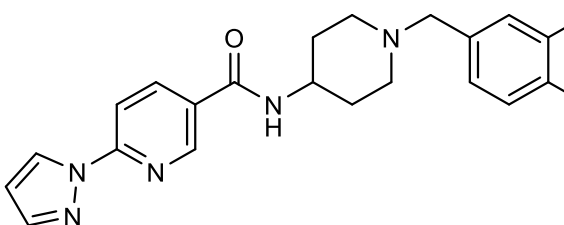
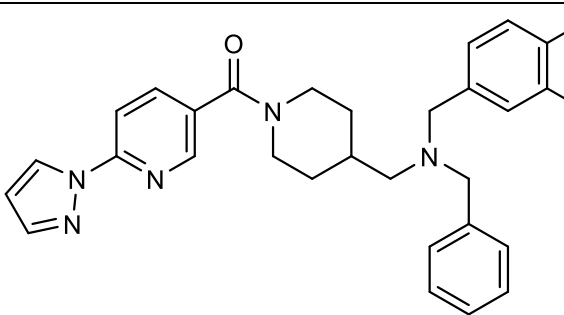
1. Priprava raztopin in določanje topnosti

Spojina, ki jih želimo testirati, je treba najprej določiti topnost. Drugače lahko dobimo pri preverjanju citotoksičnosti in testih antagonističnega delovanja lažne pozitivne oziroma negativne rezultate, ker bi bila ob izobarjanju koncentracija nižja od načrtovane. Zaradi lipofilne narave testiranih spojin smo alikvote raztopili v DMSO. Uporabljali smo jih za pripravo delovnih koncentracij spojin v celičnem mediju (preglednici I in II). Testiranje topnosti v DMSO je bila prva ocena. Če spojina ni topna v DMSO, ni topna tudi v bolj polarnih topilih, kot je celični medij. Natehtanim spojinam smo dodali izračunan volumen DMSO, da smo dobili 100 mM raztopine spojin. Vsebinsko smo dobro premešali in preverili bistrost raztopine.

Določanje topnosti smo nadaljevali tako, da smo osnovne spojine dodali celičnem mediju, tako da je bil v končni raztopini maksimalno 2 v/v % DMSO. Optimalna koncentracija DMSO, ki bistveno ne vpliva na viabilnost in funkcijo celic (10 μ L raztopine spojin v DMSO smo dodali k 1000 μ L celičnega medija), je 1 v/v %. Ker so testi trajali le 4 oziroma 6 ur, smo se pri tistih spojinah, ki so kazale slabšo topnost, odločili za 2 v/v % DMSO, ker nismo pričakovali bistvenega vpliva na funkcionalnost in viabilnost celic. Končne raztopine smo prenesli na tkivno ploščo z 48 polji in pri stokratni povečavi pod optičnim mikroskopom dodatno preverili, ali so se tvorili precipitati. To bi nakazovalo na nepopolno raztapljanje spojine. Določene spojine so kazale slabo topnost v DMSO (mlečne raztopine), zato smo jih dali še v ultrazvočno kad (15 minut, 37 °C), da bi pospešili raztapljanje. Če je bila spojina slabo topna v celičnem mediju (ocena s prostim očesom in mikroskopom), smo osnovne 100 mM-alikvote spojin v DMSO redčili do 50 mM, nato 25 mM itn. Pri nekaterih je bilo potrebno redčenje do 6,25 mM raztopine.

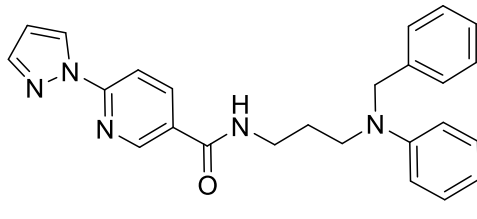
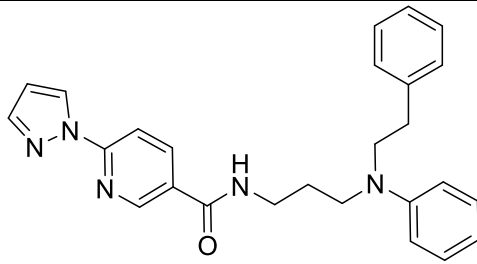
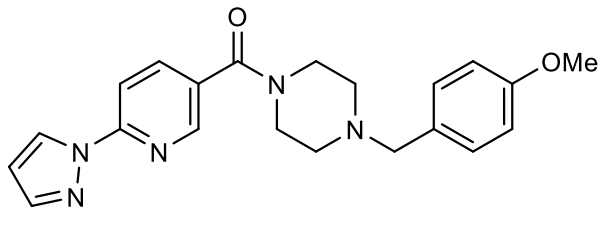
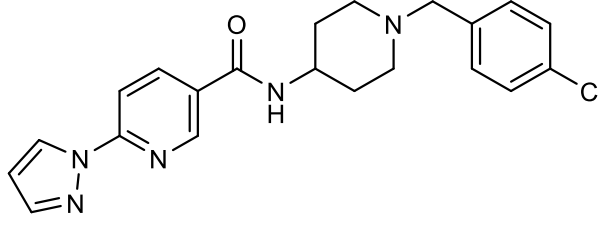
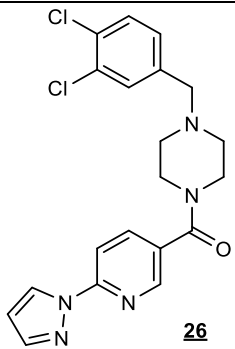
Raztopine spojin v celičnem mediju smo hranili na sobni temperaturi in čez dan ali dva znova preverili, ali je prišlo do dodatne izoboritve, ki bi potrdila netopnost spojin. Ko osnovne alikvote nismo uporabljali za testiranje, smo jih hranili v zamrzovalniku pri -21°C

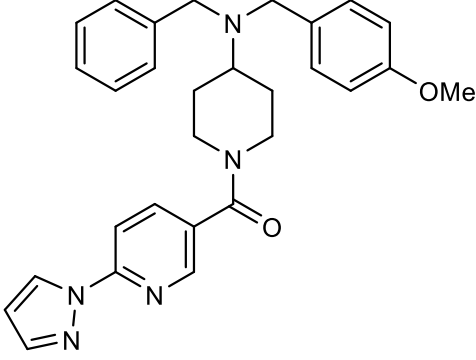
Preglednica I: Spojine za testiranja na CXCR3 – antagonisti

Ime (v mag. nalogi)	Strukturna formula	Mol. masa [g/mol]	Stehrano [mg]	Izmerjena $pK_b \pm$ SEM
AAK-31		381,14	4,70	Inhibicija > 50 % pri 10 μ M
AAK-39		377,45	4,14	6,35 \pm 0,10 ($\alpha = 0,0$)
AAK-35		395,89	4,17	6,15 \pm 0,15 ($\alpha = 0,0$)
AAK-37		397,17	4,03	Inhibicija > 50 % pri 10 μ M
AAK-46		533,17	5,91	Inhibicija > 50 % pri 10 μ M

*SEM = standardna napaka

Preglednica II: Spojine za testiranja na CXCR4 – antagonisti

Ime (v mag. nalogi)	Strukturna formula	Mol. masa [g/mol]	Stehtano [mg]	Izmerjena $pK_b \pm SEM$
AAK-10		411,21	6,61	$6,04 \pm 0,04$
AAK-19		425,54	9,27	$6,13 \pm 0,17$
AAK-39		377,45	6,39	$6,09 \pm 0,06$
AAK-35		395,89	4,96	$5,60 \pm 0,59$
AAK-32		416,32	6,16	$6,50 \pm 0,48$

AAK- 48		481,60	4,59	5,83 ± 0,03
------------	---	--------	------	-------------

*SEM = standardna napaka

2. Izolacija in gojenje primarnih človeških levkocitov

Postopki in analize, ki so vključevali delo s celicami, so potekali v aseptičnem okolju. Iz zgoščene levkocitne plasti smo izolirali PBMC (mononuklearne celice periferne krvi, angl. *peripheral blood mononuclear cells*). Po prilagojenem postopku smo z Lympholyte-H izolirali mononuklearne celice iz periferne krvi. Kri smo v sterilni posodi z DPBS-pufrom razredčili s 50 mL na 150 mL. Ločeno smo pripravili 2 centrifugirki z volumnom 50 mL ter vanju odpipetirali 11,5 mL Lympholyte-H-medija in 1 mL DPBS-pufra ter pustili, da se je mešanica ogrela na sobno temperaturo. Lympholyte-H smo redčili z DPBS zaradi boljše sedimentacije eritrocitov (optimizacija protokola na ZTM). Na površino tako pripravljene raztopine fikola smo v vsako 50 mL-centrifugirko previdno in počasi nanесли po 25 mL razredčene krvi ter centrifugirali 15 minut pri 950 g ter minimalnem pospešku in zaviranju. Po končanem centrifugiranju smo iz obeh centrifugirk iz medfaze s pipeto pobrali plast, bogato s PBMC, in jo v novi centrifugirki redčili na 50 ml. Nato smo centrifugirali 10 minut pri 660 g ter maksimalnem pospešku in zaviranju. Po centrifugiranju smo supernatant odlili, celično usedlino pa resuspendirali v DPBS. Tako dobljeno celično suspenzijo smo spirali, dokler se supernatant ni zbistril. Za spiranje smo jo centrifugirali 10 minut pri 300 g. Zbistrla se je po približno 3 do 4 spiranjih. Z nadaljnjim spiranjem smo želeli odstraniti še preostale trombocite. Pri končnem spiranju smo supernatant odlili in celice resuspendirali v 950 μ L DPBS. Izolaciji PBMC je sledila pozitivna imunomagnetna izolacija CD4⁺-limfocitov T. To smo izvedli po navodilih proizvajalca. Pripravili smo 0,5-odstotni goveji fetalni serum ali FBS (angl. *fetal bovine serum*) za spiranje kolone. Puffer za označevanje smo pripravili v 50 ml-centrifugirki tako, da smo dodali 30 ml hladnega DPBS in 150 μ l FBS (ohlajen na 4 °C). Celice, ki smo jih prej fino resuspendirali v 0,5-odstotnem FBS v DPBS, smo najprej inkubirali 10 minut pri +4°C in jim nato dodali suspenzijo magnetnih mikrokroglic s protitelesi, usmerjenimi proti antigenu CD4. Vezava protiteles, ki so del mikrokroglic, ne vpliva na viabilnost in funkcijo celic. Volumen reagenta za imunoselekcijo znaša največ $\frac{1}{4}$ volumna, v katerem smo resuspendirali celice. Sledila je ponovna inkubacija v hladilniku. Med inkubacijo smo pripravili ločevalno kolono. Najprej smo pripravili magnetno stojalo z magnetom midiMACS, na katerega smo dodali kolono LD MACS. Tako pripravljeno kolono smo omočili z 2 ml pufra za označevanje. Po 20-minutni inkubaciji smo vzorec sprali z 20 ml hladnega pufra DPBS ter centrifugirali pri 400 g 7 minut ter maksimalnem pospešku in zaviranju. Po centrifugiranju

smo resuspendirali celično usedlino v 950 μ l pufru za označevanje in celice nanesti na kolono ter hkrati začeli zbirati eluirano frakcijo. Po izteku smo dodali 1 mL 0,5-odstotnega FBS ter še dvakrat po 3 do 4 mL. Eluirano tekočino (negativno frakcijo) smo zbirali v centrifugirko pod kolono. Po izteku smo odstavili magnet in sprali kolono še s 3 ml pufru ter iztisnili limfocite v novo centrifugirko.

Za testiranje antagonistov CXCR3 receptorja smo uporabili PBMC-celice, za določanje atagonistične aktivnosti spojin na CXCR4-receptorju pa izolirane CD4⁺-limfocite T.

Izolaciji je sledila takojšnja uporaba celic za tekoči eksperiment oziroma zamrzovanje celic za nadaljnje analize. Najprej smo pripravili raztopino za zamrzovanje. Ta vsebuje 50 % celičnega medija, 30 % seruma FBS in 20 % DMSO. Hkrati smo pripravili enak volumen celične suspenzije. Raztopino za zamrzovanje in celično suspenzijo smo najprej 15 minut ohlajali na ledu. Raztopino za zamrzovanje smo dodajali v celično suspenzijo zelo počasi, po kapljicah. Celice smo zamrznili tako, da smo razdelili 5×10^6 celic v eno 2 mL-kriovialo.

Za potrebe gojenja celic smo uporabljali celični medij cRPMI: 500 mL celičnega medija RPMI-1640 smo dodali 50 mL FBS, 5 mL GlutaMAX in 500 μ L gentamicina (C = 50 μ L/mL). Celice CD4⁺-frakcije smo za gojenje pripravili v koncentraciji $0,5 \times 10^6$ /ml.

3. Določanje fenotipa celic

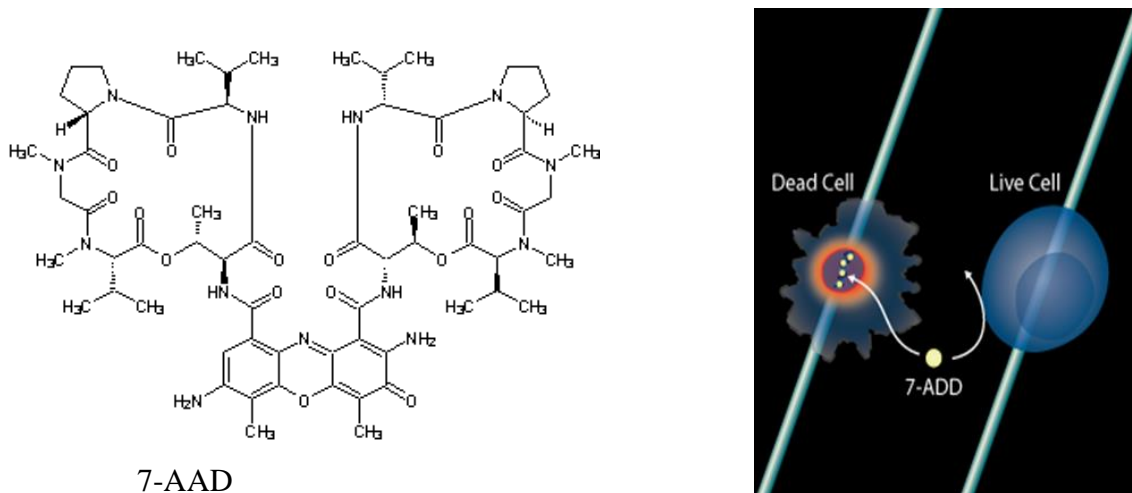
Za določanje fenotipa smo uporabili izolirane celice T tipa CD4⁺ ali celokupne PBMC. Za označevanje CXCR3 smo izvedli enojno označevanje s protitelesi, konjugiranih s fluorokromom. Za imunofluorescenčna označevanja celic uporabljamo barvila – fluorokrome, vezana neposredno na protitelesa proti zaželenemu antigenu. Za receptor CXCR3 smo vse teste izvajali na PBMC. Tako smo določili delež CXCR3 v vseh celicah PBMC. V vsako epruveto smo vnesli 100 μ l celične suspenzije. Prva epruveta je bila izotipska kontrola in v njen smo celice označili z mešanico FITC-IgG1 in R-PE-IgG2a. V drugo celično suspenzijo pa smo dodali protitelo anti-CXCR3 PE. Po označevanju smo celice pustili inkubirati 15 minut na sobni temperaturi in v temi. Nato smo celice sprali z 2mL DPBS, resuspendirali v 300 μ l in rezultate analizirali s pretočnim citometrom.

Za določanje izražanja CXCR4 na izoliranih CD4⁺-limfocitih T smo uporabili dvojno označevanje s konjugiranimi protitelesi. Tako smo želeli dokazati čistost CD4⁺-celic in tudi izražanje CXCR4-receptorja. Postopki priprave označevanja celic so potekali enako

kot za receptor CXCR3. Za barvanje smo uporabili anti-CD4⁺-FITC in anti-CXCR4-PE ter rezultate analizirali s pretočnim citometrom.

4. Test citotoksičnosti

Potencialno citotoksičnost spojin smo preverjali z določanjem števila mrtvih celic s pretočno citometrijo. Viabilnost celic smo določali s fluorescentnim barvilom 7-AAD (7-amino-aktino-micin), ki se vgradi v nukleinske kisline mrtvih celic (slika 8). 7-AAD tvori stabilen kompleks z DNA. Ima veliko afiniteto do regij v DNK, bogatih z G-C baznimi pari. Ne prehaja intaktne celične membrane, zato ne more vstopiti v žive celice.



Slika 8: Struktura 7-AAD in princip njegovega delovanja. Barvilo nemoteno prehaja poškodovano membrano mrtvih celic. Prehajanje intaktne celične membrane pri živih celicah je onemogočeno.

Za test smo najprej pripravili dve različni koncentraciji raztopine spojin (30 μ L in 150 μ L). Pripravili smo 500 μ L raztopin. Teste smo izvajali v treh ponovitvah. Nato smo pripravili 500 μ L celične suspenzije. V njej je bilo 1×10^6 celic. V vdolbinicah mikrotitrne plošče smo obe suspenziji zmešali in inkubirali 6 ur pri temperaturi 37 °C in 5 % CO₂ v inkubatorju. Sledilo je pobiranje celičnih suspenzij iz vdolbinic. Vdolbinice smo sprali še z DPBS, da smo zbrali čim več celic, in jih nato centrifugirali 5 minut pri 500 g. Supernatant smo odlili in celično usedlino resuspendirali v 200 μ L DPBS. 100 μ L smo uporabili kot neoznačeno kontrolo, preostalim 100 μ L pa dodali 1 μ L 7-AAD. Po 10-minutni inkubaciji smo izmerili odzive na pretočnem citometru.

5. Dokazovanje T-bet

T-bet je transkripcijski dejavnik, ki nadzira razvoj celic T pomagalk vrste Th1. Povezujejo ga tudi z nadziranjem proizvodnje IFN- γ , citokina, značilnega za celice Th1. Z analizo navzočnosti T-bet v celicah smo želeli dokazati navzočnost celic CD4⁺ Th1 v populaciji PBMC. Ker se T-bet izraža tudi na drugih celicah, ne le na CD4⁺, smo za dodatno kontrolo želeli dokazati še izražanje membranskega antigena CD25, značilnega za naravne regulatorne celice T CD4⁺CD25⁺ (8).

Za dokazovanje T-bet smo morali izvesti intracelično označevanje z ustreznimi protitelesi. Pripravili smo 4 epruvete. V vsako epruveto smo dali celično suspenzijo, ki je vsebovala 5×10^6 PBMC-celic. V prvi epruveti smo imeli neoznačene PBMC za kontrolo, v drugi smo celice označili s fluorescentno označenimi CD4⁺ (anti-CD4-FITC)-protitelesi, v tretji smo jih označili z anti-CD25 PE-protitelesi, v četrti pa smo opravili dvojno označevanje z anti-CD4-FITC-protitelesi in anti-CD25 PE-protitelesi. Kontrolne celice smo pustili nedotaknjene. V druge 3 epruvete smo dodali po 3 μ L fluorescentno označenih protiteles. Po 15 minutah smo dodali 2 mL DPBS v vse 4 epruvete in centrifugirali 4 minute pri 600 g. Supernatant smo previdno pobrali in usedlino resuspendirali v 500 μ L 4 % PFA. Po 30-minutni fiksaciji smo dodali 1 mL DPBS in spet centrifugirali 4 minute pri 600 g. Za nadaljnje izvajanje testa je bila potrebna permeabilizacija (prodiranje) označenih protiteles skozi celično membrano. Za to smo uporabili led in metanol. Po končanem centrifugiranju smo počasi in previdno pobrali supernatant ter celice dali na led in jih resuspendirali v 500 μ L metanola. Permeabilizacija protiteles v notranjost celic je trajala 10 minut na ledu. Nato smo sprali celice z 2 mL DPBS. Spiranje smo trikrat ponovili. Supernatant smo odpipetirali in dodali 100 μ L 3-odstotnega FBS, da bi preprečili nespecifično vezavo. Po 15 minutah smo dodali še 3 μ L anti-T-bet PE-protiteles in za 30 minut pustili v temi pri sobni temperaturi (brez luči v LAF-komori). Nato smo dodali 2 mL DPBS in centrifugirali 5 minut pri 600 g. Celice smo resuspendirali v PFA in analizirali s pretočnim citometrom.

6. Določanje IFN- γ

IFN- γ je pleiotropičen citokin, ki ga proizvajajo različni celični tipi in ima pomembno vlogo pri signaliziranju v procesih prirojene odpornosti in pridobljene imunosti. Proizvajajo ga aktivirani limfociti T CD4⁺, predvsem celice Th1, limfociti T CD8⁺ in

celice NK. Prepisovanje gena za IFN- γ je neposredno posledica aktivacije z antigenom in se pospeši z IL-2 in IL-12. IFN- γ je močan aktivator mononuklearnih fagocitov. IFN- γ vpliva tudi na izločanje kemokinov in ga večinoma proizvajajo celice Th1. Z določanjem sposobnosti PBMC celic, da proizvajajo IFN- γ , smo želeli posredno dokazati navzočnost populacije Th1 v PBMC. Proizvodnjo IFN- γ v PBMC, smo spodbudili s stimulacijo T-celičnega receptorja z uporabo umetnih antigene-predstavljajočih celic – makrokroglic (α TCR), ki imajo vezana protitelesa anti-CD2, anti-CD3 in anti-CD28 (stimulacija T-celičnega receptorja in kostimulacija s CD28).

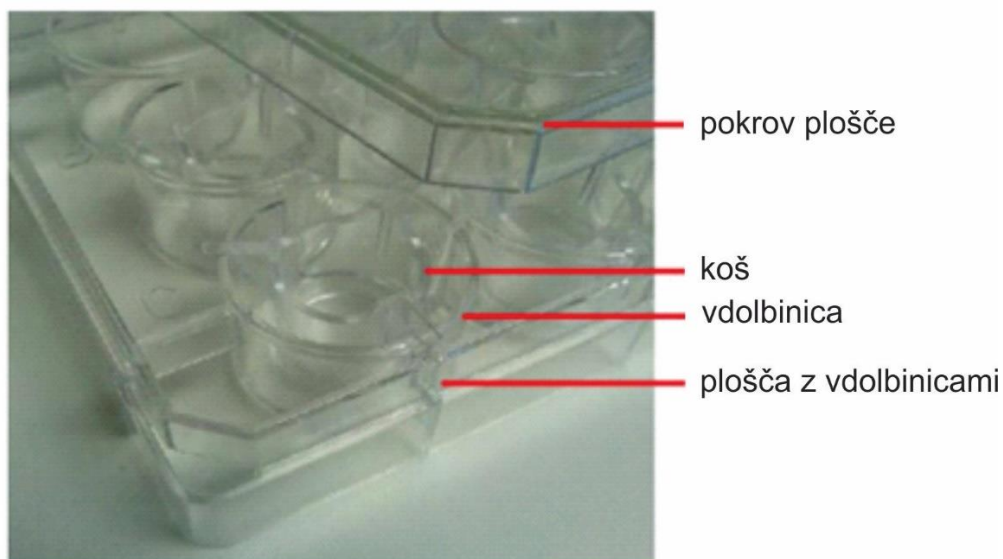
V gojilno ploščo z 48 vdolbinami smo nasadili PBMC v gostoti 1×10^6 celic/ml. Kontrolne celice smo pustili nedotaknjene, preostale PBMC pa stimulirali z reagentom za stimulacijo T-celičnega receptorja (komplet reagentov T-cell Activation/Expansion, Miltenyi Biotec). Stimulacija je potekala 48 ur v inkubatorju pri 37 °C, 5 % CO₂. Po dveh dneh so celice z dodanim reagentom tvorile karakteristične skupke, značilne za aktivirane limfocite. Celičnim kulturam smo pobrali supernatante, ki smo jih redčili v razmerju 1 : 4. Navzočnost citokinov, značilnih za vrste Th1, Th2 in Th17, smo analizirali z uporabo kompleta reagentov kroglic za pretočno citometrijo CBA Th1/Th2/Th17 (Cytometry Bead Array, BD biosciences). Z omenjenim kompletom reagentov smo lahko analizirali tudi navzočnost IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ ter IL-17A. Rezultate smo analizirali na pretočnem citometru FACSCalibur.

7. Test migracije celic »transwell«

Antagonistično aktivnost izbranih spojin smo določali s testom »transwell«, s katerim smo preverili sposobnost migracije imunskih celic, ki izražajo kemokinski receptor CXCR4 ali CXCR3, v dvoprekatni gojilni posodi s poroznim dnom prvega prekata. Antagonizem spojin smo določili na podlagi njihove sposobnosti, da inhibirajo migracijo celic, ki izražajo CXCR4, v smer koncentracijskega gradienta naravnega liganda CXCR4, kemokina SDF-1 oziroma inhibicijo migracije celic, ki izražajo CXCR3, v smer koncentracijskega gradienta naravnega liganda CXCR3, kemokina CXCL10.

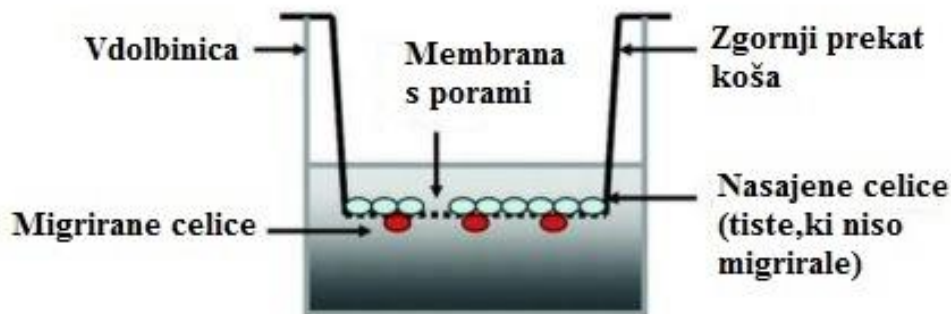
Test migracije pri kemokinskem receptorju CXCR4 smo izvajali s CD4⁺-celicami T. Za test migracije pri kemokinskem receptorju CXCR3 smo uporabili PBMC-celice na podlagi izsledkov iz literature.

Princip testa temelji na dveh prekatih, ki sta ločena s komoro s porozno membrano, skozi katero lahko celice migrirajo (slika 9). Velikost por je odvisna od velikosti celic, ki jih želimo testirati. Pomembno je, da je premer pore manjši kot premer celice, da preprečimo nespecifično migracijo celic. Naša membrana je imela pore premera 5,0 μm . To je najpogosteje uporabljena velikost za migracijske študije limfocitov. Celice nasadimo na zgornji prekat membrane tako, da migrirajo vertikalno v spodnji prekat, kjer je v gojišču kemokin. Za detekcijo in kvantifikacijo migriranih celic smo uporabili metodo števkov dogodkov na minuto. Ena celica, ki jo zazna pretočni citometer, je en dogodek. Celice smo prešteli na pretočnem citometru tako, da smo ustavili merjenje 60 sekund po začetku štetja. V spodnji prekat gojilne posode smo najprej dali 500 μL celičnega medija ter 4 μL raztopljenega proteina CXCL10 (pri CXCR3) oziroma CXCL12 (pri CXCR4). V zgornji prekat smo dali 100 μL celične suspenzije, ki je vsebovala 1×10^6 celic. Celično suspenzijo smo pripravili tako, da smo najprej pripravili 60 μL celične suspenzije in 60 μL raztopin spojina za testiranje. Raztopine spojina smo pripravili v dvakrat večji koncentraciji, ker je potem pri združevanju s celično suspenzijo prišlo do redčitve na zaželeno koncentracijo. Raztopino spojine in celično suspenzijo smo združili v vdolbinicah posode 96 wellplate ter inkubirali eno uro na 37 °C in 5 % CO_2 . Po inkubaciji smo vsako vdolbinico premešali in iz vsake prenesli 100 μL suspenzije na membrano zgornjega prekata za nastavitev testa migracije. Po pripravi smo zaprli gojitveno ploščo in jo dali za 4 ure v inkubator.



Slika 9: Fotografija plošče »transwell«; označeni so osnovni deli posode med katere spada pokrov plošče. Vsaki celični vdolbinici pripada koš katerega dno predstavlja membrana z določeno velikostjo por. Na tak način lahko s pomočjo »transwell« plošče vzpostavimo dvo-prekatni gojilni sistem.

Za pozitivno kontrolo smo uporabljali samo suspenzijo celic brez dodanih spojin. Po 4 urah smo najprej dobro sprali spodnjo stran membrane zgornjega prekata, da smo z DPBS sprali še morebitne pritrjene celice, in nato dobro premešali celice v spodnjem prekatu, da smo jih čim več prenesli v centrifugirke. Spodnje prekate smo še dvakrat sprali z DPBS in s tem pobrali preostale celice (slika 10). Sledilo je 5-minutno centrifugiranje pri 500 g. Supernatant smo odlili in celice resuspendirali v 300 μ L 3-odstotnega PFA za fiksacijo ter zaprli epruvete z zamaški in jih postavili v hladilnik do analize na pretočnem citometru.



Slika 10: Princip migracijskega testa »transwell«. Dvo-prekatni gojilni sistem plošče »transwell« nam služi za fizično ločitev preučevanih celic od spodnjega prekata. V spodnji prekat dodamo različne ligande kemokinskih receptorjev (SDF-1 v primeru preučevanja receptorja CXCR4 oz. CXCL10 v primeru CXCR3). Celice migrirajo v smer koncentracijskega gradienta kemokinov, kar jim omogoča primerna velikost por v dnu koša (v našem primeru je velikost por 5 μ m).

Da smo potrdili, da je med PBMC-celicami dovolj aktivnih celic CD4⁺ Th1, smo izvedli še dva dodatna testa: dokazovanje transkripcijskega faktorja T-bet in navzočnost citokina INF- γ . Teste smo izvajali v treh ponovitvah.

REZULTATI IN RAZPRAVA

1. Topnost

Optimalno je, da DMSO v končnem celičnem gojišču predstavlja največ 1v/v %. Mi smo izjemoma pri spojinah, ki so kazale slabšo topnost uporabili višje koncentracije DMSO, 2v/v %, ker je test citotoksičnosti trajal le 4 ure in nismo pričakovali neposrednih škodljivih vplivov DMSO na celice. Pri določanju topnosti smo celični medij najprej segreli na sobno temperaturo, da bi se izognili slabšemu raztapljanju zaradi nizke temperature medija. Topnost smo preverili po 24 urah in tako izključili možnost nadaljnega obarjanja po daljšem času. To je koristna informacija za testiranja, ki so trajala po več ur.

Vse spojine, razen spojine **39**, so bile slabo topne v celičnem mediju pri koncentraciji 100 mM, zato smo nadaljevali dvojno redčenje osnovnega alikvota spojin, dokler nismo dobili zadovoljivo topnost pri koncentracijah, prikazanih v preglednici III. Zadovoljiva topnost pomeni, da nismo opazili oborine s prostim očesom in smo dodatno potrdili odsotnost izobarjanja tudi po natančnejšem pregledu z mikroskopom.

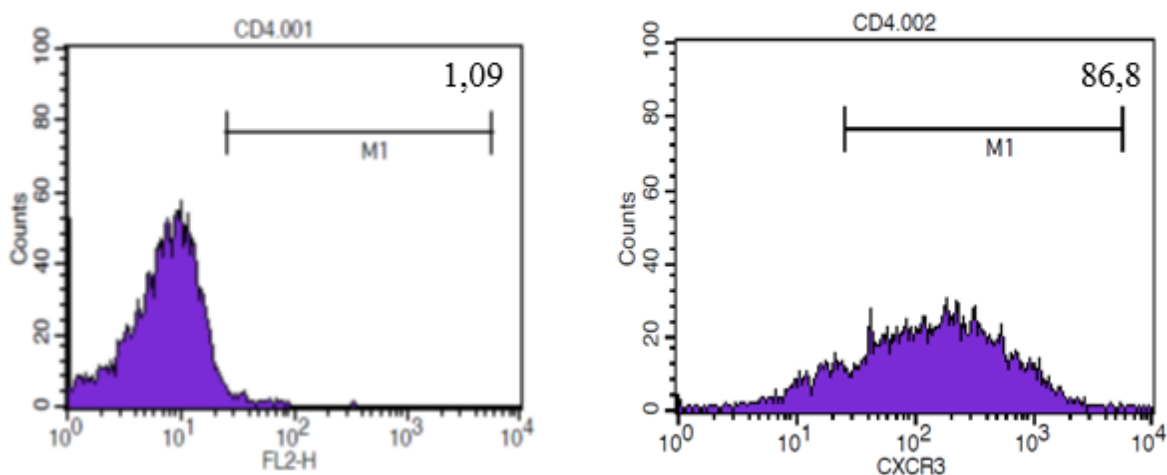
Preglednica III: Koncentracije osnovnih alikvotov spojin, pri katerih so spojine še topne pri sobni temperaturi v DMSO in tudi po dodatku 1 % v/v ali 2 % v/v alikvota v celični medij.

Spojine	CXCR3 Koncentracija [mM]	Spojine	CXCR4 Koncentracija [mM]
31	25	10	6,25
35	12,5	19	6,25
37	6,25	32	12,5
39	100	35	12,5
46	12,5	39	100
		48	6,25

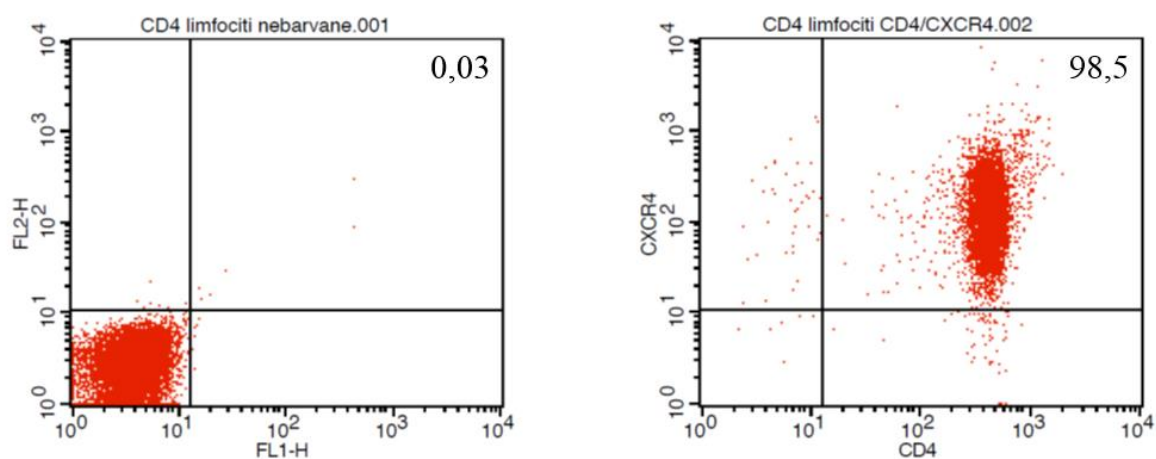
2. Določanje fenotipa celic

Po označevanju z anti-CXCR3-PE-protitelesi pri kemokinskem receptorju CXCR3 oziroma z anti-CXCR4-PE in anti-CD4⁺-FITC pri receptorju CXCR4 smo potrdili, da PBMC vsebujejo dovolj celic, ki izražajo receptor CXCR3. Pri receptorju CXCR4 smo najprej dokazali visoko čistost celic CD4⁺ po magnetni izolaciji celic CD4⁺ in nato še visoko stopnjo izražanja receptorja CXCR4 na teh celicah (slika 11).

A



B

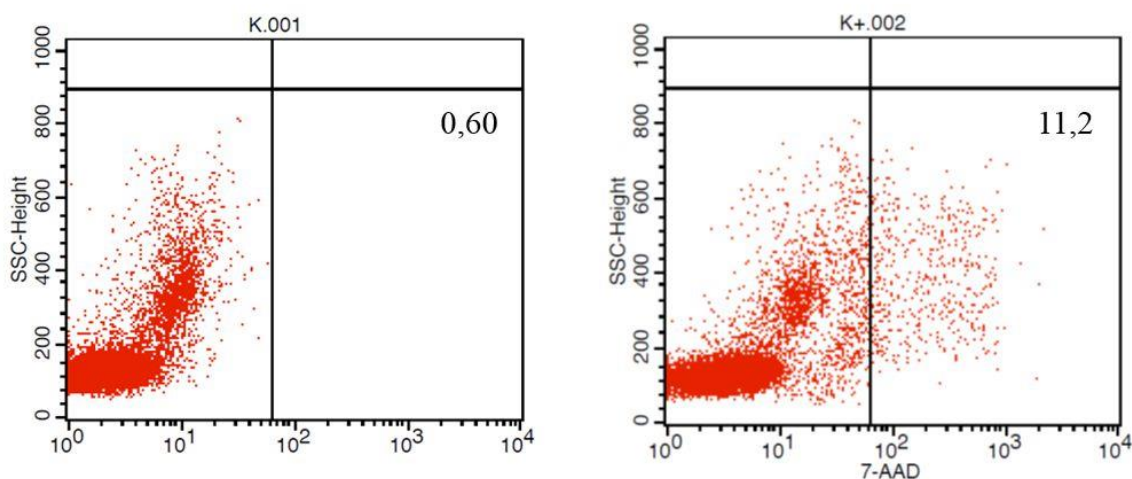


Slika 11: Določanje fenotipa PBMC in limfocitov T tipa CD4⁺; A) histogrami predstavljajo enkratno označevanje in analizo PBMC s pretočnim citometrom za receptor CXCR3; B) rezultati predstavljajo dvojno označevanje (CD4 in CXCR4) in analizo s pretočnim citometrom pri izoliranih limfocitih T tipa CD4⁺; številke v kvadrantih pomenijo odstotek označenih celic, pozitivnih za dotični označevalec

3. Test citotoksičnosti

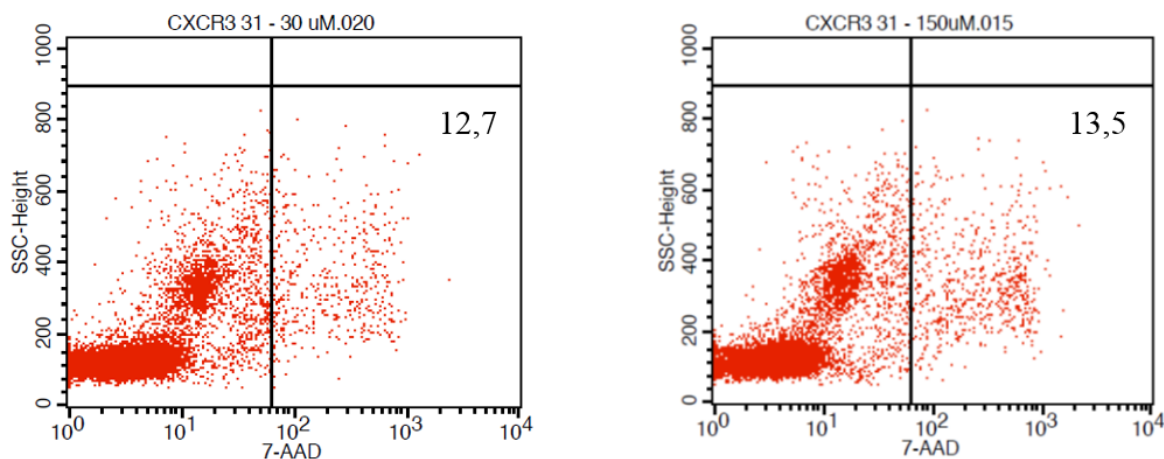
Citotoksičnost smo preverjali z dodatkom 7-AAD po inkubaciji celic s spojinami pri koncentracijah 30 in 150 μM . Za kontrolo smo uporabili celice z dodatkom DMSO (slika 12). Ta lahko pri višjih koncentracijah deluje citotoksično in ga pri določitvah ne smemo zanemariti. Teste smo izvajali v treh ponovitvah. Kvadratki pri vsakem grafu pomenijo reprezentativen rezultat treh neodvisnih meritev (slika 13, slika 14, slika 15). Zaradi biološke viabilnosti so bile minimalne razlike med rezultati. Za določitev ozadja pri pretočnem citometru smo uporabili suspenzijo neoznačenih celic.

A

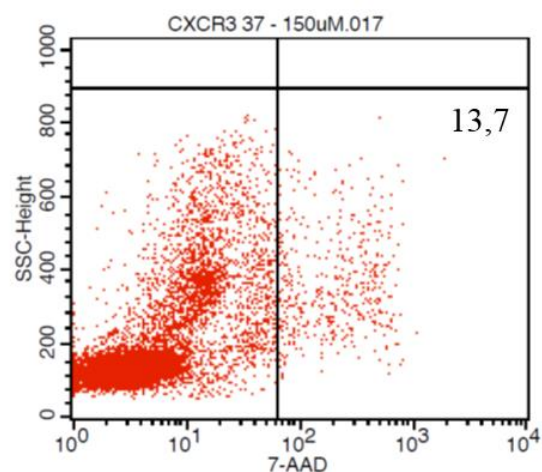
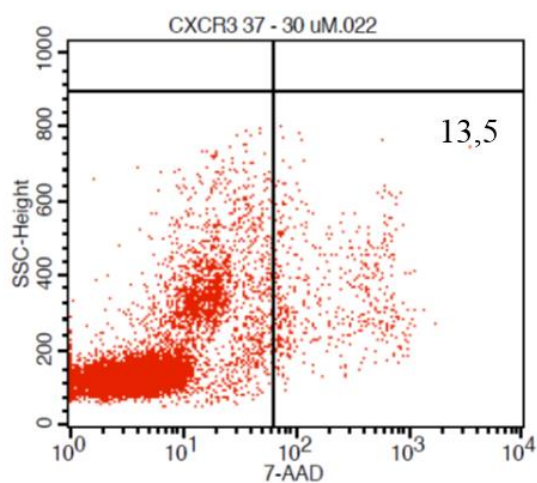


Slika 12: Citotoksičnost spojin – kontrolna vzorca; A) predstavlja določanje ozadja na pretočnem citometru (neoznačene celice, levi del) in pozitivno kontrolo z DMSO (označene s 7-AAD, desni del); številke v kvadrantih pomenijo odstotek označenih celic, pozitivnih za dotični označevalec

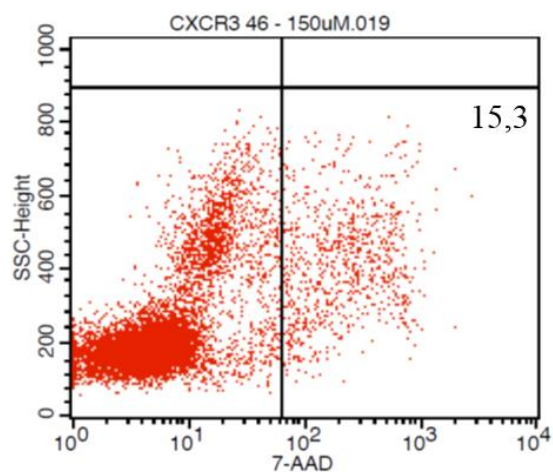
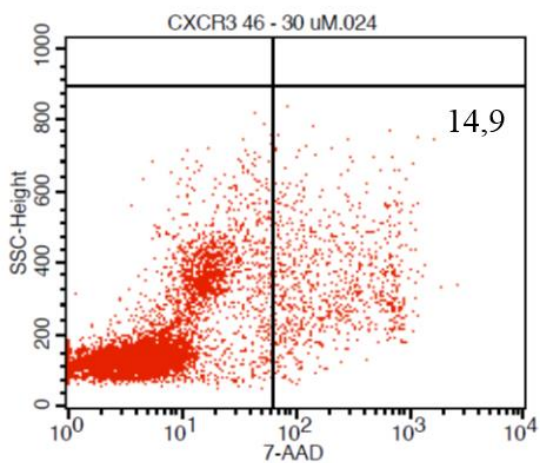
A



B

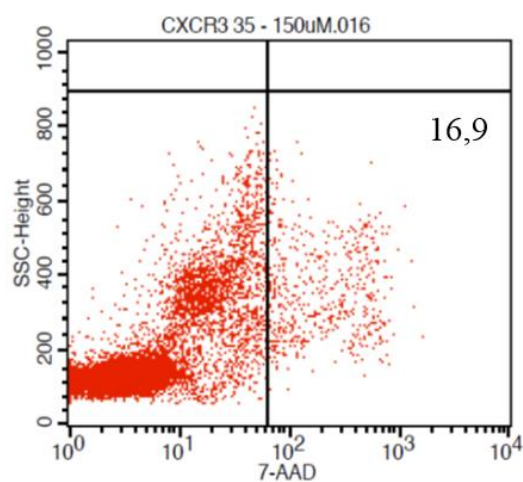
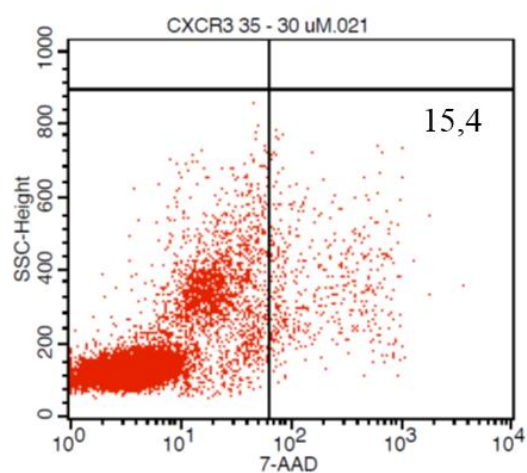


C

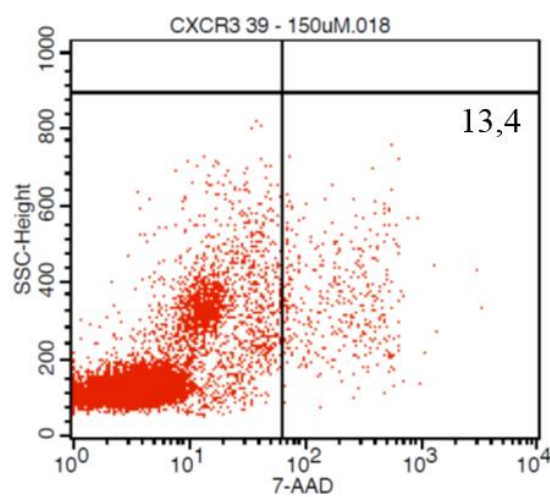
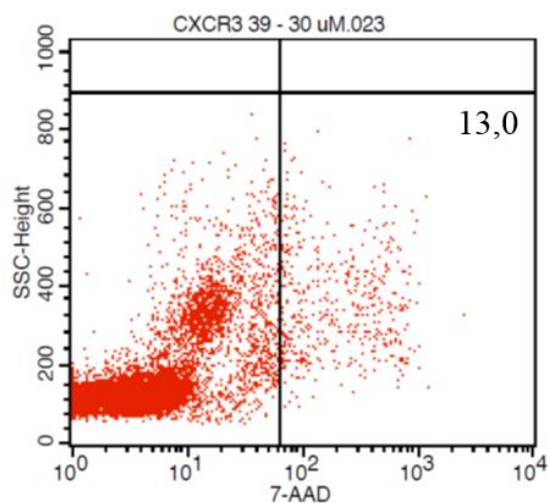


Slika 13: Citotoksičnost spojin – spojine, ki smo jih testirali izključno na CXCR3; A) predstavlja rezultate za spojino 31 pri koncentraciji 30 in 150 μM ; B) predstavlja rezultate za spojino 37 pri koncentraciji 30 in 150 μM ; C) predstavlja rezultate za spojino 46 pri koncentraciji 30 in 150 μM ; številke v kvadrantih pomenijo odstotek označenih celic, pozitivnih za dotični označevalec.

A

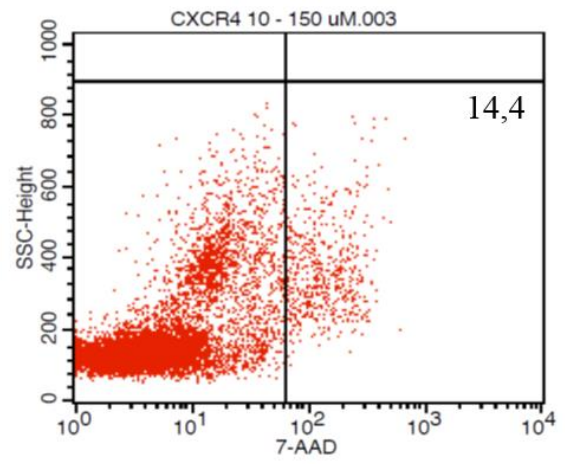
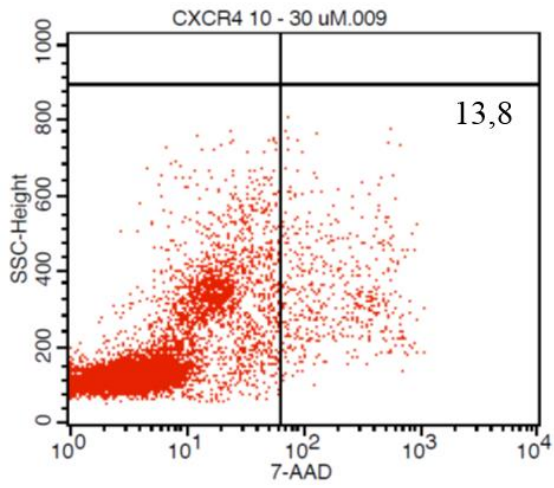


B

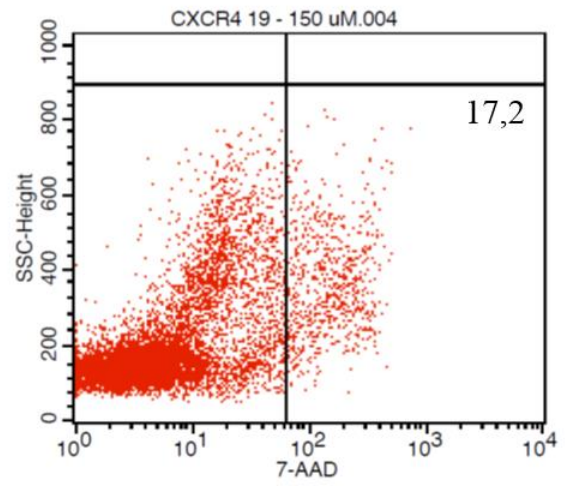
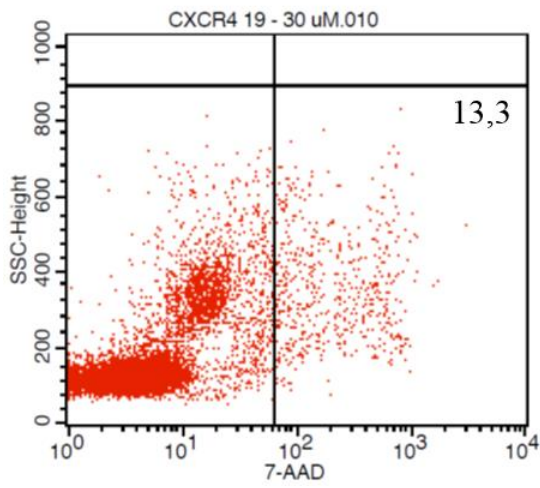


Slika 14: Citotoksičnost spojin – spojini smo testirali na CXCR3 in na CXCR4; A) predstavlja rezultate za spojino 35 pri koncentraciji 30 in 150 μM ; B) predstavlja rezultate za spojino 39 pri koncentraciji 30 in 150 μM ; številke v kvadrantih pomenijo odstotek označenih celic, pozitivnih za dotični označevalec.

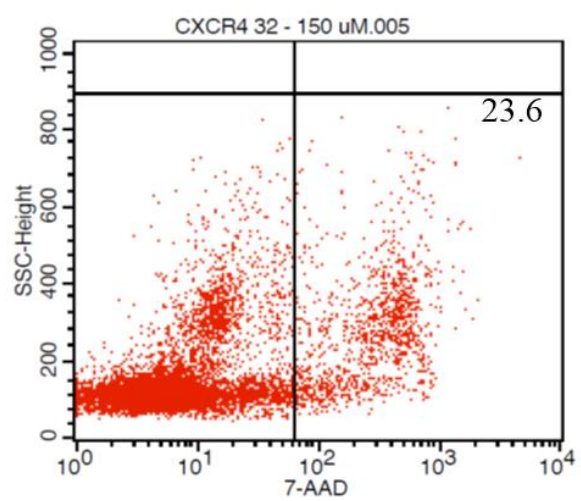
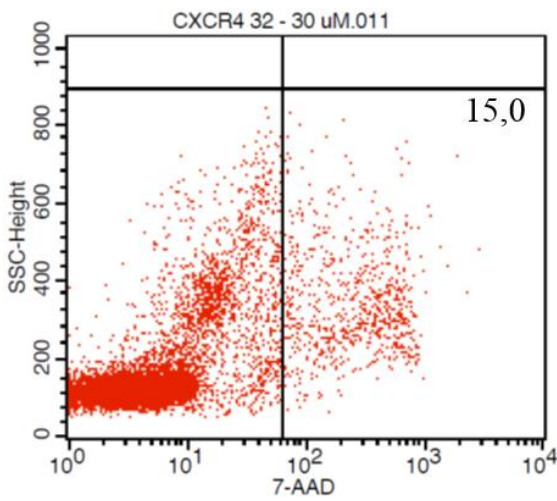
A



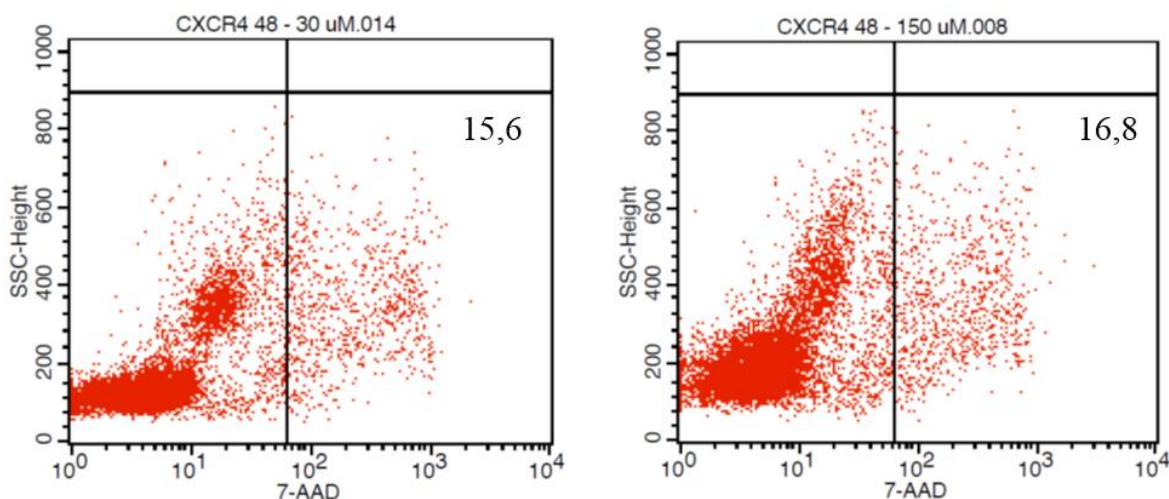
B



C



D

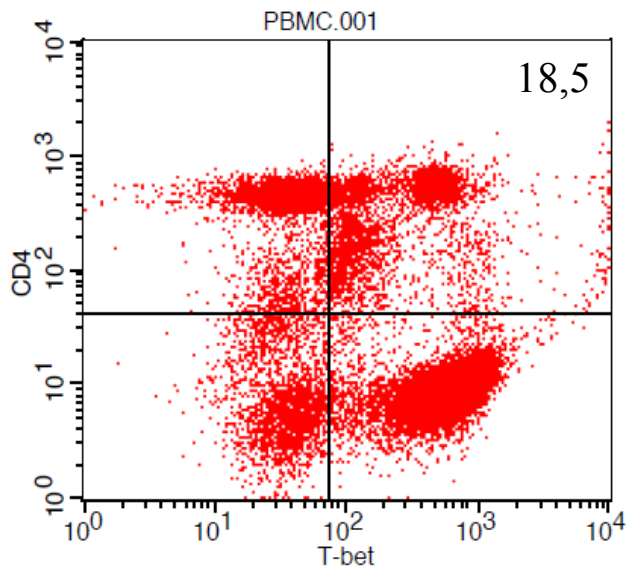


Slika 15: Citotoksičnost spojin – spojine smo testirali izključno na CXCR4; A) rezultati za spojino 10 pri koncentraciji 30 in 150 μM ; B) rezultati za spojino 19; C) rezultati za spojino 32; D) rezultati za spojino 48; številke v kvadrantih pomenijo odstotek označenih celic, pozitivnih za dotični označevalec.

Iz rezultatov lahko vidimo, da spojine v primerjavi z negativnimi kontrolami niso citotoksične. Glede na DMSO je manj odstopanja. Izjema sta spojini **19** in **32**, ki kažeta rahlo višji odstotek citotoksičnosti kot druge spojine pri koncentraciji 150 μM . Ti višji odstotki ne tako odstopajo (največja smrtnost celic je bila pri 23,6 %). Torej imajo spojine v primerjavi s kontrolnim vzorcem, tretiranim z DMSO, primerljivo citotoksičnost.

4. Dokazovanje T-bet

T-bet je transkripcijski dejavnik za CD4⁺-celice Th1. Po označevanju s protitelesi za T-bet smo celice analizirali s pretočnim citometrom, kot je opisano v poglavju o metodah (slika 16).



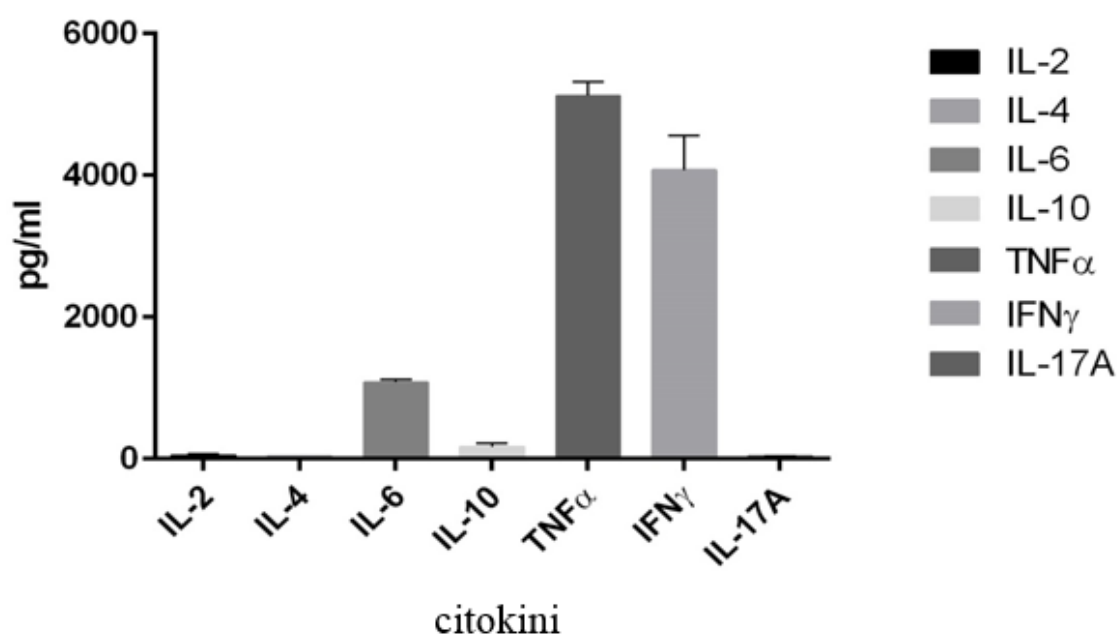
Slika 16: Rezultati določanja nivoja izražanja transkripcijskega dejavnika T-bet; celice PBMC smo analizirali s pomočjo dvojnega označevanja za CD4 in T-bet. Rezultate smo analizirali na pretočnem citometru. Številka v kvadrantu pomeni odstotek celic, pozitivnih za CD4 in T-bet.

Pomembni so rezultati v zgornjem desnem kvadrantu, torej CD4⁺-limfociti, pozitivni tudi za T-bet-protitelesa. T-bet je pomemben transkripcijski faktor pri diferenciaciji limfocitov T-pomagalk (Th1) in njihovi sintezi IFN γ . Ključen je pri uravnavanju primarnega imunskega odziva. Lahko trdimo, da celice izražajo T-bet, in s tem sklepamo o navzočnosti celic CD4⁺ Th1 v populaciji PBMC. Ker se T-bet izraža tudi na drugih celicah, ne le na CD4⁺, smo za dodatno kontrolo še dokazali izražanje membranskega antigena CD25, značilnega za naravne regulatorne celice T CD4⁺CD25⁺. T-bet je transkripcijski dejavnik, specifičen za celice Th1, ki uravnava izražanje značilnih Th1 citokinov, recimo. IFN- γ , ki ga smo določali pri naslednjem testu.

5. Dokazovanje IFN- γ

IFN- γ smo določali v celičnem supernatantu z označevanjem s specifičnimi protitelesi vezanimi na makrokroglice. Citokine smo analizirali s pretočnim citometrom in kompletom reagentov *Human CBA Th1/Th2/Th17*, kot je opisano v Metodah. S tem smo želeli pokazati, da so v populaciji PBMC celice Th1, ki lahko proizvajajo IFN- γ . Iz proizvedene količine IFN- γ lahko sklepamo o količini celic vrste Th1. Iz grafa je razvidno, da analizirane celice izločajo veliko IFN- γ in nakazujejo navzočnost celic Th1 (slika 17).

Za celice Th1 je značilen tudi citokin $TNF-\alpha$. Iz grafa se vidi, da je v zelo visoki koncentraciji (3, 53). Koncentracija IL-4 je tako rekoč nična. To je tudi dober indikator, da imamo opravka s prevladujočo populacijo celic Th1, saj je IL-4 značilen za celice vrste Th2. Enako je z IL-10 in IL-17A. Celice Th2 proizvajajo tudi IL-6. Celice Th2 aktivirajo humoralno, s protitelesi povezano imunost, IL-6 pa spodbuja proliferacijo limfocitov B. V našem primeru je v zelo nizki koncentraciji (več kot dvakrat nižja od koncentracije $IFN-\gamma$). To dokazuje, da imamo celice Th1 (3).



Slika 17: Rezultati določanja $IFN-\gamma$ in drugih citokinov (interlevkina 2 (IL-2), IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A in tumorje nekrotizirajočega dejavnika α ($TNF-\alpha$)); graf prikazuje srednje vrednosti koncentracij citokinov v supernatantu celične kulture s standardnimi deviacijami. Predstavljeni so rezultati treh neodvisnih meritev.

6. Test migracije celic »transwell«

Test migracije celic smo izvedli v dvoprekatni gojilni posodi s porozno membrano prvega prekata. Antagonizem smo določali na osnovi inhibicije migracije celic, ki izražajo izbran kemokinski receptor, v smer koncentracijskega gradienta naravnega liganda za dotični receptor. Celice smo najprej uro predinkubirali s spojinami in tako omogočili spojinam, da zasedejo ustrezna receptorska mesta.

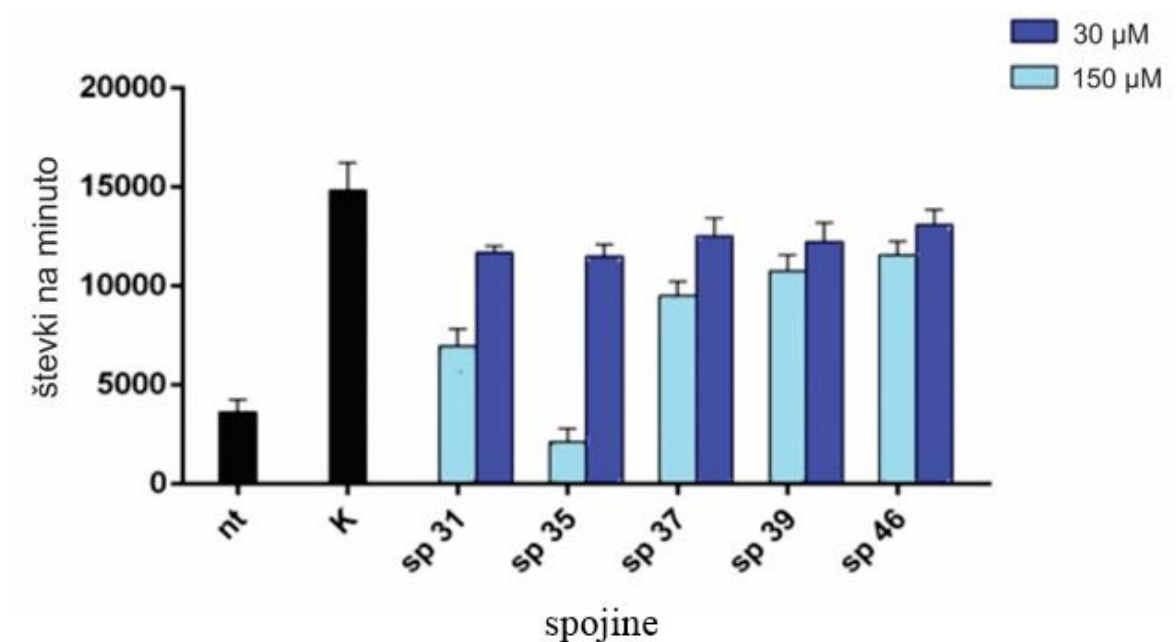
Pri testiranju spojin in njihove sposobnosti inhibicije migracije za kemokinski receptor CXCR3 smo kot kemotaktični agens uporabili CXCL10, ki predstavlja naravni ligand za receptor CXCR3. Pri preučevanju spojin v kontekstu receptorja CXCR4 smo kot naravni ligand uporabili CXCL12, ki je poznan tudi pod imenom SDF-1. Iz grafov (sliki 18 in 19) je razvidno, da antagonisti izkazujejo antagonistično delovanje na migracijo celic, kar smo prikazali v primeru obeh kemokinskih receptorjev. Kot smo pričakovali, je bila migracija celic zmanjšana v večjem obsegu pri višjih (150 μ M) koncentracijah spojin.

Če primerjamo najvišje uporabljene koncentracije spojin, izkazuje v primeru CXCR4 najboljše delovanje spojina **32**. Podobno učinkovito antagonistično delovanje smo opazili tudi pri spojinah **39** in **48**. Spojine **10**, **19** in **35** so pri koncentraciji 150 μ M prav tako izkazovale antagonistično delovanje, ki je bilo šibkejše v primerjavi s spojino **32**. Pri koncentraciji 30 μ M se je antagonistično delovanje spojin pričakovano zmanjšalo. V tem primeru je najšibkejši antagonizem izkazovala spojina **39**. Spojine **10**, **32**, **35** in **48** izkazujejo primerljiv učinek pri nižji koncentraciji. Presenetilo nas je delovanje spojine **19**, ki je pri nižji koncentraciji izkazovala podobno antagonistično delovanje kot pri 150 μ M. Pri tem lahko sklepamo, da je delovanje spojine **19** pri obeh navedenih koncentracijah doseglo maksimalen antagonističen učinek. Za podrobnejšo analizo delovanja spojine **19** bi morali opraviti dodatne teste pri večih nižjih koncentracijah, kar nameravajo storiti v prihodnosti, kjer bodo osredotočeni na izračun polovične efektivne koncentracije (EC50).

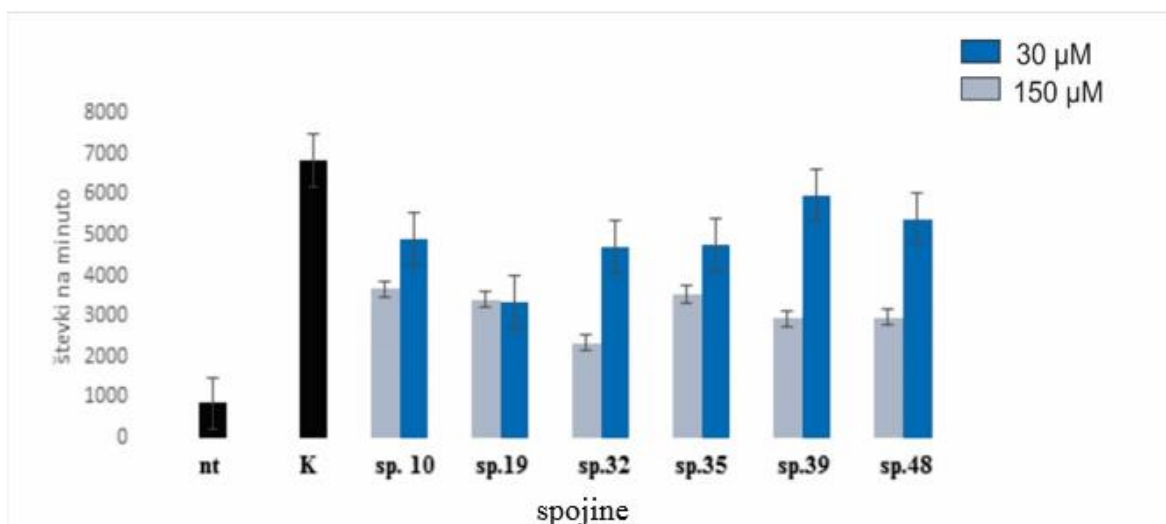
Podobno koncentracijsko odvisnost delovanja spojin smo opazili tudi pri preučevanju antagonističnega delovanja na receptor CXCR3. Pri najvišji uporabljeni koncentraciji spojin (150 μ M) je najmočnejši antagonizem izkazovala spojina **35**, ki je migracijo celic PBMC inhibirala približno 6-krat v primerjavi s pozitivno kontrolo (slika 18). Po jakosti delovanja sledi spojina **31**, pri kateri smo opazili približno 3-krat slabše antagonistično delovanje. Spojine **37**, **39** in **46** so izkazovale le blag antagonizem tudi pri najvišjih

koncentracijah. Pri nižji koncentraciji (30 μM) so vse testirane spojine izkazovale šibko in primerljivo delovanje.

Glavni razlog, zakaj smo spojini **35** in **39** uporabili pri obeh receptorjih tiči v dejstvu, da se različni kemokini lahko vežejo na iste receptorje. Ta učinek so pokazali na prejšnjih poskusih s testom cAMP na osnovi metode BRET in ugotovili, da spojina 39 deluje tudi kot negativni modulator CXCR4, med tem ko je spojina 35 pozitivni alosterični modulator na CXCR4. Želeli smo torej ugotoviti, ali spojine delujejo kot dvojni alosterični modulatorji, saj bi zaviranje obeh receptorjev bilo smiselno v primeru določenih bolezni (54).



Slika 18: Rezultati migracijskega testa v kontekstu receptorja CXCR3. Migracija celic proti kemotaktičnemu agensu CXCL10 pri dveh različnih koncentracijah spojin (potencialni antagonisti receptorja CXCR3); višina stolpičnega grafa pomeni število dogodkov (celic), zaznanih na pretočnem citometru v 60 sekundah (števki na minuto); razlaga kratic: nt = celični medij brez CXCL10, K = celični medij s CXCL10, sp = spojina



Slika 19: Rezultati migracijskega testa v kontekstu receptorja CXCR4. Migracija celic proti kemotaktičnemu agensu SDF-1 pri dveh različnih koncentracijah spojin (potencialni antagonisti receptorja CXCR4); višina stolpičnega grafa pomeni število dogodkov (celic), zaznanih na pretočnem citometru v 60 sekundah (števki na minuto); razlaga kratic: nt = celični medij brez CXCL10, K = celični medij s SDF-1, sp = spojina

Novejši pristopi raziskovanja kemokinskih receptorjev so usmerjeni v določevanje parov kemokinskih receptorjev, ki bi bili ustrezni cilji za polifarmakološke terapije. V tem smislu so že predstavili dvojne modulatorje CXCR3-CXCR4, ki so pripomogli k razumevanju mehanizma polifarmakološke inhibicije teh receptorjev (54).

Cilja v prihodnosti sta opredelitev bioaktivnih snovi, ki delujejo na več kot en receptor in njihova optimizacija. Tak primer je na primer AMD3451. Ima strukturo ciklama in v nanomolarni koncentraciji deluje kot dvojni inhibitor na CCR5 in CXCR4 s čimer se prepreči sočasni vstop R5- in X4-virusa humane imunske pomanjkljivosti (55). Druga zanimiva spojina je UCB35625, ki tudi deluje na dveh kemokinskih receptorjih, CCR1 in CCR3, in zavira receptorsko inducirano kemotakso transfektiranih celic. Ta učinek bi lahko izrabili za zdravljenje alergijskih vnetnih bolezni, kot je astma (56). Oba primera, med drugim, poudarjata pomen modulacije več kemokinskih receptorjev in prepoznavanja takšnih ligandov.

SKLEP

V sklopu magistrske naloge smo biološko ovrednotili 11 potencialnih antagonistov kemokinskih receptorjev (5 spojin s potencialnim delovanjem na receptor CXCR3 in 6 spojin s potencialnim delovanjem na receptor CXCR4).

Spojinam smo najprej določili topnost in citotoksičnost. Vse spojine so se izkazale kot primerne za nadaljnja testiranja, z upoštevanjem omejitev topnosti.

Dokazali smo izražanje transkripcijskega dejavnika T-bet na limfocitih T tipa CD4⁺. Potrdili smo še izločanje IFN- γ v populaciji celic PBMC. S temi testi smo dokazali, da lahko sklepamo o navzočnosti celic Th1 v PBMC, ki se odzivajo na ligand CXCR3 in smo jih uporabili v našem testnem sistemu. Z določanjem fenotipov kemokinskih receptorjev smo še potrdili, da izbrane celice izražajo zaželene kemokinske receptorje v visokem odstotku.

Antagonistično aktivnost smo preverili z migracijskim testom »transwell«. Vse testirane spojine so pri najvišji uporabljeni koncentraciji izkazovale antagonistično aktivnost, tako v smislu CXCR3 kot tudi CXCR4. V primeru CXCR3 je najmočnejše delovanje izkazovala spojina **35**, pri receptorju CXCR4 pa spojina **32**. V vseh primerih so spojine izkazovale koncentracijsko odvisno delovanje. Izjema je bila spojina **19**, ki je kazala podoben učinek pri obeh testiranih koncentracijah.

Kot je bilo predvideno, spojin **35** in **39** delujeta na oba receptorja, kar smo dokazali tudi v naših testiranjih. Menimo, da je to posebej zanimivo za nadaljnja raziskovanja. Bodoči cilj je, da bi odkrili še več spojin, ki delujejo na multiple kemokinske receptorje. To bi utegnilo vplivati na nove načine zdravljenja in obvladovanje hudih kroničnih bolezni. Istočasno bi na tak način sledili sodobnim trendom, kjer se razvoj antagonistov kemokinskih receptorjev počasi usmerja k iskanju spojin, ki delujejo na multiple receptorje in so primerne za polifarmakoterapijo.

VIRI

1. Rang H.P., Dale M. M., Ritter J.M., Flower R. J. and Henderson G.: Rang and Dale's Pharmacology, sedma izdaja, Elsevier Churchill Livingstone, London, 2011: 77-88, 318-35.
2. Dale M.M. and Haylett D. G.: Pharmacology condensed, druga izdaja, Elsevier Churchill Livingstone, London 2009: 42-45, 62, 106.
3. Abbas A.K., Lichtman A. H. and Pillai S.: Cellular and Molecular Immunology, šesta izdaja, Saunders Elsevier, Philadelphia 2007: 34-6.
4. Abbas A.K., Lichtman A. H. : Basic Immunology: Functions and disorders of the immune system, druga izdaja, Elsevier, Philadelphia 2006-2007: 3.
5. Burmester G.R., Pezzutto A.: Color Atlas of immunology, Thieme Publishing Group, 2003: 336.
6. Samo Ribarič, Temelji patološke fiziologije, tretja izdaja, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, 2014: 324.
7. Szabo S. J., Kim S. T., Costa G. L., Zhang X., Fathman C.G., Glimcher L. H.: A Novel Transcription Factor, T-bet, Directs Th1 Lineage Commitment. Cell 2000; 100: 655–669.
8. Lazarevic V., Glimcher L. H., Graham M. L.: T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. Nature Reviews Immunology, 2013: 11: 777–789.
9. Viola A., Luster D. A.: Chemokines and their receptors: Drug targets in immunity and inflammation. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 2008; 48: 171-97.
10. Griffith W., J., Sokol L., C., Luster A.: Chemokines and chemokine receptors: Positioning cells for host defense and immunity. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 2014; 32: 659-702.
11. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ChtxChemokineStruct.png#file>
12. Doan T., Melvold R., Viselli S., Waltenbaugh C.: Lippincott Illustrated Reviews: Immunology, druga izdaja, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2012: 1-42
13. Fernandez, J., E., Lolis, E.: Structure, Function, and Inhibition of Chemokines. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2002; 42:469–99.

14. Le Y., Zhou, Y., Iribarren, P., Wang, M., J.: Chemokines and chemokine receptors: Their manifold roles in homeostasis and disease. *Cellular & molecular immunology*, 2004; 1: 95-104.
15. Davis S., A., D., Parish R., C.: Heparan Sulfate: A Ubiquitous Glycosaminoglycan with Multiple Roles in Immunity. 2013; *Front Immunol.* 2013; 4: 470.
16. Ono S., J., Nakamura, T., Miyazaki, D., Ohbayashi M., Dawson, M., Toda M.: Chemokines: Roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2003; 6: 1185-99.
17. Fredriksson, R.; Lagerström, M. C.; Lundin, L. G.; Schiöth, H. B. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* 2003, 63, 1256-1272.
18. Rossi D., Zlotnik A.: The biology of chemokines and their receptors. *Annual Review of Immunology*, 2000: 18:217-42.
19. Vandercappellen, J.; Van Damme, J.; Struyf, S.: The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Letters*. 2008, 267, 226-44.
20. Wijtmans, M.; Verzijl, D.; Leurs, R.; de Esch, I. J.; Smit, M. J. Towards Small-Molecule CXCR3 Ligands with Clinical Potential. *ChemMedChem* 2008, 3, 861-872.
21. Busillo, J. M.; Benovic, J. L. Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 2007, 1768(4), 952-963.
22. Solari R., Pease J., E., Begg M.: Chemokine receptors as therapeutic targets: Why aren't there more drugs?. *European Journal of Pharmacology*, 2014: 746:363-7.
23. Bagri A., Gurney T., He X., Zou Y., R., Littman D., R., Tessier-Lavigne M., Pleasure S., J.: The chemokine SDF1 regulates migration of dentate granule cells. *Development*. 2002; 129(18):4249-60.
24. Saini V., Marchese A., Majetschak M.: CXC chemokine receptor 4 is a cell surface receptor for extracellular ubiquitin. *The Journal of Biological Chemistry* 2010; 285(20):15566-76.
25. Majetschak M: Extracellular ubiquitin: immune modulator and endogenous opponent of damage-associated molecular pattern molecules. *Journal of Leukocyte Biology* 2011; 89(2):205-19.

26. Ishikawa T., Nakashiro K., Klosek S., K., Goda H., Hara S., Uchida D., Hamakawa H.: Hypoxia enhances CXCR4 expression by activating HIF-1 in oral squamous cell carcinoma. *Oncology Reports* 2008; 21(3):707-12.
27. Kubic J., D., Lui J., W., Little E., C., Ludvik A., E., Konda S., Salgia R., Aplin A., E., Lang D.: PAX3 and FOXD3 Promote CXCR4 Expression in Melanoma. *The Journal of Biological Chemistry* 2015; 290(36):21901-14.
28. Domanska M., U., Kruizinga C., R., Nagengast B., W., Timmer-Bosscha H., Huls G., G.E. de Vries E., M.E. Walenkamp A.: A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: No place to hide. *European Journal of Cancer*, 2013; 49: 219-230.
29. Groß A., Brox R., Damm D., Tschammer N., Schmidt B., Eichler J.: Ligand selectivity of a synthetic CXCR4 mimetic peptide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2015; 23(14):4050-5.
30. Wang Y., Xie Y., Oupicky D.: Potential of CXCR4/CXCL12 chemokine axis in cancer drug delivery. *Current Pharmacology Reports*, 2016; 2: 1-10.
31. Ling X., Spaeth E., Chen Y., Shi Y., Zhang W., Schober W., Hail N. Jr., Konopleva M., Andreeff M.: The CXCR4 antagonist AMD3465 regulates oncogenic signaling and invasiveness *in vitro* and prevents breast cancer growth and metastasis *in vivo*. *PLoS One*, 2013; 8(3): 58426
32. Sun X., Cheng G., Hao M., Zheng J., Zhou X., Zhang J., Taichman R., S., Pienta K., J., Wang J.: CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer Metastasis Review*, 2010 29(4):709-22.
33. Cunningham A., L., Donaghy H., Harman A., N., Kim M., Turville S., G.: Manipulation of dendritic cell function by viruses. *Current Opinion in Microbiology*, 2010: 13(4):524-9.
34. Doitsh G., Galloway L. K. N., Geng X., Yang Z., Monroe K. M., Zepeda O., Hunt P. W., Hatano H., Sowinski S., Muñoz-Arias I., Greene W. C.: Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature* 2014: 505, 509-14
35. Chan D. C., Kim P. S.: HIV entry and its inhibition. *Cell*, 1998: 93(5):681-4.
36. Weiss R. A.: How does HIV cause AIDS?. *Science*, 1993: 260:1273-78.
37. Biswas P., Tambussi G., Lazzarin A.: Access denied? The status of co-receptor inhibition to counter HIV entry. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2007: 8(7):923-33.

38. <http://www.biology.arizona.edu/immunology/tutorials/aids/response.html>
[Navedeno: 10. 2.2017]. [Elektronski]
39. <http://www2.nau.edu/~gaud/bio301/content/ccr5.htm> [Navedeno: 10. 2.2017].
[Elektronski]
40. <http://www.medscape.org/viewarticle/416524> [Navedeno: 16. 2.2017].
[Elektronski]
41. Altara R., Manca M., Brandão R. D., Zeidan A., Booz G. W., Zouein F. A.:
Emerging importance of chemokine receptor CXCR3 and its ligands in
cardiovascular diseases. *Clinical Science*, 2016: 130(7):463-78.
42. Wadwa M., Klopfleisch R., Adamczyk A., Frede A., Pastille E., Mahnke K.,
Hansen W., Geffers R., Lang K. S., Buer J., Büning J., Westendorf A. M.: IL-10
downregulates CXCR3 expression on Th1 cells and interferes with their migration
to intestinal inflammatory sites. *Mucosal Immunology*, 2016: 9(5):1263-77.
43. Bernat V., Heinrich M. R., Baumeister P., Buschauer A., Tschammer N.: Synthesis
and application of the first radioligand targeting the allosteric binding pocket of
chemokine receptor CXCR3. *ChemMedChem*. 2012: 8):1481-9.
44. Ma B., Khazali A., Wells A.: CXCR3 in Carcinoma Progression. *Histology and
Histopathology*, 2015: (7):781-92.
45. Singh U. P., Venkataraman C., Singh R., Lillard J. W. Jr.: CXCR3 Axis: Role in
Inflammatory Bowel Disease and its Therapeutic Implication. *Endocrine,
Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*, 2007: 7(2):111-23.
46. Hosomi S., Oshitani N., Kamata N., Sogawa M., Okazaki H., Tanigawa T.,
Yamagami H., Watanabe K., Tominaga K., Watanabe T., Fujiwara Y., Maeda K.,
Hirakawa K., Arakawa T.: Increased numbers of immature plasma cells in
peripheral blood specifically overexpress chemokine receptor CXCR3 and CXCR4
in patients with ulcerative colitis. *Clinical & Experimental Immunology*, 2011:
163(2):215-24.
47. Baumgart D. C., Sandborn W. J.: Crohn's disease. *The Lancet*, 2012: 380: 1590-
1605
48. Yamamoto-Furusho J. K., Korzenik J. R.: Crohn's disease: Innate
immunodeficiency?. *World Journal of Gastroenterology*, 2006: 12 (42): 6751-5.
49. Cho J. H., Brant S.R.: Recent Insights into the Genetics of Inflammatory Bowel
Disease. *Gastroenterology*, 2011: 140(6):1704-12.

50. Korzenik J.: The Role of Innate Immunity in Crohn's Disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2007: 3(2): 82–83.
51. Marks D. J., Segal A. W.: Innate immunity in inflammatory bowel disease: a disease hypothesis. *The Journal of Pathology*, 2009: 214(2): 260–266.
52. Horuk R.: Development and evaluation of pharmacological agents targeting chemokine receptors, *Science Direct, Methods* , 2003: 29:369-375.
53. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Mozobil, dostopno na http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/001030/WC500030686.pdf.
54. Schoenborn R. J., Wilson B.C.: Regulation of Interferon- γ During Innate and Adaptive Immune Responses. *Advances in Immunology*, 2007: 96: 41-101.
55. Schmidt, D.; Bernat, V.; Brox, R.; Tschammer, N.; Kolb, P.: Identifying modulators of CXC receptors 3 and 4 with tailored selectivity using multi-target docking. *ACS Chem. Biol.* 2014: 10: 715-724.
56. Princen K., Hatse S., Vermeire K., Aquaro S., Gerlach L.-o., Rosenkilde M., Schwartz T. W., Skerlj R., Bridger G., and Schols D.: Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Replication by a Dual CCR5/CXCR4 Antagonist. *J. Virol.*, 2004: 78, 12996–13006.
57. Sabroe I., Peck M. J., Van Keulen B. J., Jorritsma A., Simmons G., Clapham P. R., Williams T. J., Pease J. E.: A small molecule antagonist of chemokine receptors CCR1 and CCR3. Potent inhibition of eosinophil function and CCR3-mediated HIV-1 entry. *J. Biol. Chem.*, 2000: 275, 25985–25992.