

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA SEVNIK

MAGISTRSKA NALOGA  
INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA SEVNIK

TESTNI SISTEM ZA DOLOČANJE ZAVIRALNEGA  
DELOVANJA ANTAGONISTOV RECEPTORJA DC-SIGN IN  
VITRO

ASSAY FOR DETERMINING INHIBITORY ACTIVITY OF  
DC-SIGN ANTAGONISTS IN VITRO

Ljubljana, 2013

Magistrsko nalogo sem opravljala na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (ZTM), pod mentorstvom izr. prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Urbana Švajgerja, mag. farm.

Za strokovno pomoč in usmeritve pri opravljanju magistrske naloge se zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Marku Anderluhu, mag. farm. in somentorju doc. dr. Urbanu Švajgerju, mag. farm. za nasvete, usmeritve ter strokovno pomoč pri izvajanju eksperimentalnega dela.

## **IZJAVA**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno opravila pod mentorstvom izr. prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Urbana Švajgerja, mag. farm.

Predsednik diplomske komisije: dr. Franc Vrečer, mag. farm., izr. prof.

Član diplomske komisije: doc. dr. Tomaž Bratkovič, mag. farm.

# KAZALO

1. Uvod .....	1
2. Dendritične celice .....	2
2.1 Lastnosti in delovanje DC .....	2
2.1.1 Življenjski cikel DC .....	3
2.2 Vloga dendritičnih celic v imunskem sistemu .....	3
2.3 Priprava DC in vitro .....	5
2.4 Receptor DC-SIGN.....	6
2.4.1 Struktura DC-SIGN.....	7
2.4.2 Funkcije DC-SIGN.....	9
2.4.3 Ligandi in signalizacija preko DC-SIGN .....	10
3. Virus HIV in DC-SIGN .....	11
3.1 DC-SIGN kot mehanizem za izogib imunskemu nadzoru.....	13
3.2 Interlevkini in HIV-1 .....	13
3.3 Antagonisti DC-SIGN-a .....	14
4. Namen dela.....	17
5. Eksperimentalno delo.....	18
5.1 Načrt dela.....	18
5.2 Materiali in metode.....	19
5.2.1 Konjugacija proteina gp120 s FITC .....	19
5.2.2 Osamitev monocitov z gradientnim centrifugiranjem.....	21
5.2.3 Gojenje celic.....	24
5.2.4 Priprava potencialnih antagonistov DC-SIGN-a .....	25

5.2.5	Priprava celic z antagonisti in proteinom gp120 .....	27
6.	Rezultati .....	30
6.1	Testni sistem za določanje inhibitornega delovanja antagonistov receptorja DC-SIGN .....	30
6.1.1	Vpliv različnih dejavnikov na meritve .....	30
6.1.2	Izražanje receptorja DC-SIGN na površini DC .....	31
6.1.3	Vezava proteina gp120 na DC-SIGN ob prisotnosti antagonistov .....	31
7.	Razprava.....	38
8.	Sklep.....	42

## POVZETEK

Antigen-predstavitvene celice (APC) igrajo zelo pomembno vlogo v imunskem sistemu. Vodilno vlogo pri prevzemanju različnih antigenov imajo med APC t.i. dendritične celice (DC). Slednje so zaradi njihovih edinstvenih lastnosti in vloge v imunskem sistemu poimenovali profesionalne APC. Dendritične celice so zelo učinkovite pri privzemanju in procesiranju antigenov (Ag), tako lastnih kot tujih, ter pri predstavitvi teh Ag odzivnim limfocitom T vrste CD4<sup>+</sup> in CD8<sup>+</sup>. Dendritične celice med drugim sodelujejo tudi pri vezavi in prenosu virusa HIV-1 v limfatična tkiva, kjer se HIV-1 lahko posledično prenese do limfocitov T in jih okuži. Prvi stik virusa HIV-1 z dendritičnimi celicami poteče preko lektina na njihovi površini DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin). Receptor DC-SIGN prepozna plaščni protein gp120 virusa HIV-1. Omenjena vezava vodi v internalizacijo virusa v celico na način, ki omogoča njegovo preživetje in širitev po organizmu. Zaradi omenjenih dejstev predstavlja receptor DC SIGN novo terapevtsko tarčo za razvoj in oblikovanje protivirusnih zdravil, ki bi preprečila vdor virusa HIV-1 v organizem na samem začetku infekcijskega procesa.

V magistrskem delu smo razvili in optimizirali testni sistem v in vitro pogojih, ki omogoča določanje inhibitornega delovanja potencialnih antagonistov receptorja DC-SIGN. Ovrednotili smo učinkovitost posameznih potencialnih ligandov, katerih delovanje je bilo usmerjeno na inhibicijo DC-SIGN-a, odgovornega za prenos infekcije s HIV. Učinkovitost smo ovrednotili s pomočjo pretočne citometrije. Testni sistem bomo poizkušali vpeljati kot rutinski test za določanje inhibitornih konstant sintetiziranim spojinam na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo. Tovrstne raziskave bodo pripomogle k oblikovanju potencialnih zdravilnih učinkovin za zdravljenje imunske pomanjkljivosti.

## ABSTRACT

Antigen presentation cells (APC) play a very important role in the immune system. Among APC, the so called dendritic cells (DC) have a leading role in taking over various antigens. Because of their unique properties and applications in the immune system are also known as profesional APC. DC are very efficient in adopting and processing of antigens and their presentation to responsive lymphocytes types CD4+ and CD8+. DC are also involved in binding and trasmission of HIV-1 in lymphatic tissues, where HIV-1 may be transfered to T lymphocytes and cause their infection. The first contact of HIV-1 with dendritic cells via the lectin starts on the surface of DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin). The coat protein gp120 of HIV-1 is recognized by receptor DC-SIGN and this binding leads to internalization of the virus in the way which allows its survival and expansion in the organism. Because of these facts, DC-SIGN is a new therapeutic target for the development and design of antiviral drugs, which would prevent the invasion of HIV-1 into the organism at the beginning of the process infection.

In our work a test system for the determination of potential inhibitory receptor antagonists DC-SIGN in vitro was developed and optimized. Effectiveness of potential ligands which are focused on the inhibition of DC-SIGN responsible for transmission of HIV infection was evaluated. Efficiency of the system was evaluated with flow cytometry. The test system will be used as a routin test for the determination of inhibitory constants of compounds sintetized on the Chair of pharmaceutical chemistry at the Faculty for pharmacy. The research will be used as a tool for development of potential substances for healing the immune defficiency.

**SEZNAM OKRAJŠAV**

Ag	antigen
AIDS	(ang. <i>acquired immune deficiency syndrome</i> )
APC	antigen-predstavitvena celica
CD	označevalec pripadnosti (ang. <i>cluster of differentiation</i> )
CD209	gen, ki kodira DC-SIGN
CLR	lektinski receptor tipa C (ang. <i>C-type lectin receptor</i> )
CMV	citomegalovirus
CRD	domena za prepoznavanje ogljikovih hidratov
DC	dendritične celice
DC-SIGN	»dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin«
DMSO	dimetilsulfoksid
EEE	kislinski klastri
FBS	fetalni goveji serum (ang. <i>fetal bovine serum</i> )
FDC	folikularne dendritične celice
FITC	fluorescein izotiocianat
GM-CSF	dejavnik, ki spodbuja razvoj granulocitov in makrofagov (ang. <i>granulocyte-macrophage colony stimulin factor</i> )
gp120	plaščni glikoprotein 120 virusa HIV
gp41	plaščni glikoprotein 41 virusa HIV
HCV	virus hepatitisa C
HIV-1	virus humane imunskve pomanjkljivosti (ang. <i>human immunodeficiency virus</i> )
HSV	virus herpes simpleks
ICAM	medcelična adhezijska molekula (ang. <i>intracellular adhesion molecule</i> )
Idc	nezrele dendritične celice
IFN- $\gamma$	interferon gama
IFN- $\alpha$	interferon alfa
IL	interlevkin
LC	Langerhansove celice
LFA-1	integrin (ang. <i>lymphocyte function-associated antigen-1</i> )



LL	dilevcinski motiv
LPS	lipopolisaharid
MACS	(ang. <i>magnetic-activated cell sorting</i> )
ManLam	lipoarabinomanan
MFI	srednja vrednost intenzitete fluorescence (ang. <i>mean fluorescence intensity</i> )
MNC	mononuklearne celice
PBS	fosfatni pufer (ang. <i>phosphate buffered saline</i> )
PHK	poglavitni histokompatibilnostni kompleks
RPMI	gojišče (ang. <i>Roswell park memorial institute 1640</i> )
TCR	celični receptor limfocitov T (ang. <i>T-cell receptor</i> )
TGF- $\beta$	transformirajoči rastni dejavnik beta (ang. <i>transforming growth factor beta</i> )
T <sub>H</sub>	celica T pomagalka
TLR	tollu podobni receptor (ang. <i>toll-like receptor</i> )

## 1. UVOD

V okolju, v katerem živimo, se človek vsakodnevno srečuje s številnimi patogenimi mikroorganizmi, kot so bakterije, virusi, glive in drugi potencialno nevarni paraziti. Za zaščito pred njimi se je tekom evolucije razvila vrsta učinkovitih obrambnih mehanizmov imunskega sistema, ki ga pri ljudeh lahko v grobem delimo na naravno ali prirojeno in pridobljeno ali specifično imunost. Za pridobljeno imunost je značilna antigenska specifičnost. Ta proces vključuje predstavitev antigena (Ag) s strani antigene-predstavitvenih celic (APC), posledično aktivacijo efektorskih celic, kot so limfociti T in B, razvoj celične in humoralne imunosti ter vzpostavitev imunskega spomina. APC predstavljajo specializirane celice, kot so makrofagi, limfociti B in dendritične celice (DC) (1). Prav slednje imajo največjo zmožnost aktiviranja limfocitov T, zato igrajo pomembno vlogo pri aktivaciji specifičnega imunskega odziva (2).

Dendritične celice uvrščamo med najučinkovitejše APC (3), zaradi česar jih imenujemo tudi profesionalne APC. Dendritične celice iz svojega okolja privzemajo Ag, ki jih po predelavi prenesejo v sekundarne limfatične organe. Na tem mestu jih predstavijo na svoji površini v kompleksu z molekulami poglobitnega kompleksa tkivne skladnosti (PHK – poglobitni histokompatibilnostni kompleks), kar prepoznajo Ag-specifični limfociti T (2). Poleg številnih ko-stimulacijskih molekul, ki sodelujejo pri vzpostavitvi imunskega odziva, izražajo DC na svoji površini tudi številne lektine. Med slednje spada receptor DC-SIGN, ki ga označujemo tudi s CD209 ter ga uvrščamo med lektinske receptorje tipa C (CLR–C-type lectin receptors) (3). Poglavitna vloga DC-SIGN v imunskem sistemu je, da prepozna veliko različnih mikroorganizmov, vključno z virusi, bakterijami, glivami in paraziti. Prepoznavna temelji na specifičnosti DC-SIGN-a za določene tipe oligosaharidov, kot so manozni in fukozni ogljikohidratni ostanki (4). Na tak način sodeluje DC-SIGN pri prepoznavi ter procesiranju Ag, pomembno vlogo pa ima tudi pri oblikovanju imunskega odziva. Kot adhezijska molekula sodeluje DC-SIGN tudi pri migraciji DC ter pri vzpostavitvi imunološke sinapse (3).

DC-SIGN prepozna tudi plaščni protein gp120 virusa HIV-1. Vezava virusa preko DC-SIGN sproži internalizacijo virusa v notranjost DC (3). Velik del HIV-1 je s tem

mehanizmom uničen, vendar ostane majhna količina virusa zaščiten pred gostiteljevim imunskim sistemom zaradi stabilnosti vezi med DC-SIGN-om in HIV-om (4).

Za razvoj infekcije se mora HIV-1 prenesti v limfatično tkivo, kjer pride do infekcije celic T CD4+. HIV-1 lahko ostane znotraj DC štiri dni skrit v multivezikularnih telescih. HIV-1 tako izkorišča DC kot »Trojanskega konja« za bežanje/skrivanje pred imunskim sistemom gostitelja (4).

Vezavo DC-SIGN z različnimi patogeni lahko zaviramo z antagonisti receptorja DC-SIGN. Torej gre med drugim za razvoj potencialnih antivirusnih zdravilnih učinkovin, ki bi lahko preprečile različnim patogenom vezavo na DC in njihovo širitev (5).

V ta namen so usmerili raziskave v načrtovanje in sintezo različnih antagonistov DC-SIGN, t.i. glikokonjugatov, ki se med sabo razlikujejo po strukturi, obliki in delovanju (5).

## **1.1 DENDRITIČNE CELICE**

### **1.1.1 LASTNOSTI IN DELOVANJE DC**

Dendritične celice, imenovane tudi dopolnilne oz. akcesorne celice, imajo pomembno vlogo pri delovanju imunskega sistema (1). Celice s številnimi izrastki je prvič leta 1868 odkril Paul Langerhans, misleč, da je s tehniko, ki so jo tedaj uporabljali za označevanje živčnih celic, odkril celice živčnega sistema. Kasneje so nato dognali njihovo pravo naravo in pomembnost DC v imunskem sistemu (2). Celice B in celice T posredujejo celično in humoralno imunost, kjer za svojo aktivacijo potrebujejo pomoč APC, med katerimi imajo prav DC največjo zmožnost aktivacije limfocitov T (2).

Dendritične celice na periferiji zajamejo antigenski material in to informacijo prenesejo v sekundarne limfatične organe, kjer jo predstavijo naivnim limfocitom T, pri čemer izzovejo aktivacijo antigensko specifičnih limfocitov in posledično njihovo obsežno proliferacijo (2).

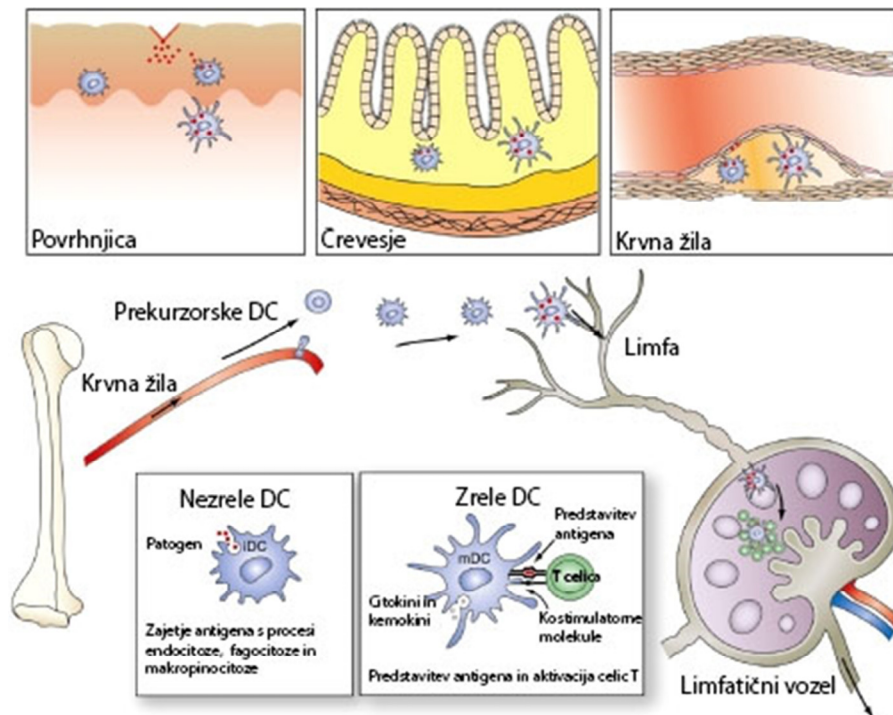
### **1.1.2 ŽIVLJENJSKI CIKEL DC**

Življenjski krog DC sestavljajo štiri stopnje:

1. progenitorne celice v kostnem mozgu,
2. prekurzorske DC: krožijo po krvi,
3. nezrele DC v tkivih, ki imajo veliko sposobnost endocitoze in fagocitoze po prepoznavi antigena,
4. zrele DC, ki so prisotne v sekundarnih limfatičnih organih, kjer ob predstavitvi Ag aktivirajo celice T in ob tem izražajo večjo količino kostimulacijskih molekul (6).

### **1.1.3 VLOGA DENDRITIČNIH CELIC V IMUNSKEM SISTEMU**

Nezrele DC so prilagojene za privzemanje antigenov (Ag), medtem ko so zrele DC specializirane za njihovo predstavljanje in aktivacijo limfocitov T. Zrele DC med vsemi APC izzovejo največjo proliferacijo limfocitov T. To lastnost jim med drugim pripisujejo zaradi sposobnosti velikega izražanja kostimulacijskih molekul, kot sta CD86 in CD80 ter ostalih, ki imajo pomembno vlogo pri aktivaciji limfocitov T, saj celicam zagotovijo signale za njihovo aktivacijo. Nezrele DC izražajo kostimulacijske molekule v precej manjšem obsegu, zato so slabi aktivatorji limfocitov T (2). Nezrele DC na periferiji s procesi fagocitoze, endocitoze in pinocitoze zajamejo Ag in ga predelajo v krajše fragmente. Predelan Ag nato po aktivaciji prenesejo v sekundarne limfatične organe, kjer dozori v zrele DC, ki izražajo večjo količino molekul PHK, znotraj katerih predstavijo Ag naivnim celicam T (slika 1) (2).

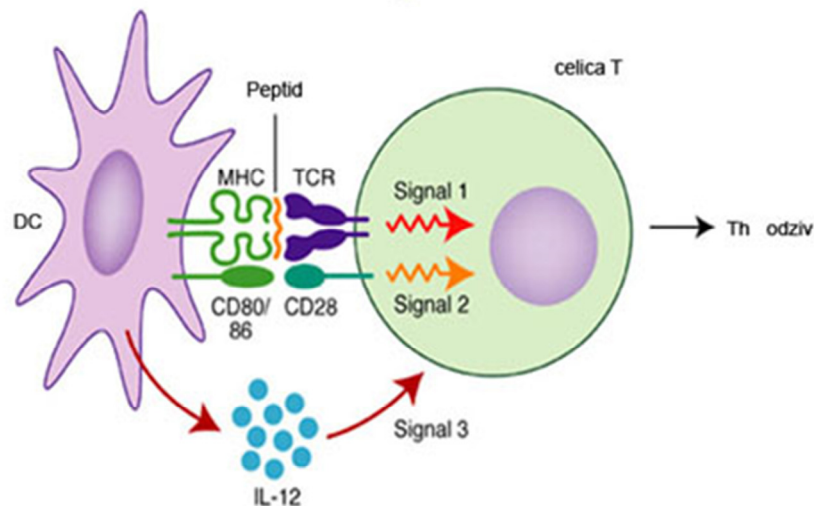


**Slika 1:** DC zajamejo Ag iz periferije in ga po krvi prenesejo do limfatičnega organa, kjer ga predstavijo celicam T (7).

Limfociti T imajo na svoji površini receptor TCR (T-celični receptor), ki spozna Ag samo, če je vezan z omenjenimi molekulami kompleksa PHK. Za aktivacijo in diferenciacijo limfocitov T v spominske in efektorske celice, med katere uvrščamo celice T pomagalke (Th) in citotoksične celice (Tc) (1), so potrebni trije signali:

1. *signal*: interakcija med molekulami poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa (PHK) na DC in TCR-jem,
2. *signal*: interakcija med kostimulativnimi molekulami (CD80/86) na površini DC z ligandi na površini T celice in
3. *signal*: izločanje citokinov iz DC ter njihovo delovanje na odzivne limfocite.

Vsi trije signali pospešujejo  $T_h$ -odzive znotraj delovanja celic T (8).



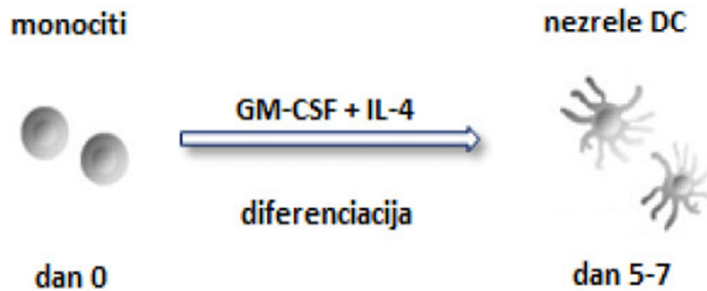
**Slika 2 (8):** Ob predstavitvi Ag (peptida) celicam T, DC sprožijo proliferacijo in aktivacijo celic T (2), v Th1-, Th2- ali Th3-odziv. Vrsta odziva je odvisna od vrste patogenov, ki sprožijo izločanje različnih interlevkinov (9).

#### 1.1.4 PRIPRAVA DC IN VITRO

Dendritične celice so prisotne v skoraj vseh tkivih, vendar je njihovo število zelo majhno, kar je dolgo predstavljalo oviro pri raziskovanju DC v terapevtske namene in na splošno. V ta namen so razvili postopke, ki omogočajo pripravo večjega števila DC in vitro. Leta 1992 so tako razvili prvo metodo za pripravo DC iz periferne krvi in kostnega mozga miši, kjer so uporabili rastni dejavnik GM-CSF. Kmalu za tem so razvili postopek za pripravo DC, pridobljenih iz progenitornih celic CD34+ (10).

Za pripravo DC in vitro uporabljamo človeške monocite, ki jih izoliramo iz venske krvi in predstavljajo najbolj razširjen in vitro model za pripravo DC. Iz monocitov se ob dodatku citokinov, kot sta IL-4 in GM-CSF, razvijejo nezrele DC, ki so po svojih lastnostih podobne mieloidnim DC v telesu. Nezrele DC so večje od monocitov in nepravilno podolgovate. Gojišča, ki vsebujejo vnetne citokine in mikrobnе produkte, omogočajo nezrelim DC zorenje v zrele kroglaste DC z izrastki, t.i. dendriti. Nezrele DC se od zrelih ne razlikujejo samo po obliki, temveč tudi po funkciji. Nezrele DC so specializirane za privzemanje Ag, medtem ko so zrele DC specializirane za predstavljanje Ag in so tako med vsemi APC celicami največji aktivatorji limfocitov T. S pomočjo pretočne citometrije lahko ugotovimo razlike v izražanju kostimulacijskih

molekul iz družine B7, kot sta CD86 in CD80 med nezrelimi in zreli DC. Izražanje kostimulacijskih molekul je v večji meri značilno za zrele DC, medtem ko jih nezrele DC izražajo manj ali nič. Kostimulacijske molekule tako vplivajo na različne funkcije DC (2).



*Slika 3: Prikaz diferenciacije DC iz monocitov v nezrele DC (11).*

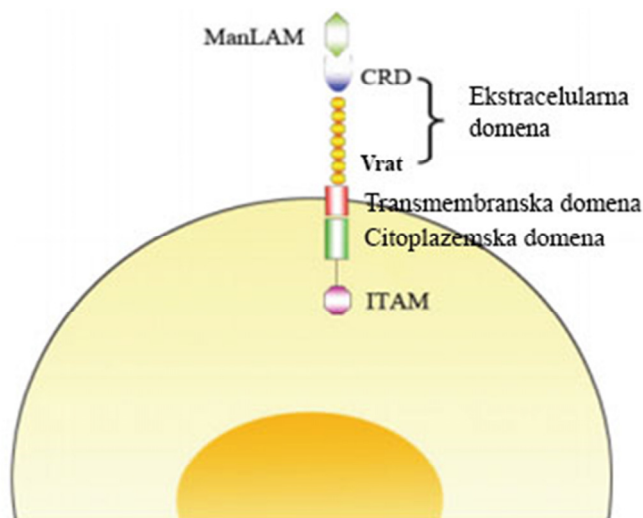
### 1.1.5 RECEPTOR DC-SIGN

Dendritične celice, pridobljene iz monocitov, na svoji površini izražajo receptor DC-SIGN (ang. *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*), to je transmembranski lektin (4), imenovan tudi CD209, ki je bil prvič odkrit v študijah virusa HIV v Ameriki (3). Izražanje receptorja DC-SIGN ni značilno za vse tipe DC, tako npr. Langerhansove celice in folikularne dendritične celice nimajo sposobnosti izražanja tega receptorja. Izražanje DC-SIGN je izrazito v nezrelih dendritičnih celicah (iDC), ki so prisotne v perifernih tkivih, prav tako ga izražajo tudi zrele ali aktivirane DC v limfatičnem tkivu (4).

DC-SIGN ima pomembno vlogo pri vezavi različnih patogenov (4) in tako predstavlja tarčo za potencialne antagoniste, ki bi inhibirali vezavo patogenov na receptor in s tem preprečili širjenje okužbe (5). V in vitro študijah DC, pridobljenih iz monocitov, se je izkazalo, da je izražanje receptorja DC-SIGN odvisno od prisotnosti IL-4 in GM-CSF, IL-4 namreč inducira izražanje DC-SIGN. Molekule, kot so interferoni IFN- $\alpha$  in IFN- $\gamma$  ter TGF- $\beta$ , pa inhibirajo izražanje DC-SIGN receptorja (4).

### 1.1.5.1 STRUKTURA DC-SIGN

DC-SIGN vsebuje domeno za prepoznavanje ogljikovih hidratov (CRD)-zunajcelična domena, ki ima globularno strukturo, vratno domeno, ki jo sestavlja 7 in pol ponovitev 23 aminokislinskih ostankov ter transmembransko domeno, ki ji sledi citoplazemska domena (slika 4) (3, 4).

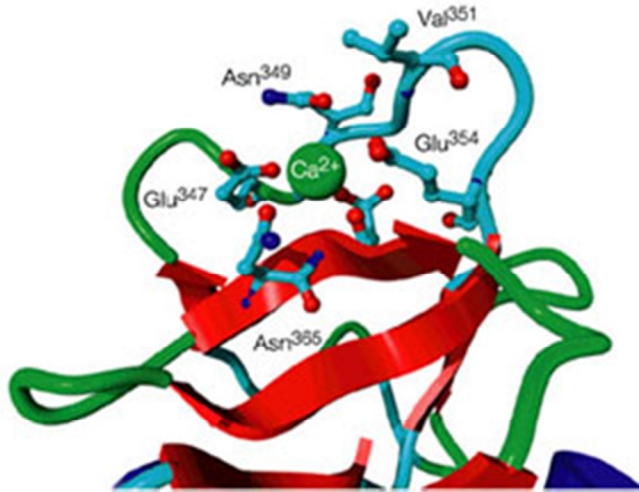


**Slika 4: Struktura DC-SIGN-a:** Citoplazemska domena, transmembranska domena in ektracelularna domena. Ektracelularna domena vsebuje vratno domeno in domeno za prepoznavanje ogljikovih hidratov (CRD) (3).

DC-SIGN vsebuje eno ali več domen za prepoznavanje ogljikovih hidratov (CRD), ki omogočajo vezavo ogljikohidratnih struktur (12).

Globularno strukturo CRD sestavljajo dva alfa heliksa, 12 beta verig in trije disulfidni mostički. Globularna struktura vsebuje tudi dve mesti za vezavo  $\text{Ca}^{2+}$  ionov, t.i. zanka, ki štrli iz površine in tvori dve vezavni mesti za  $\text{Ca}^{2+}$ , ki sta pomembni za konformacijo CRD in tvorbo koordinacijskih vezi z ogljikohidratnimi strukturami (12). Prepoznava specifičnih ogljikohidratnih struktur različnih antigenov temelji na interakciji  $\text{Ca}^{2+}$  ionov s štirimi aminokislinami (3), pri čemer gre za oktaordinirano stanje. Aminokislinski ostanki ponujajo 6 koordinacijskih vezi za  $\text{Ca}^{2+}$  in dve dodatni koordinacijski vezi, ki jih tvorijo ogljikohidratni ostanki (12).





**Slika 5: Globularna struktura CRD:** Domena za prepoznavanje ogljikovih hidratov veže ogljikohidratne ostanke kot so Lewis-x in visoko manozne ostanke, kot je npr. ManLam. Ogljikohidratni ligandi pridejo v interakcijo s Ca<sup>2+</sup> skozi hidroksilne skupine in hidrogenske vezi z aminokisljinami (Glu Asn), ki prav tako delujejo-nastopajo kot Ca<sup>2+</sup> koordinacijski ligandi (13).

Vratna domena ima pomembno vlogo pri tetramerizaciji, ki vpliva na afiniteto vezanja različnih antigenov in je odvisna od števila heličnih ponavljanj. Na tak način DC-SIGN veže oligosaharide na ovojnica virusov in membranah parazitov z visoko avidnostjo (4).

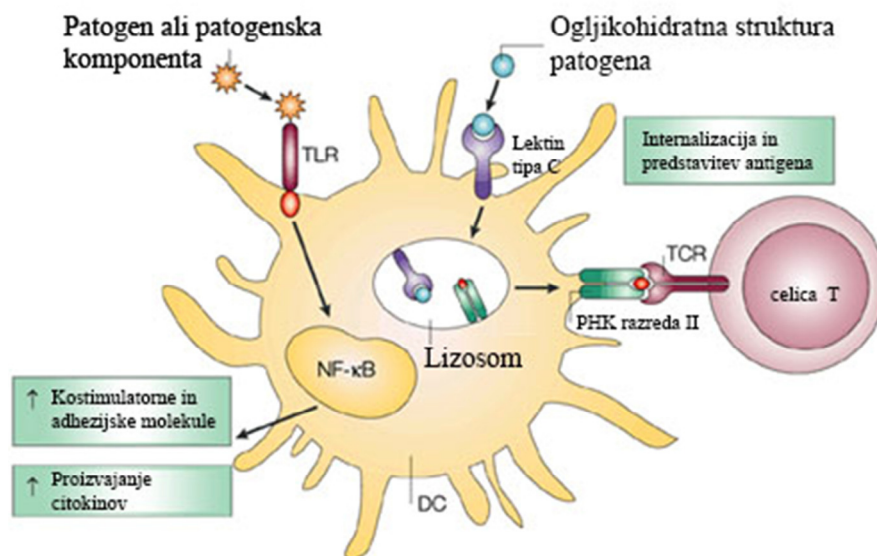
Vratna domena ima tudi vlogo pH-senzorja, afiniteta vezave do ogljikovih hidratov je odvisna od pH, ki regulira sproščanje in razgradnjo patogenov v kislem endosomalnem okolju (12).

Transmembranska domena ima ključno vlogo pri lokalizaciji DC-SIGN na površini celic (3), medtem ko citoplazemska domena vsebuje dilevcinske motive (LL) in kislinske klastre (EEE), ki sodelujejo pri prevzemanju (proteolizi) in posredovanju antigena celicam T in prenosu signalov (3, 4).

### 1.1.5.2 FUNKCIJE DC-SIGN-a

#### Privzem antigena

Bistvena funkcija DC-SIGN-a je, da omogoča internalizacijo Ag za razgradnjo, ki jih nato DC s pomočjo molekul PHK predstavijo celicam T. Zaradi tega DC-SIGN imenujemo tudi endocitozni receptor ali receptor, ki prevzema Ag. Privzem antigenov DC-SIGN-u omogočata dilevcinski motiv (LL) in kislinski klastri (EEE) v citoplazemski domeni. Ligand, ki ga veže DC-SIGN, se po endocitozi procesira v lizosomih ali poznih endosomih, procesirani delci pa se nato preko molekul PHK razreda II predstavijo celicam T (slika 6) (4).



**Slika 6:** Nezrele DC izražajo TLR-je (toll like receptor) in lektine tipa C, ki vežejo ogljikohidratne strukture različnih patogenov. Ob vezavi patogena preko TLR-ja se aktivira jedrni dejavnik NF-κB, ki vzpodbudi izražanje kostimulatornih molekul ter citokinov, medtem ko se ob vezavi patogena na lektin tipa C patogen v notranjosti internalizira in preko kompleksa PHK predstavi celicam T (14).

#### Migracija in aktivacija T celic

Osnovo delovanja DC predstavlja nenehen nadzor in zmožnost migracije (4), ki se uravnava z izražanjem adhezijskih molekul ICAM-2 in ICAM-3 na žilnem endoteliju. Povezava DC-SIGN z ICAM-2 pospešuje transmigracijo DC iz krvnih žil v limfatična

tkiva, kjer sproži imunski odziv (15). Vezava DC-SIGN z ICAM-3 omogoča prehodno adhezijo DC s celicami T, poveča stabilnost kontakta in s tem prenos kompleksa PHK-peptid celicam T (4). Interakciji DC-SIGN-a z ICAM-2 in ICAM-3 se tako medsebojno razlikujeta, na način interakcije vpliva tudi velikost molekul. DC-SIGN z adhezijsko molekulo ICAM-1 ne reagira (4).

### 1.1.5.3 LIGANDI IN SIGNALIZACIJA PREKO DC-SIGN

DC-SIGN prepozna veliko različnih mikroorganizmov, ki vsebujejo manozne ali fukozne glikane (preglednica I), kot so virusi (HIV-1, HCV, CMV, HSV), bakterije (*Helicobacter pylori*, *Micobacterium tuberculosis* in *Leptospira interrogans*), glive (*Candida albicans* in *Aspergillus fumigatus*) in številni paraziti (*Leishmania* in *Schistosoma mansoni*) (4,5). Izkazalo se je, da ima DC-SIGN visoko afiniteto za fukozo vsebujoče ogljikohidratne ostanke, kot so ostanki Lewis<sup>x</sup> (Le<sup>x</sup>). Tako močno veže lipopolisaharid (LPS) *H. pylori*, ki ima na svoji površini izražen Le<sup>x</sup>. DC-SIGN prav tako prepozna manoliziran lipoarabinomanan (ManLAM), ki je sestavni del celične stene *M. tuberculosis* (4). *M. tuberculosis* se enako kot HIV izogne lizosomski razgradnji. Prepoznavna *M. tuberculosis* s pomočjo receptorja TLR, izraženemu na DC, sproži aktivacijo jedrnega dejavnika NF- $\kappa$ B, kar privede do zorenja DC, ki se kaže kot povečano izražanje kostimulatornih molekul CD80, CD83 in CD86. Dozorevanje DC privede do proizvodnje vnetnih citokinov in aktivacije celic T. Interakcija ManLAM-DC-SIGN sproži inhibicijo dozorevanja DC in inducira izločanje citokina IL-10 in tako prepreči delovanje imunskega odziva na okužbo z *M. tuberculosis* (16). DC-SIGN prav tako interagira s proteinsko ovojnico HIV-1, le-ta se mora za razvoj infekcije prenesti iz mukozne površine in/ali krvi v limfatično tkivo, kjer okuži celice T CD4<sup>+</sup> (4).

**Preglednica I:** Mikroorganizmi, ki jih veže DC-SIGN (17).

<b>Patogen</b>	<b>Ligand DC-SIGN</b>
<i>Virusi</i>	
<b>HIV-1</b>	gp120 (visoko manoliziran)
<b>HIV-2</b>	gp120
<b>SIV-1</b>	gp120
<b>Citomegalovirus</b>	glikoprotein B
<b>Ebola</b>	glikoprotein (visoko manoliziran)
<b>Hepatitis C</b>	E1/E2
<i>Bakterije</i>	
<i>Helicobacter pylori</i>	Lipopolisaharid (Lewis-x)
<i>Mycobacteria tuberculosis</i>	ManLam (di-manoza, tri-manoza)
<i>Glive</i>	
<i>Candida albicans</i>	?
<i>Paraziti</i>	
<b>Leshmania pifanoi</b>	Lipofosfoglikan (visoko manoliziran)

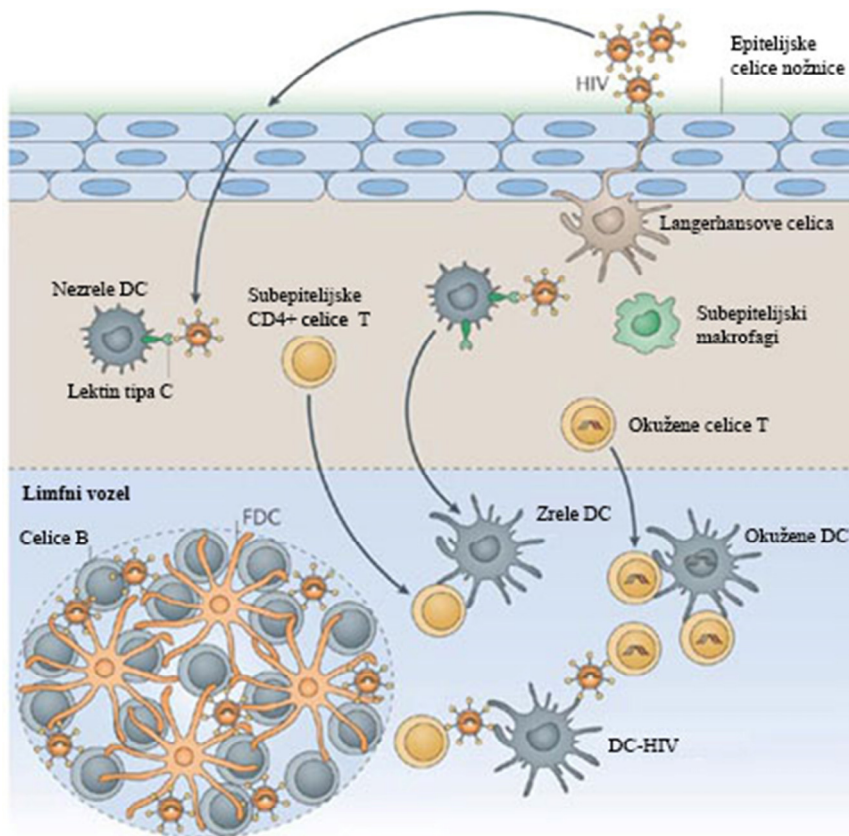
## 1.2 VIRUS HIV IN DC-SIGN

Obstajata vsaj dva tipa HIV-a: HIV-1 in HIV-2, oba tipa imata vsaj 40 % skupnega genoma, HIV-1 je bolj virulenten in povzroča večino AIDS-a po vsem svetu. Oba tipa, tako HIV-1 kot tudi HIV-2, sta člana lentivirusov, ki imajo sposobnost izmikjanja delovanju imunskega sistema in tako povzročajo bolezen z dolgo latenco (1).

Študije so pokazale, da ima DC-SIGN visoko avidnost do proteinske ovojnice gp120 virusa HIV. DC-SIGN zaščiti virus pred znotrajcelično razgradnjo, saj ne sproži procesiranja HIV-a v znatni meri in tako omogoča prenos in širjenje infekcije do limfatičnega tkiva, kjer se nahajajo celice T CD4+ (slika 7) (3). Vstop virusa v celico

omogočata glikoproteina gp120 in gp41, ki sta sestavni del virusne ovojnice. Del glikoproteina gp120 se veže na CD4+ na celični površini z močno afiniteto in na tak način pritrdi virus na celico. HIV-1 se na enak način veže tudi na določene druge celice, kot so makrofagi ter folikularne dendritične celice, ki predstavljajo rezervoar virusov v limfatičnem tkivu, kjer se HIV trajno razmnožuje (1).

Nezrele DC v perifernem tkivu so prve DC, ki srečajo vrsto različnih patogenov (med drugimi tudi virus HIV) in se ob njihovi vezavi diferencirajo v zrele DC, ki predstavijo Ag celicam T. DC-SIGN prepozna glikoproteinsko celično površino patogena, ki se internalizira in preko kompleksa PHK predstavi celicam T (5).



**Slika 7: Predstavitev virusa HIV celicam T:** Lektini tipa C, ki so izraženi na nezrelih DC, ujamejo virus HIV in ga prenesejo do limfatičnega tkiva. Med migracijo nezrele DC dozori v zrele DC, ki virus predstavijo navnim limfocitom T CD4+ (18).

### **1.2.1 DC-SIGN KOT MEHANIZEM ZA IZOGIBANJE IMUNSKEMU NADZORU**

HIV-1 je idealen primer virusa, ki izkorišča izvorno (nativno) funkcijo DC in DC-SIGN-a za infekcijo. Za razvoj infekcije se mora HIV-1 prenesti iz mukozne površine in/ali krvi v limfatično tkivo, in najpomembnejše, okužiti celice CD4+ (slika 7).

Kompleks HIV-1-DC-SIGN se preko klatrinskih jamic internalizira v endosome DC, kjer kislo okolje povzroči disociacijo ligandov iz DC-SIGN-na (4). S tem mehanizmom je velik del HIV-1 uničen, vendar zaradi stabilnosti vezi med DC-SIGN-om in HIV-om ostane majhna količina virusa zaščitena pred gostiteljevim imunskim sistemom, ki tako obdrži svojo infektivnost. HIV-1 se obdrži v DC v stanju najvišje infektivnosti več dni, skrit v multivezikularnih telescih, ki so drugačni od endosomov in lizosomov. HIV-1 tako izkorišča DC kot Trojanskega konja, da se izogne gostiteljevemu imunskemu sistemu. Signalizacija preko DC-SIGN-a je tako odgovorna za oblikovanje virusne sinapse med DC in celicam T, s katero je omogočen prenos virusa, vpliva pa tudi na zorenje DC. Stik med DC-SIGN-om in celicam T lahko izrazito poveča tudi protein Nef, ki pospeši prenos in razširjanje HIV-1, vpliva pa tudi na izražanje CD4 in PHK razreda I in s tem olajša izogib imunskemu sistemu. DC-SIGN tako s številnimi mehanizmi narekuje način okužbe s HIV-1, vse od njegovega vdora in prenosa.

V šudijah je bilo dokazano, da imajo tudi nekateri drugi patogeni verjetno podoben mehanizem okužbe (4).

### **1.2.2 INTERLEVKINI IN HIV-1**

Interlevkini imajo močan biološki učinek na funkcijo celic T (1). Ob vezavi glikoproteinske ovojnice gp120 na receptor DC-SIGN pride do sprememb v izločanju IL-10 in IL-12. Vezava gp120 namreč vpliva na proliferacijo celic CD4+, ker zmanjša izločanje IL-12 (19), ki vzpodbuja nastanek celic Th1 (1), prav tako zmanjša izločanje IL-10, ki vzpodbuja nastanek celic Th2 (19).

V študijah in vitro so dokazali pomembnost manoze na gp120, saj so ugotovili, da z encimsko razgradnjo manoznih ostankov iz gp120 z  $\alpha$  (1,2,3,6) manozidazami ne pride do sprememb v izločanju citokinov in do motenj dozorevanja DC (19).

### 1.2.3 ANTAGONISTI DC-SIGN-A

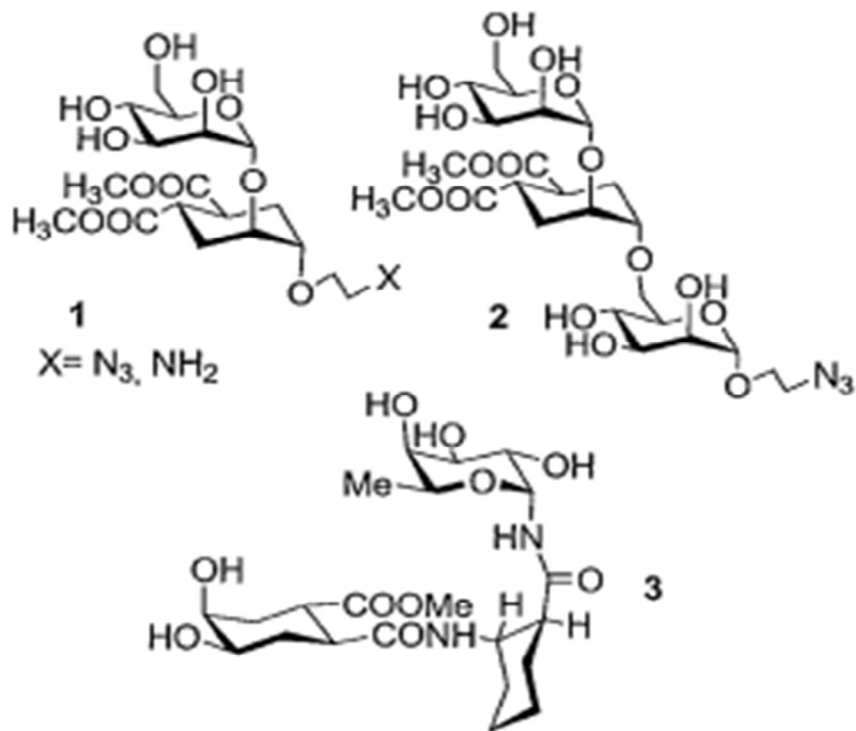
Spoznanje, da različni patogeni izkoriščajo vezavo na DC-SIGN za izogibanje imunskemu sistemu, predstavlja osnovo novih pristopov k razvoju zdravilnih učinkovin, ki bi preprečile vezavo različnih patogenov na receptor in s tem preprečile širjenje okužbe. Do sedaj še ni bila dokazana nobena klinična terapija, ki bi preprečila vezavo in širjenje okužbe (12). Možnost DC-SIGN-a kot tarče za oblikovanje antivirusnih zdravil načrtujejo z različnimi pristopi:

- inhibicija vezave patogenov z DC-SIGN-om s specifičnimi ligandi za DC-SIGN: gre za majhne molekule - antagoniste DC-SIGN-a,
- inhibicija vezave patogenov na DC-SIGN s specifičnimi ogljikohidratnimi ligandi,
- inhibicija vezave patogenov na DC-SIGN s specifičnimi ligandi/protitelesi,
- uporaba specifičnih DC-SIGN tarčnih vektorjev (12) t.i. rekombinantni adenovirusni vektorji, ki imajo veliko avidnost do receptorja DC-SIGN na DC in predstavljajo obetaven sistem za dostavo zdravilnih učinkovin, saj učinkovito stimulirajo produkcijo citokinov preko celic T CD8 (20).

Zaenkrat uporaba majhnih molekul kot so antagonisti DC-SIGN-a predstavljajo najbolj obetaven pristop, s katerim bi preprečili inhibicijo vezave patogenov na DC-SIGN (12).

DC-SIGN je bil kot tarča do danes potrjen le v in vitro eksperimentih, a je kljub temu njegov potencial visok. Načrtovanje antagonistov receptorja DC-SIGN spremlja mnogo ovir, ki vplivajo na učinkovitost antivirusnih učinkovin. Ena izmed njih je polarnost ogljikohidratov, ki vpliva na slabe farmakokinetične lastnosti potencialnih učinkovin, ter slaba afiniteta monosaharidov pri interakciji z DC-SIGN-om, ki se vežejo na DC-SIGN v milimolarnih koncentracijah (12).

Afiniteta antagonistov receptorja DC-SIGN je odvisna tudi od fukoznih ali manoznih veznih mest. Študije so pokazale, da imajo ogljikohidrati, ki vsebujejo samo manozo ali fukozo, višjo afiniteto do DC-SIGN-a, medtem ko ogljikohidrati, ki vsebujejo tako manozo in fukozo, izkazujejo slabšo afiniteto (slika 8) (5).



**Slika 8:** Prikaz antagonistov receptorja DC-SIGN: 1 in 2 - na manози osnovana liganda, 3 - na fukozi osnovan ligand (5).

Glede na to, da je mesto prvega stika, kjer se začne infekcija med HIV-1 in DC-SIGN, vaginalna mukoza, bi lahko antagonist receptorja DC-SIGN bil tisti, ki bi preprečil prenos in širjenje infekcije (12).

Obstajajo trije glavni koncepti oblikovanja selektivnih in učinkovitih antagonistov receptorja DC-SIGN:



1. oblikovanje monovalentnih glikomimetikov, ki temeljijo na DC-SIGN-vezavnih oligosaharidih,
2. multimerna predstavitev monosaharidov, oligosaharidov in glikomimetikov,
3. virtualno reševanje knjižnic spojin (12).

## 2. NAMEN DELA

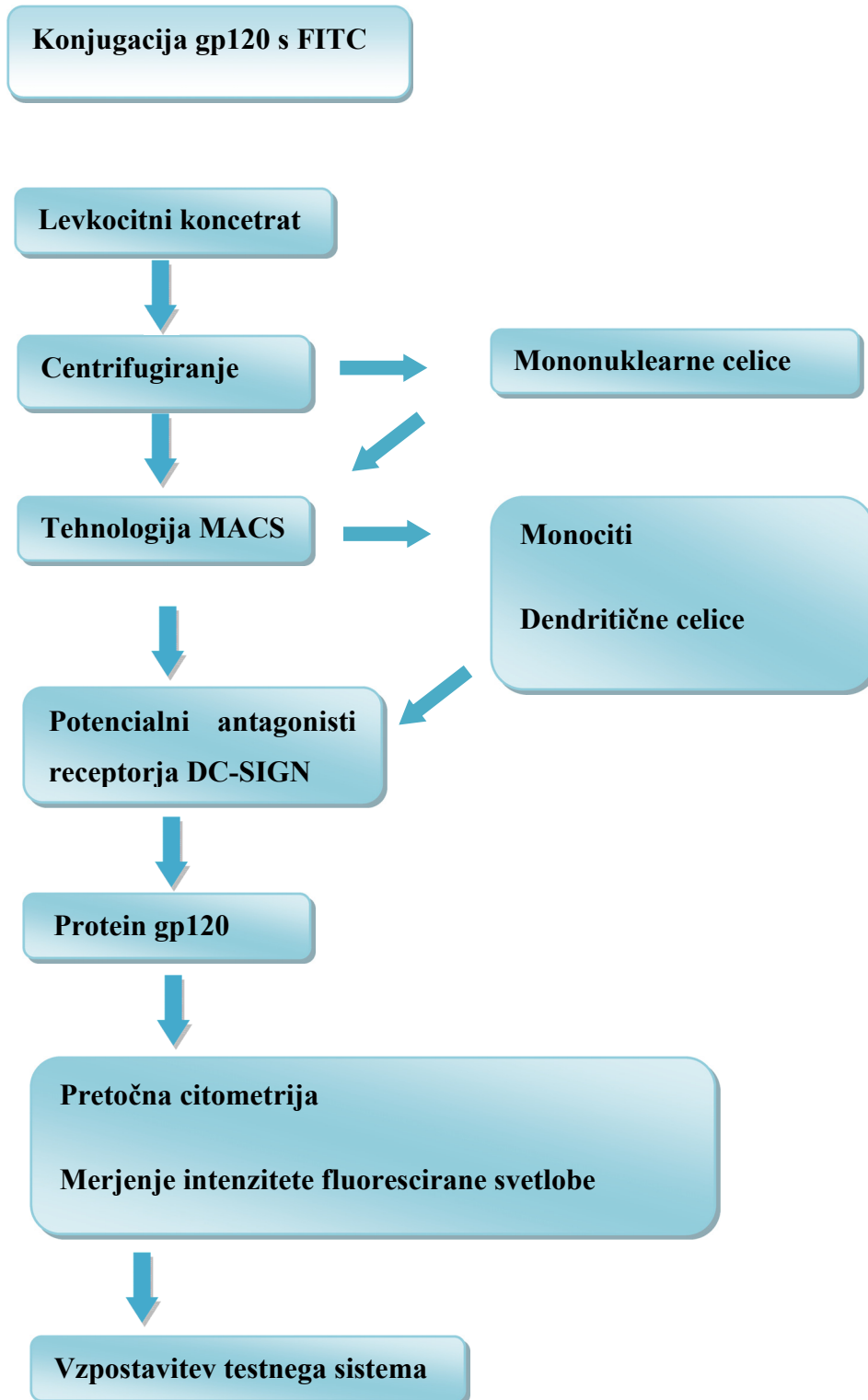
Mehanizem vezave virusa HIV na DC preko receptorja DC-SIGN predstavlja nov pristop k razvoju učinkovitejših antivirusnih zdravilnih učinkovin. Antagonisti DC-SIGN-a bi lahko preprečili okužbo s HIV v začetni fazi okužbe, kar predstavlja nov koncept preventive okužbe s HIV.

V magistrskem delu smo želeli ovrednotiti učinkovitost potencialnih antagonistov (sintetiziranih ligandov), katerih delovanje je bilo usmerjeno na inhibicijo receptorja DC SIGN. Učinkovitost sintetiziranih ligandov smo spremljali z uporabo pretočne citometrije, kjer smo s pomočjo fluorescenčno označenega proteina gp120, ki smo ga pripravili s konjugacijo s FITC, ugotovili, v kolikšni meri se je protein vezal na receptor DC SIGN ob prisotnosti ligandov.

Namen našega dela je bila vzpostavitev testnega sistema za določanje inhibitornega učinka antagonistov receptorja DC SIGN, da zavrejo vezavo glikoproteina gp120 na DC-SIGN. Testni sistem bomo poizkušali vpeljati kot rutinski test za določanje inhibitornih konstant sintetiziranim spojinam na Katedri za farmacevtsko kemijo. Rezultati tovrstnih raziskav bodo pripomogli k razvoju novih, močnejših ter učinkovitejših antagonistov receptorja DC SIGN.

### 3. EKSPERIMENTALNO DELO

#### 3.1 NAČRT DELA

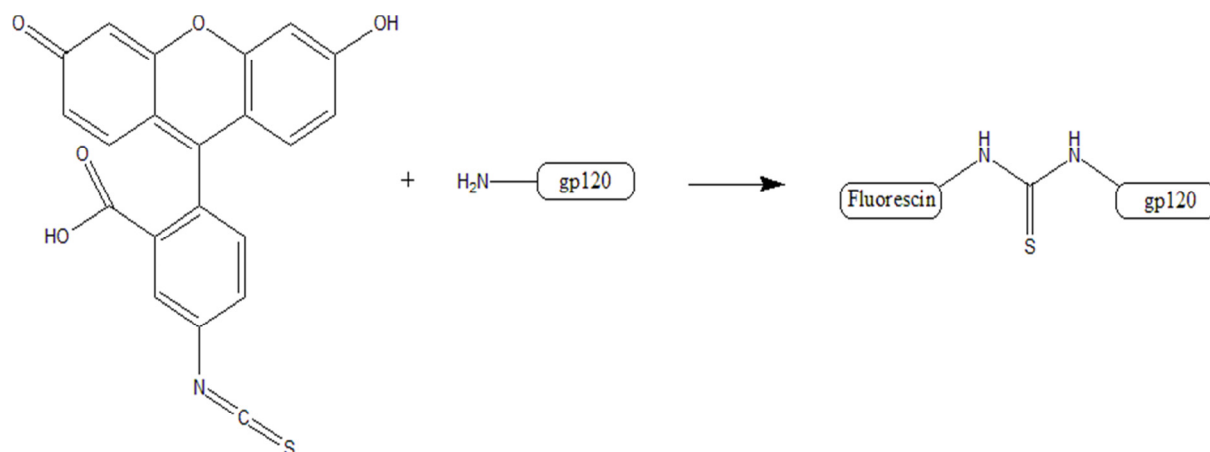


*Slika 9: Načrt dela.*

## 3.2 MATERIALI IN METODE

### 3.2.1 KONJUGACIJA PROTEINA GP120 S FITC

Za pripenjanje fluoresceina na proteine preko amino skupin splošno uporabljamo fluorescein izotiocianat, ki reagira s primarnimi amini v proteinih.



**Slika 10:** Konjugacija gp120 s FITC (17).

Glikoprotein gp120 smo konjugirali s FITC ter tako naredili označen in specifičen ligand za receptor DC-SIGN (17).

#### **Reagenti:**

- gp120 (rekombinantni plaščni glikoprotein 120 virusa HIV-1 (Immunodeficiency Virus type I gp120/SU, Recombinant Protein, Cat. No.: 11233-V08H)), ekspresijski sistem: človeške celice, proizvajalec Sino Biological Inc., Kitajska; shranjujemo pri 70 °C,
- DMSO: dimetilsulfoksid (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS) M 78,13 g/mol, proizvajalec Acros organics, Belgija,
- FITC: fluorescein izotiocianat (Cat. No 1245460250), izomer I, primeren za označevanje proteinov, M 389,38 g/mol, proizvajalec Merck KgaA, Nemčija, shranjujemo pri 2-8 °C.

**Oprema:**

- dializni komplet: dializno črevo širine 25 mm, debeline 20 $\mu$ m, MWCO: Nominal 12.000-14.000, dializni komplet ZelluTrans, proizvajalec Carl Roth, GmbH-Co.KG, Nemčija,
- steklovina: erlenmajerice, čaše in steklenice, kapalke,
- analitska tehtnica: Mettler Toledo AG245,
- magnetno mešalo,
- mešalo Vorteks: Vibromix 10,
- hladilnik,
- centrifuga: GMC-060,
- pH meter: Mettler Toledo MP220.

**Postopek**

1. **Priprava pufra Dulbecco PBS ( $CaCl_2$ ,  $MgCl_2$ ,  $KCl$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $NaCl$ ,  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ ) za redčenje s pH 9:** pH pripravljene pufra, ki smo ga uporabili za pripravo konjugiranega gp120, smo uravnali na 9.
2. **Priprava raztopine FITC v topilu DMSO:** v 6,6 ml DMSO smo raztopili 2,8 mg FITC in tako pripravili raztopino s koncentracijo 0,42 mg/ml.
3. **Priprava raztopine proteina gp120:** 50  $\mu$ g plaščnega proteina smo raztopili v 100  $\mu$ L pripravljene pufra za redčenje s pH 9.
4. **Priprava reakcijske zmesi za konjugacijo:** ob mešanju smo raztopini gp120 dodali 10  $\mu$ L pripravljene raztopine FITC.
5. **Konjugacija:** zmes smo zaradi fotolabilnosti zaščitili pred svetlobo in jo inkubirali na vodni kopeli ob rahlem mešanju pri 30 °C, 1 h.
6. **Dializa:** dializo smo uporabili za ločevanje proteina gp120, konjugiranega s fluoresceinom od preostalega nevezanega FITC, ki je difundiral skozi pore dializnega črevesa v dializni pufer. Dializno črevo smo za nekaj minut namočili v dializni pufer in ga natakneli na plastični nastavek, ga na dnu zaprli ter napolnili z raztopino konjugiranega gp120. Dializno črevo smo potopili v dializni pufer (1L) in ga zaščitili pred svetlobo. Dializa je potekala 1 h, postopek

je bilo potrebno ponoviti trikrat s svežim dializnim pufrom. Osnovno raztopino konjugiranega gp120 smo nato prenesli v plastično epruveto, z vsebnostjo izhodnega proteina 50 µg/ml.

7. ***Shranjevanje:*** raztopino označenega gp120 smo hranili zaščiteno pred svetlobo v hladilniku (2 do 8 °C) (17).

### **3.2.2 OSAMITEV MONONUKLEARNIH CELIC Z GRADIENTNIM CENTRIFUGIRANJEM**

Iz krvi treh naključno izbranih zdravih krvodajalcev smo izolirali mononuklearne celice (MNC) iz levkocitnega koncentrata (ang. *Buffy coat*), ki se je nahajal v plastični vrečki za kri.

Postopke smo izvajali v aseptičnih pogojih, v komori z laminarnim pretokom zraka (Heraeus). Laboratorijski material, reagenti in gojišča so bili sterilni. Celice smo gojili v posebnih plastičnih posodah s filtri, ki so omogočali izmenjavo plinov med gojenjem. Gojenje celic je potekalo v inkubatorju s 5 % CO<sub>2</sub> v zraku, pri temperaturi 37 °C.

#### ***Reagenti:***

- PBS (fosfatni pufer s soljo) (Lonza, Verviers, Belgium),
- raztopina fikola (Lympholyte®-H, medij za ločevanje in izolacijo monocitov iz periferne krvi) (Cedarlane laboratories, Ontario, Canada),
- FBS (fetalni goveji serum) (PAA Laboratories, Pasching, Austria).

#### ***Oprema:***

- mikropipete (1-10 µL, 1-100 µL, 100-1000 µL; Eppendorf),
- Pasteurjeva pipeta,
- nastavki za pipetiranje (Eppendorf),

- plastične centrifugirke,
- centrifugirka (BD Falcon),
- tehnologija MACS,
- inkubator (Heraeus).

### ***Postopek***

Iz levkocitnega koncentrata smo izolirali mononuklearne celice (MNC) s centrifugiranjem na gostotnem gradientu. V sterilni plastični vsebnik (200 ml) smo izlili kri iz plastične vrečke levkocitnega koncentrata in jo razredčili s pufrom PBS do volumna 150 ml. Nato smo po 25 ml razredčene krvi odpipetirali v centrifugirke, v katerih se je nahajala raztopina fikola (12,5 ml) in pufru PBS (1 ml), ki smo jo pred dodatkom razredčene krvi dobro premešali. Centrifugirke smo zaprli in centrifugirali 15 minut pri 950 vrtljajih  $\text{min}^{-1}$ . Po končanem centrifugiranju smo dobili na dnu vsake centrifugirke plast eritrocitov, sledila je plast fikola, mononuklearnih celic, na vrhu pa je bila plast plazme in pufru. Plast mononuklearnih celic, v kateri so bili monociti (gosto belo obarvano plast), smo nato iz centrifugirk previdno odstranili s pasteurjevo pipeto v nove centrifugirke, ki smo jih dopolnili s pufrom PBS do 50 ml. Paziti smo morali, da smo posrkali le gosto belo plast. Tako pripravljene mononuklearne celice smo centrifugirali 10 minut pri 1800 vrtljajih  $\text{min}^{-1}$ . Po končanem centrifugiranju smo iz centrifugirk odlili supernatant, tako da je na dnu ostala le usedlina, ki smo jo suspendirali s pufrom PBS. Usedline iz vseh centrifugirk smo združili v eno centrifugirko, ponovno suspendirali in dali centrifugirati 10 minut na 1100 vrtljajev  $\text{min}^{-1}$ . To smo ponovili še dvakrat z namenom odstranitve trombocitov, fikola in plazme.

### **3.2.3 IZOLACIJA MONOCITOV S TEHNOLOGIJO MACS**

S centrifugiranjem smo torej izolirali mononuklearne celice (MNC), ki so med drugim vsebovale tudi monocite, ki smo jih naknadno izolirali s pomočjo metode MACS (Miltenyi Biotec).

## **Tehnologija MACS**

Tehnologija MACS je sestavljena iz dveh ključnih komponent: mikrosfer in kolon. Na mikrosfere so vezana specifična monoklonska protitelesa, ki se vežejo na markerje na celični površini. Mikrosfere so biorazgradljive in niso toksične. Kolona MACS vsebuje matriks, sestavljen iz feromagnetnih kroglic. Kadar jih postavimo na magnetni separator, sfere povečajo magnetno polje. Mikrosfere in kolona torej omogočajo ločevanje celic, ki so označene z magnetnim materialom pod vplivom magnetnega polja (21).

### ***Postopek***

Pripravili smo pufer, ki je vseboval raztopino PBS in FBS, s katerim smo suspendirali izolirane celice. Po dodatku mikromagnetkov, smo suspenzijo za 20 minut prenesli v hladilnik. Nato smo celice sprali s PBS in centrifugirali, po končanem centrifugiranju pa smo usedlino ponovno suspendirali s pufrom.

Pripravili smo aparat MACS, na katerega smo položili magnet z nastavkom, v katerega smo vstavili kolono. Pod kolono smo postavili vsebnik, v katerega se je izlival odpad. Kolono smo navlažili s pufrom in počakali, da je pufer skozi kolono iztekkel v odpadni vsebnik. Pripravljeno suspenzijo celic smo dali na kolono, potem pa smo trikrat dodali pufer PBS z namenom spiranja neoznačenih celic v odpadni vsebnik. Kolono smo odstranili iz magneta, vsebnik, v katerem je bil odpadni material, pa smo zamenjali s čistim vsebnikom. V koloni, kjer so se nahajale tarčne celice, smo slednje sprali z gojiščem RPMI tako, da smo bat, ki je vseboval omenjeno gojišče, potisnili v kolono in tako izprali monocite. Sledilo je centrifugiranje pet minut pri 1200 vrtljajih  $\text{min}^{-1}$ . Po končanem centrifugiranju smo supernatant odlili, celice pa suspendirali s pufrom.





*Slika 11: Tehnologija MACS z magnetom in kolono (22).*

### 3.2.4 GOJENJE CELIC

#### ***Reagenti:***

- gojišče RPMI (Camberx, East Rutherford, NJ, USA),
- FBS (fetalni goveji serum) (PAA),
- IL-4 (citokin) (Peprotech, London, UK),
- GM-CSF (dejavnik, ki spodbuja razvoj granulocitov in makrofagov) (Peprotech, London, UK).

#### ***Oprema:***

- gojitvene posodice s filtri,
- inkubator (Heraeus).

#### ***Postopek***

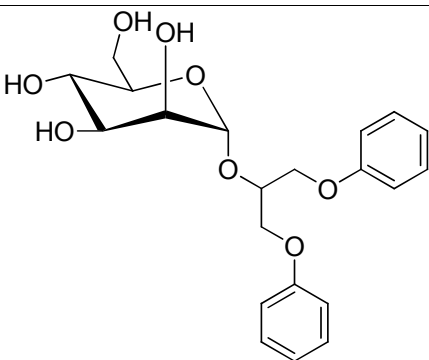
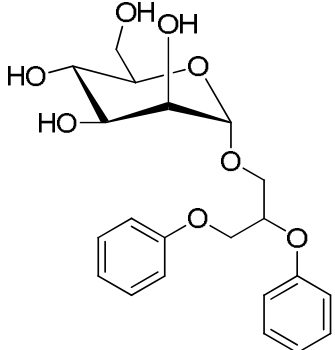
Monocite smo gojili v posodicah s filtri, ki omogočajo izmenjavo plinov med gojenjem. Izolirane celice smo prenesli v dve gojitveni posodici, v vsako posodico smo dodali

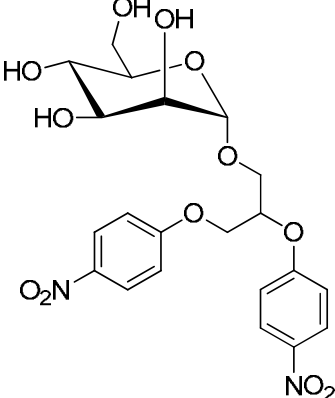
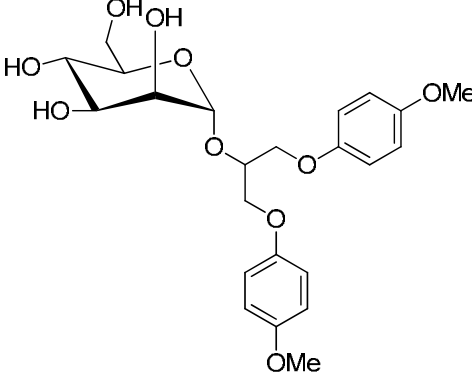
gojišče RPMI in FBS. Na koncu smo dodali še IL-4 in GM-CSF ter tako pripravljene gojitvene posodice postavili v inkubator (37 °C). Čez dva dni smo polovico medija zamenjali z novim medijem in dodali enako količino citokinov. Iz monocitov so se diferencirale DC.

### 3.2.5 PRIPRAVA POTENCIALNIH ANTAGONISTOV DC-SIGN-A

Uporabili smo potencialne antagoniste DC-SIGN-a, ki so jih sintetizirali na Fakulteti za farmacijo, Katedra za farmacevtsko kemijo: UL-TSZ-19, UL-TSV-06, UL-TSV-07 in UL-TSV-15 (preglednica II).

*Preglednica II:* Ligandi DC-SIGN receptorja.

Ime	Struktura	MW (g/mol)	m [mg]
UL-TSZ-19		406.43	5,18
UL-TSV-06		406.43	4,83

UL-TSV-07		496.42	5,04
UL-TSV-15		466.48	5,18

**Reagenti:**

- DMSO

**Oprema:**

- vibracijski mešalnik,
- mikrocentrifugirke,
- centrifugirke,
- mikrotitrne ploščice,
- mikroskop (Nikon Eclipse TE300, Tokyo, Japan),
- mikropipete (1-10  $\mu\text{L}$ , 1-100  $\mu\text{L}$ , 100-1000  $\mu\text{L}$ ; Eppendorf).

**Postopek**

Pred uporabo potencialnih antagonistov smo preverili njihovo topnost. Sintetizirane ligande smo raztopili v DMSO, volumen, ki je bil potreben za raztapljanje posameznega

liganda smo izračunali iz podatkov v tabeli. Tako pripravljene raztopljene ligande v epicah smo naslednji dan prenesli v šest manjših centrifugirk, kamor smo dodali gojišče RPMI in dali na mešalo. Opazili smo, da je bila prisotna manjša oborina pri ligandu TSV-07, ostali ligandi so bili dobro topni. Vsak raztopljeni ligand smo iz centrifugirk prenesli v mikrotitrsko ploščico z vdolbinami, nato pa smo s pomočjo mikroskopa preverili prisotnost kristalov v posamezni raztopini ligandov. Zaradi netopnosti in prisotnosti kristalov, liganda UL-TSV-07 nismo uporabili za nadaljnje raziskave.

### **3.2.6 PRIPRAVA DC Z ANTAGONISTI IN PROTEINOM GP 120**

#### ***Reagenti:***

- gojišče RPMI (Camberx, East Rutherford, NJ, USA),
- PBS (Lonza, Verviers, Belgium),
- Protitelo H200 (DC-SIGN/DC-SIGNR antibody) (Santa Cruz Biotechnology, USA)

#### ***Oprema:***

- mikropipete (1-10  $\mu$ L, 1-100  $\mu$ L, 100-1000  $\mu$ L; Eppendorf),
- centrifugirke,
- epruvice.

#### ***Analizator:***

- pretočni citometer.

***Postopek***

Celice smo iz gojišča s pipeto prenesli v centrifugirko in centrifugirali devet minut pri 1400 vrtljajih  $\text{min}^{-1}$ . Supernatant smo odlili v posodico za odpad, celice v centrifugirki pa smo resuspendirali z medijem RPMI in ponovno centrifugirali sedem minut pri 1400 vrtljajih  $\text{min}^{-1}$ . Supernatant smo zopet odlili v posodico z odpadom in celice suspendirali s pufrom PBS.

V naslednjem koraku smo pripravili šest epruvetk (dve paraleli po tri epruvetke, ena paralela je ustrezala 500  $\mu\text{M}$ , druga paralela pa 100  $\mu\text{M}$  koncentraciji). V vsako epruvetko smo dodali ligande (potencialne antagoniste DC-SIGN-a), pufer in celice. Na koncu smo pripravili še tri kontrole in sicer: protitelo H200 (pozitivna kontrola), kontrola gp120 ter neoznačene DC. Vsebinsko smo suspendirali in inkubirali 1 h v temi, na sobni temperaturi.

Po inkubaciji smo v vse vzorce, razen v neoznačene DC, dodali protein gp120 ter inkubirali 0,5 h. Po inkubaciji smo dodali pufer PBS v vsako epruvetko in centrifugirali tri minute pri 2100 vrtljajih  $\text{min}^{-1}$ . Po končanem centrifugiranju smo supernatant odlili in vsebinsko suspendirali s pufrom PBS. Tako pripravljene vzorce smo analizirali s pretočnim citometrom.

**3.2.6.1 Pretočna citometrija**

Pretočna citometrija je tehnika, s katero merimo in analiziramo lastnosti posameznih celic, ki v suspenziji druga za drugo potujejo skozi pretočni citometer in jih osvetljujemo z ozkim snopom laserske svetlobe. Ko svetlobni žarek zadane ob celico, se le-ta lomi, odbije ali pa se absorbira v fluorkrom. Vzorec z vezanim fluorokromom nato oddaja svetlobo daljše valovne dolžine (23).

Pretočni citometer ima lahko različne fotodetektorje, mi smo uporabili pretočni citometer s fluorescenčnim detektorjem, ki meri svetlobo večjih valovnih dolžin od vzbujevalne svetlobe. Signal, ki ga oddaja fluorokrom, izmeri fluorescenčni detektor, ki sprejme svetlobo določene valovne dolžine. Fotodetektor tako pretvori svetlobne

signale v električne signale, ki jih računalnik obdela in poda v obliki histogramov, kjer torej dobimo podatke o moči fluorescenčnih signalov (24).

## **4. REZULTATI**

### **4.1 TESTNI SISTEM ZA DOLOČANJE INHIBITORNEGA DELOVANJA ANTAGONISTOV RECEPTORJA DC-SIGN**

Za vzpostavitev testnega sistema za določanje inhibitornega delovanja antagonistov receptorja DC-SIGN smo uporabili metodo pretočne citometrije. Z uporabo fluorescenčno označenega rekombinantnega proteina gp120 smo raziskovali inhibicijo vezave proteina ob prisotnosti potencialnih antagonistov receptorja DC-SIGN. Kot naravni ligand smo torej uporabili gp120, ki smo ga predhodno konjugirali s FITC. S pomočjo pretočne citometrije smo izmerili intenziteto fluorescence, ki je odvisna od količine vezanega označenega gp120 na DC preko DC-SIGN-na.

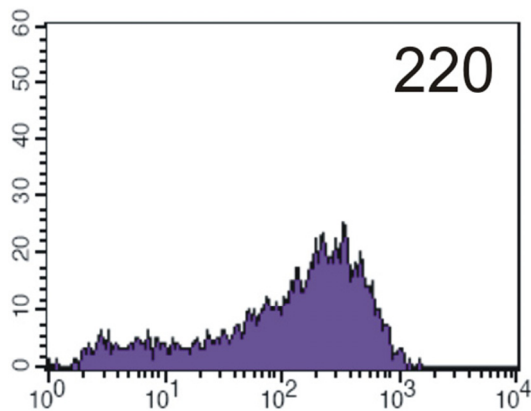
#### **4.1.1 VPLIV RAZLIČNIH DEJAVNIKOV NA MERITVE**

Na vezavo fluorescenčno označenega proteina gp120 na receptor DC-SIGN lahko vpliva veliko različnih dejavnikov. Lahko se zgodi, da DC, ki so bile izolirane iz monocitov, ne izražajo receptorja DC-SIGN v želeni meri. V tem primeru do vezave proteina gp120 ne bi prišlo, prav tako bi bila morebitna inhibicija spojin neustrezna. Prvi korak je torej pripraviti DC, ki bodo izražale receptor DC-SIGN. Ustreznost označbe proteina gp120 s FITC je prav tako pomemben dejavnik, ki vpliva na meritve. Pomembno je, da protein gp120 hranimo na temnem (produkt je namreč fotolabilen) in hladnem prostoru (v hladilniku 2-8 °C). Težave pri samih meritvah pa lahko predstavljajo tudi sintetizirani ligandi t.i. potencialni antagonisti omenjenega receptorja. Pomembno je, da spojine pravilno pripravimo, raztopimo v ustreznem topilu v ustrezni koncentraciji.

#### 4.1.2 IZRAŽANJE RECEPTORJA DC-SIGN NA POVRŠINI DC

Po izolaciji DC iz monocitov smo preverili, ali naše celice izražajo za naše raziskave pomemben receptor DC-SIGN (slika 12), ki je odgovoren za prenos infekcije z virusom HIV.

Prikazani so rezultati reprezentativnega eksperimenta od skupno petih opravljenih eksperimentov. Rezultate meritev s pretočno citometrijo smo izrazili kot MFI (Mean Fluorescence Intensity value), ki jo poda računalniški program, in jo potem primerjamo s kontrolo.



*Slika 12: Izražanje receptorja DC-SIGN.*

Meritve so pokazale, da je DC-SIGN izražen na DC s povprečno vrednostjo 220 MFI (enota: MFI-x-os), kar pomeni, da so bile DC, ki smo jih pripravili iz monocitov, primerne za nadaljevanje naše raziskave.

#### 4.1.3 VEZAVA PROTEINA GP120 NA DC-SIGN OB PRISOTNOSTI ANTAGONISTOV

Po inkubaciji DC s tremi izbranimi potencialnimi antagonisti (UL-TSZ-19, UL-TSV-15, UL-TSV-06) in proteina gp120, smo preverili srednjo vrednost intenzitete sevanja

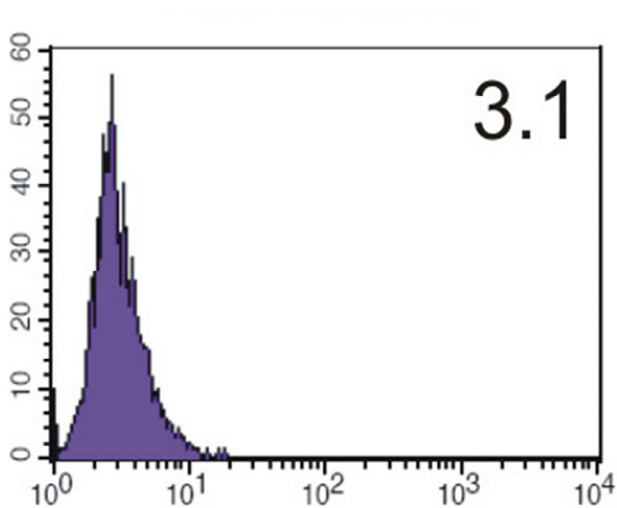


fluorescenčno označenega proteina, ki je odvisna od zaviralnega delovanja antagonistov.

Večja kot je intenziteta sevanja, manjša je vezava antagonista na receptor in posledično je manjša tudi njegova učinkovitost.

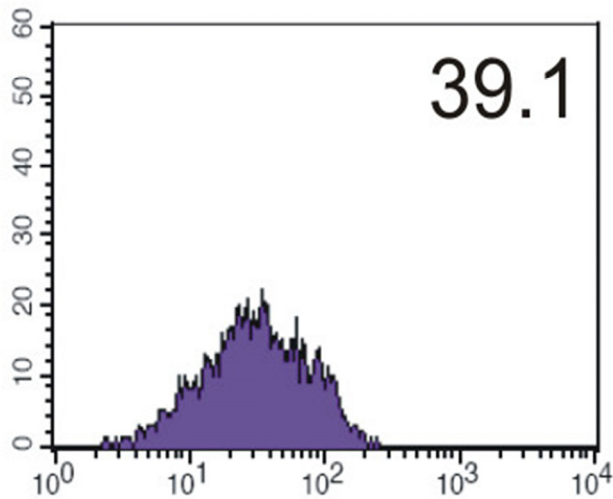
### ***Kontrole***

Slike od 13 do 15 prikazujejo kontrole, ki smo jih uporabili za preverjanje ustreznosti meritev.



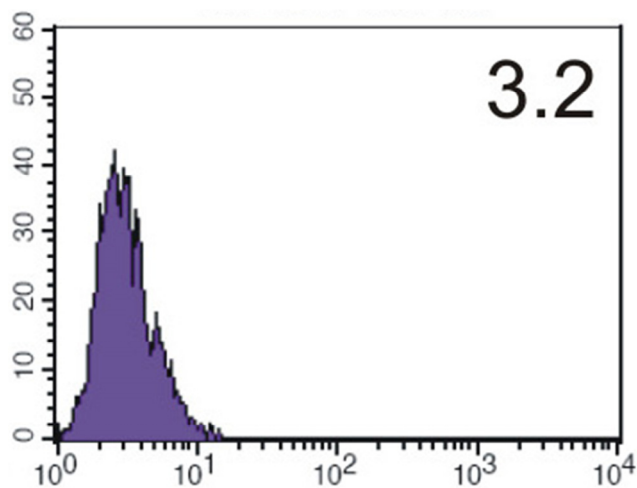
***Slika 13:*** Neoznačene dendritične celice.

Slika prikazuje srednjo vrednost intenzitete sevanja (3,1 MFI) neoznačenih dendritičnih celic. Teh celic nismo označili z rekombinatnim proteinom gp120.



*Slika 14: Kontrola gp120.*

Slika prikazuje srednjo vrednost intenzitete sevanja (39,1 MFI) rekombinantnega proteina gp120, vezanega na DC.

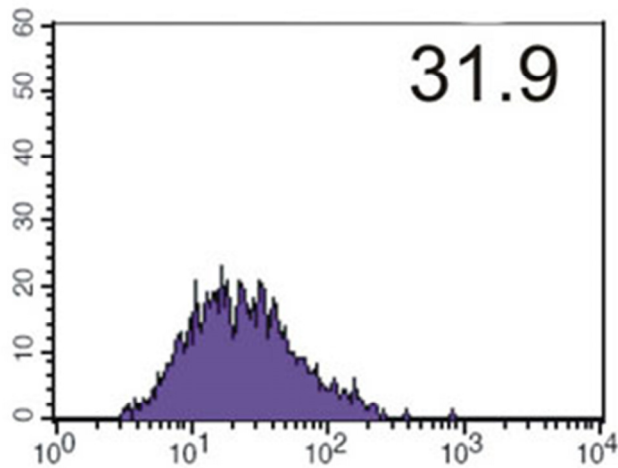


*Slika 15: Kontrola H200 protitelo.*

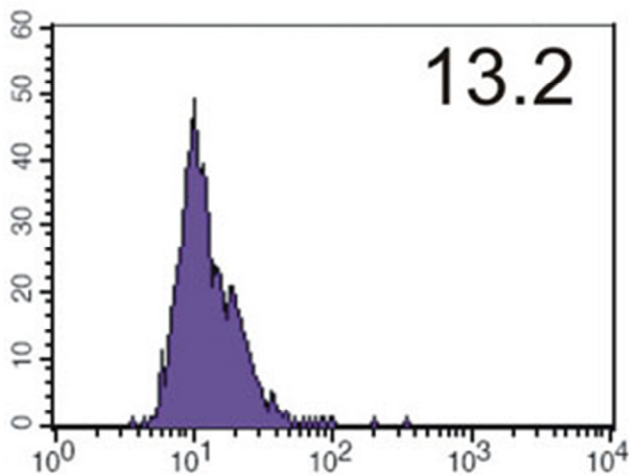
Slika prikazuje srednjo vrednost intenzitete sevanja (3,2 MFI) receptorja DC-SIGN, na katerega smo vezali protitelo H200. Protitelo H200 se veže na receptor DC-SIGN in blokira vezavo gp120. Kontrola nam je služila kot preverjanje vpliva specifičnih protiteles ter antagonistov, ki se vežejo na receptor DC-SIGN in s tem inhibirajo vezavo proteina gp120.

***Antagonisti pri 100 in 500  $\mu\text{M}$  koncentraciji***

V naslednjem koraku smo preverili intenziteto sevanja rekombinantnega proteina gp120 ob prisotnosti potencialnih antagonistov pri različnih molarnih koncentracijah (100  $\mu\text{M}$  in 500  $\mu\text{M}$ ) z namenom ugotovitve vpliva koncentracije potencialnih antagonistov na inhibicijo vezave glikoproteina gp120.

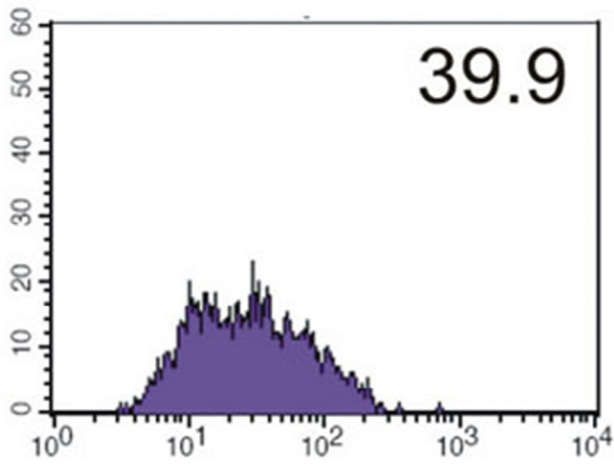


**Slika 16:** Prikaz intenzitete sevanja proteina gp120 ob prisotnosti potencialnega antagonistista TSV-06 pri 100  $\mu\text{M}$ .

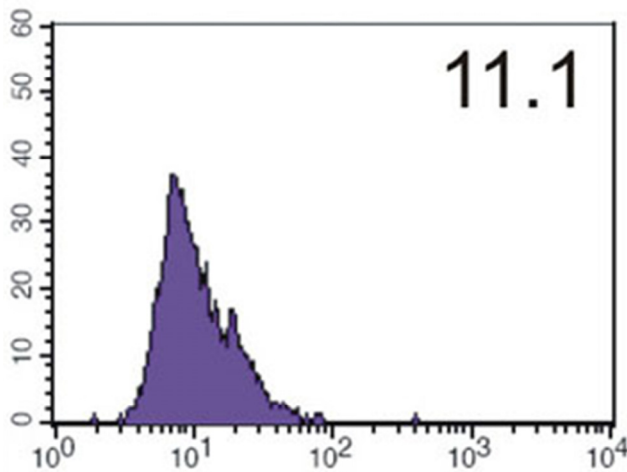


**Slika 17:** Prikaz intenzitete sevanja proteina gp120 ob prisotnosti potencialnega antagonistista TSV-06 pri 500  $\mu\text{M}$ .

Meritvi sta pokazali, da je srednja vrednost intenzitete sevanja fluorescenčno označenega proteina gp120 ob prisotnosti potencialnega antagonistista TSV-06 pri 100  $\mu\text{M}$  31.9 (MFI) pri 500  $\mu\text{M}$  pa 13.2 (MFI).

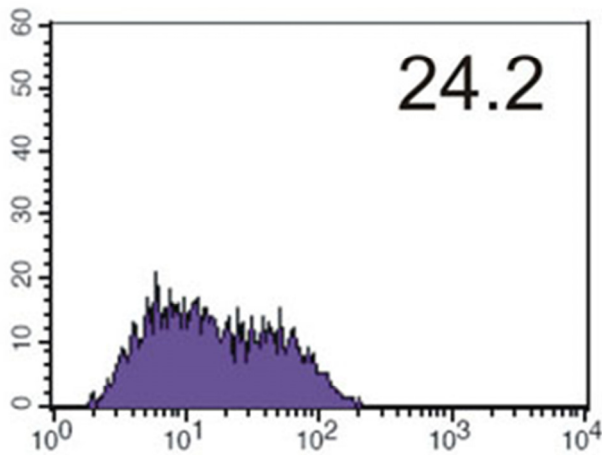


*Slika 18: Prikaz intenzitete sevanja proteina gp120 ob prisotnosti potencialnega antagonista TSV-15 pri 100  $\mu$ M.*

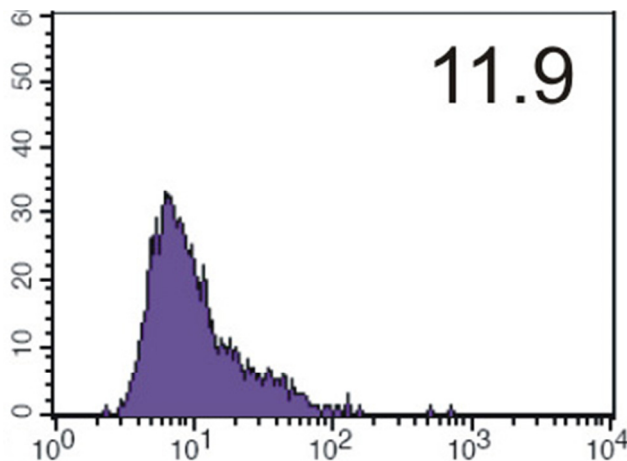


*Slika 19: Prikaz intenzitete sevanja proteina gp120 ob prisotnosti potencialnega antagonista TSV-15 pri 500  $\mu$ M.*

Meritvi sta pokazali, da je srednja vrednost intenzitete sevanja fluorescenčno označenega proteina gp120 ob prisotnosti potencialnega antagonista TSV-15 pri 100  $\mu$ M 39.9 (MFI) pri 500  $\mu$ M pa 11.1 (MFI).



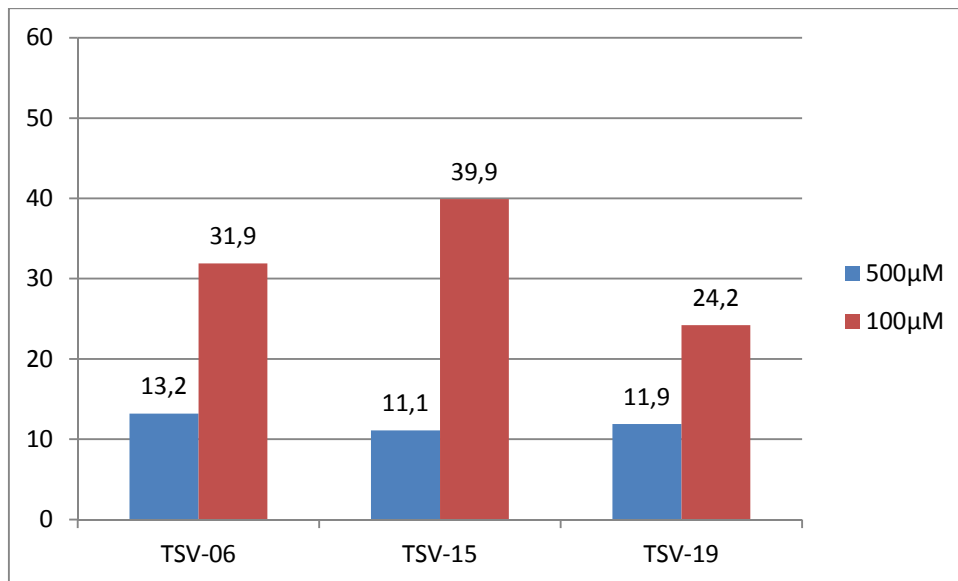
*Slika 20:* Prikaz intenzitete sevanja proteina gp120 ob prisotnosti potencialnega antagonistu TSZ-19 pri 100  $\mu\text{M}$ .



*Slika 21:* Prikaz intenzitete sevanja proteina gp120 ob prisotnosti potencialnega antagonistu TSZ-19 pri 500  $\mu\text{M}$ .

Meritvi sta pokazali, da je srednja vrednost intenzitete sevanja fluorescenčno označenega proteina gp120 ob prisotnosti potencialnega antagonistu TSZ-19 pri 100  $\mu\text{M}$  24,2 (MFI), pri 500  $\mu\text{M}$  pa 11.9 (MFI).

Z meritvami smo ugotovili, da so bili antagonisti (TSV-06, TSV-15, TSZ-19) učinkovitejši pri 500  $\mu\text{M}$  koncentraciji (graf 1), saj so bile vrednosti intenzitete sevanja fluorescenčno označenega proteina nižje kot pri 100  $\mu\text{M}$  koncentraciji.



**Graf 1:** Srednja vrednost intenzitete sevanja fluorescenčno označenega proteina gp120 pri 100 μM in 500 μM koncentraciji testiranih spojin.

## 5. RAZPRAVA

V magistrskem delu smo se osredotočili na vzpostavitev in evalvacijo testa za določanje zaviralnega učinka antagonistov receptorja DC-SIGN, da zavrejo vezavo glikoproteina gp120 na DC-SIGN, ki je izražen na dendritičnih celicah.

V ta namen smo uporabili sintezne antagoniste omenjenega receptorja, ki predstavljajo nov pristop razvoja protimikrobnih učinkovin. Delujejo namreč zaviralno na vezavo različnih ligandov na receptor DC-SIGN, ki je med drugim odgovoren za prenos in širjenje infekcije s HIV. Za potrditev učinkovitosti potencialnih antagonistov je potrebno zasnovati primerne biološke teste, ki dajejo hiter odgovor o zaviralnem učinku antagonistov pri vezavi različnih patogenov na receptor DC-SIGN (inhibicija vdora HIV in ostalih patogenov). Njihovo učinkovitost smo spremljali s pomočjo pretočne citometrije, s katero smo na podlagi intenzitete sevanja fluorescenčno označenega proteina gp120 ugotovili učinkovitost vezave posameznega liganda na DC-SIGN.

Za meritve smo uporabljali pretočno citometrijo, s pomočjo katere smo izmerili srednje vrednosti intenzitete fluorescenčno označenega proteina gp120 ob prisotnosti različnih antagonistov. Gp120 smo konjugirali s FITC, ki nam je služil kot fluorescenčni marker in omogočil merjenje učinkovitosti posameznih antagonistov receptorja DC-SIGN.

Za pripenjanje fluoresceina na proteine preko amino skupin uporabljamo fluorescein izotiocianat, ki reagira s primarnimi amini v proteinih. Fluorescein je fluorescenčni marker, ki ga kemijsko vežemo ali konjugiramo na druge molekule, kot so proteini in protitelesa. FITC reagira s prostimi aminoskupinami proteina in tako oblikuje stabilen konjugat. S FITC označena protitelesa ali proteini uporabljamo kot specifične sonde v imunohistokemiji in uporabi pretočnega citometra (25). FITC vzbudimo s svetlobo valovne dolžine pri 488 nm in oddaja fluorescenčno svetlobo z valovno dolžino 530 nm. Pri konjugaciji je potrebno upoštevati nestabilnost FITC na svetlobo, zato smo ga tekom celotne raziskave hranili v plastičnem vsebniku, pokritem s folijo. Tekom priprave konjugata smo bili pozorni tudi na čas in temperaturo konjugacije, ki lahko vpliva na temperaturno občutljive proteine. Pomembno je tudi pravilno razmerje proteina in FITC, saj lahko premalo FITC povzroči napake v merjenju (26).

FITC in gp120 smo pred konjugacijo raztopili. Raztopini gp120 smo nato dodali raztopino FITC in z dializo ločili nevezan FITC. Pripravljen konjugat gp120-FITC smo shranili zaščitenega pred svetlobo v hladilniku. FITC, ki je bil vezan na gp120, nam je kot fluorescenčni marker omogočil spremljanje odvisnosti vezave označenega proteina na DC ob prisotnosti antagonistov. Tako smo naredili označen in specifičen ligand za receptor DC-SIGN.

Z merjenjem intenzitete fluorescenčno označenega gp120 ob prisotnosti DC smo preverili, ali se protein veže in kakšna je intenziteta signala. Z meritvami smo potrdili, da je bila konjugacija gp 120 s FITC uspešna, saj je fluorescenčno označen protein svetil s povprečno vrednostjo 39.1 MFI. Meritve smo torej nadaljevali ob prisotnosti treh potencialnih antagonistov, še prej pa smo morali pripraviti DC izolirane iz monocitov.

Za testni sistem smo uporabili primarne dendritične celice, s katerimi se lažje približamo dejanskemu delovanju in učinkovitosti inhibitorjev DC-SIGN in vivo.

Težavo pri raziskovanju DC je dolgo predstavljalo njihovo majhno število v tkivih. V ta namen so razvili postopke, ki omogočajo pripravo večjega števila DC in vitro iz monocitov (10). Tako pripravljene DC so funkcijsko in morfološko enake DC, ki se nahajajo v tkivih. Prednost razvitega postopka je torej priprava večjega števila DC v precej kratkem času.

Iz krvi treh naključno izbranih zdravih krvodajalcev smo izolirali mononuklearne celice (MNC) iz levkocitnega koncentrata s pomočjo centrifugiranja na gostotnem gradientu, ki omogoča porazdeljevanje komponent (v naši raziskavi smo uporabljali krvne celice) na podlagi njihove gostote. Tako smo dobili plasti različnih celic, med katerimi je bila tudi bela gosta plast mononuklearnih celic. Obstajajo različne tehnike osamitve monocitov iz levkocitnega koncentrata, kot so adhezija, flotacija na ustreznih gostotnih gradientih in druge. Postopek adhezije je cenovno najbolj ugoden, vendar je količina izoliranih monocitov manjša (11). Centrifugiranje na gostotnem gradientu nam je omogočilo le izolacijo mononuklearnih celic, ki so vsebovale za nas pomembne monocite, zato smo slednje izolirali s pomočjo tehnologije MACS. Neoznačene celice so se ob prisotnosti mikromagnetnega polja iz kolone izločile, označene monocite v



koloni pa smo ob odstranitvi magnetnega polja izprali s pufrom. Metoda nam je omogočila izolacijo monocitov, ki so bili izhodišče za pripravo dendritičnih celic.

Monociti tako predstavljajo predniške celice, ki omogočajo pripravo večjih količin DC in vitro, kjer za razvoj v nezrele in zrele DC potrebujejo rastne dejavnike, kot sta: IL-4 ter GM-CSF. Pri izolaciji celic smo želeli s pomočjo rastnih dejavnikov pridobiti nezrele DC, ki bi izražale za nas pomemben DC-SIGN receptor.

Izražanje omenjenega receptorja smo preverili s pretočno citometrijo, kjer smo na podlagi intenzitete svetlobnega signala potrdili izražanje receptorja na DC. Intenziteta svetlobnega signala je premosorazmerna s količino receptorja DC-SIGN na površini DC. V prvem koraku nas je zanimalo, ali DC, ki smo jih izolirali iz monocitov, izražajo receptor DC-SIGN. Z meritvami smo potrdili, da je DC-SIGN izražen na DC s povprečno vrednostjo 220 MFI. Dendritične celice, ki jih nismo označili s proteinom gp120, smo uporabili kot kontrolo. Srednja vrednost intenzitete sevanja neoznačenih DC je bila 3,1 MFI. Raziskavo smo nadaljevali z uporabo treh izbranih potencialnih antagonistov ob prisotnosti s FITC označenega rekombinantnega proteina gp120.

Po optimizaciji označevanja celic z gp120-FITC ter izolaciji celic, smo se lotili dejanske ocene naše hipoteze, tj. ali lahko s pomočjo tega testa ocenimo učinkovitost antagonistov DC-SIGN. Po dodatku celic vsakega posameznega antagonist in proteina gp120 smo preverjali, v kakšni meri posamezni ligand inhibira vezavo gp120 na receptor DC-SIGN. Naredili smo tudi kontrolo gp120 z DC (brez prisotnosti antagonistov), kjer smo preverili intenziteto sevanja fluorescenčno označenega proteina gp120 pri vezavi na receptor DC-SIGN (39.1 MFI). Močneje, kot se je antagonist vezal na receptor, manjša je bila srednja vrednost intenzitete fluorescenčno označenega proteina. Z meritvami smo potrdili, da so bili antagonisti učinkovitejši pri 500  $\mu\text{M}$  koncentraciji. Rezultati, ki smo jih dobili pri 100  $\mu\text{M}$  in 500  $\mu\text{M}$  koncentraciji, so bili slabše ponovljivi, kljub enaki pripravi in pogojih merjenja pri vseh treh uporabljenih antagonistih. Slaba ponovljivost rezultatov pri 100  $\mu\text{M}$  in 500  $\mu\text{M}$  koncentraciji je lahko posledica neobstoynosti liganda za DC-SIGN, lahko pa se DC, ki smo jih izolirali od različnih donorjev različno vežejo na ligande za DC-SIGN. Označevanje celic je v veliki meri odvisno tudi od količine uporabljenega reagenta.

V magistrski nalogi smo torej želeli preveriti testni sistem z vidika ustrezne odzivnosti metode, z namenom, da dokažemo ustreznost testnega sistema, ki ga želimo vpeljati kot rutinski test za določanje inhibicije sintetiziranim spojinam tj. potencialnim antagonistom. Z meritvami (tj. z zmanjšanjem intenzitete fluorescence na pretočnem citometru) smo dokazali zmožnost testa, da lahko kljub slabši ponovljivosti rezultatov z njim lahko ocenimo delovanje DC-SIGN inhibitorjev, pri tem pa moramo biti pozorni na omenjene dejavnike, ki lahko vplivajo na rezultate meritev.

## 6. SKLEP

V okviru magistrskega dela smo s pomočjo testnega sistema spremljali in vrednotili inhibitorno delovanje ligandov, ki se vežejo na receptor DC-SIGN. V ta namen smo uporabili konjugat gp120 s FITC, ki se je vezal na izolirane DC.

Ugotovili smo, da testni sistem, ki smo ga uporabili za oceno delovanja antagonistov DC-SIGN, ne moremo ovrednotiti kot dobro ponovljivega, saj ni vedno prišlo do dobrega označevanja z gp120. Ob tem je potrebno upoštevati določena priporočila, ki vplivajo na zanesljivost rezultatov, kot je morebiten razpad fluorescentnega reagenta, ki smo ga uporabili za konjugacijo s proteinom gp120, ali nestabilnost omenjenega proteina. Na ustreznost rezultatov v veliki meri vpliva konjugacija proteina gp120 sFITC, med katero je potreben stalen nadzor temperature, ki lahko povzroči denaturacijo proteina. Na odzivnost metode lahko vpliva tudi ustrezna koncentracija uporabljenega reagenta FITC-gp120, ki tako omogoči uspešno označevanje DC.

Zanesljivost rezultatov je torej v veliki meri odvisna od stabilnosti in priprave uporabljenih raztopin, ki jih uporabljamo tekom analize. Raztopina s FITC označenega rekombinantnega proteina gp120 je zelo fotolabilna, zato je način shranjevanja bistven za stabilnost same raztopine. Svetloba namreč povzroči razpad konjugata, posledično bi lahko to vplivalo na intenziteto sevanja fluorescenčno označenega proteina, prav tako bi bila morebitna inhibicija antagonistov sporna.

Žal smo ugotovili tudi, da je za dobro označevanje celic potrebna večja količina reagenta, kot smo pričakovali.

Zaključimo lahko, da bi bila primerna uporaba drugega, cenejšega ali bolj obstojnega liganda za DC-SIGN. S tem bi ovrgli vsaj en morebiten razlog za slabo ponovljivost rezultatov. Ena izmed možnosti je tudi, da se DC od različnih donorjev različno vežejo na ligande za DC-SIGN.

## 7. LITERATURA

1. Marjan Vozelj: Temelji imunologije, 1. izdaja, 1. natis, DZS, Ljubljana 2000: Poglavja: 1 (1-21), 2 (23-46), 12 (239-259), 21 (453-476).
2. Urška Repnik, Martina Bergant, Matjaž Jeras: Lastnosti in možnosti uporabe dendritičnih celic, antigensko specifičnih modulatorjev imunskega odziva; Characteristic and potential therapeutic applications of dendritic cells, antigen specific modulators of immune responses, Zdrav Vestn 2004; 73: 69-72.
3. Tong Zhou, Yongxi Chen, Li Hao and Yanyun Zhang: DC-SIGN and Immunoregulation. Cellular and Molecular Immunology 2006; 3 (4): 279-283.
4. Urban Švajger, Marko Anderluh, Matjaž Jeras, Nataša Obermajer: C-type lectin DC-SIGN: An adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity. Cellular Signalling 2010; 22: 1397-1405.
5. Nataša Obermajer, Sara Sattin, Cinzia Colombo, Michela Bruno, Urban Švajger, Marko Anderluh, Anna Bernardi: Design, synthesis and activity evaluation of mannose-based DC-SIGN antagonists. Molecular Diversity 2011; 15: 347-360.
6. Jacques Banchereau, Francine Briere, Christophe Caux, Jean Davoust, Serge Lebecque, Yong-Jun Liu, Bali Pulendran, and Karolina Palucka: Immunobiology of dendritic cells. Annual Reviews Immunology. 2000; 18: 767-811.
7. Spletna stran: <http://flipper.diff.org/app/items/info/2262> (5.1.2013).
8. Spletna stran: [http://journals.cambridge.org/fulltext\\_content/ERM/ERM4\\_03/S1462399402004283sup004.htm](http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM4_03/S1462399402004283sup004.htm); P. Toby H. Coates, Bridget L. Colvin, Holger Hackstein, Angus W. Thomson: The interaction between dendritic cells (DCs) and T cells involves three signals. Expert reviews in molecular medicine 2002 (11.1.2013).
9. Spletna stran: [http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=2670432\\_nrs07003.f6&req=4](http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=2670432_nrs07003.f6&req=4) (26.1.2013).
10. Matjaž Jeras, Martina Bergant, Urška Repnik: In vitro preparation and functional assessment of human monocyte-derived dendritic cells-potential antigen-specific modulators of in vivo immune responses. Transplant immunology 2005; 14: 231-244.

11. Teja Germovnik: Vrednotenje medsebojnih vplivov alogenskih dendritičnih celic v mešanih kulturah in vitro (Evaluation of interactions off allogeneic dendritic cells in mixed cultures in vitro), Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Diplomaska naloga, Ljubljana, 2011.
12. Marko Anderluh, Gregor Jug, Urban Švajger and Nataša Obermajer: DC-SIGN antagonists, a potential new class of anti-infectives. *Current medicinal Chemistry* 2012; 19: 992-1007.
13. Spletna stran: [http://www.nature.com/nri/journal/v3/n9/box/nri1182\\_BX1.html](http://www.nature.com/nri/journal/v3/n9/box/nri1182_BX1.html); Yvette van Kooyk, Teunis B.,H., Geijtenbeek: C-type lectins: structure, specificity and function; DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nature reviews immunology* 2003; 3: 697-709 (3.2.2013).
14. Spletna stran: [http://www.nature.com/nri/journal/v3/n9/fig\\_tab/nri1182\\_F1.html](http://www.nature.com/nri/journal/v3/n9/fig_tab/nri1182_F1.html); Yvette van Kooyk, Teunis B.,H., Geijtenbeek: C-type lectins and toll-like receptors: pathogen receptors on dendritic cells; DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nature reviews immunology* 2003; 3: 697-709 (1.3.2013).
15. Spletna stran: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471490601020816>; Stefan Pohlmann, Frederic Baribaud, Robert W. Doms: Trends in immunology, DC-SIGN and DC-SIGNR: helping hands for HIV 2001; 22: 643-646 (18.3. 2013).
16. Spletna stran: [http://www.nature.com/nri/journal/v3/n9/fig\\_tab/nri1182\\_F3.html](http://www.nature.com/nri/journal/v3/n9/fig_tab/nri1182_F3.html); Yvette van Kooyk, TeunisB. H. Geijtenbeek: Mycobacteria tuberculosis target DC-SIGN through ManLAM to suppress cellular immune responses mediated by dendritic cells; DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nature reviews Immunology* 2003; 3: 697-709 (1.3.2013).
17. David Hajšek: Testni sistem za določanje afinitete antagonistov receptorja DC-SIGN in vitro (Assay for determining affinity of DC-SIGN antagonists in vitro), Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Diplomaska naloga, Ljubljana, 2012.
18. Spletna stran: [http://www.nature.com/nri/journal/v6/n11/fig\\_tab/nri1960\\_F1.html](http://www.nature.com/nri/journal/v6/n11/fig_tab/nri1960_F1.html); Li Wu, Vineet N. KewalRamani: The role of dendritic cells in HIV infection and dissemination; Dendritic-cell interaction with HIV: infection and viral dissemination. *Nature Reviews Immunology* 2006; 6: 859-868 (25.2.2013).

19. Meimei Shan, Per Joham Klasse, Kaustuv Banerjee, Antu K. Dey, Sai Prasad N. Iyer, Robert Dionisio, Dustin Charles, Lila Campbell-Gardener, William C. Olson, Rogier W. Sanders, John P. Moore: HIV-1 gp120 Mannoses Induce Immunosuppressive responses from dendritic cells. *PloS Pathogens* 2007; 3 (11): e169. Doi:10.1371/journal.ppat.0030169:1637-1650.
20. Casey A. Maguire, Ramil Sapinoro, Natasha Girgis, Sol M. Rodriguez-Colon, Servio H. Ramirez, Jennifer Williams, Stephen Dewhurst: Recombinant adenovirus type 5 vectors that target DC-SIGN, chemR23 and  $\alpha_v \beta_3$  integrin efficiently transduce human dendritic cells and enhance presentation of vectored antigens. *Vaccine* 2006; 24 (5):671-682.
21. Spletna stran: <https://www.miltenyibiotec.com/Products-and-Services/MACS-Cell-Separation/MACS-Technology.aspx> (20.12.2012).
22. Spletna stran: <http://blogs.hsc.edu/biology/2010/03/03/immunology-students-use-macs-technology/> (20.12.2012).
23. Kotnik Vladimir, Čurin-Šerbec Vlada, Hartman Pretnar Katrina, Ihan Alojz, Jeras Matjaž, Kopitar Andreja Nataša, Malovrh Tadej, Simčič Saša., Stopinšek Sanja, Skvarč Miha, Vidan Jeras Blanka, Wraber Branka. Ljubljana, 2010. *Imunološki priročnik*: 78.
24. Spletna stran: [http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteka/KB/Gradivo/PC\\_gradivo\\_BMA.pdf](http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteka/KB/Gradivo/PC_gradivo_BMA.pdf); Miha Milek: Vaje iz Biomedicinske analitike: Gradivo za interno uporabo; Biomedicinska analitika: Uporaba pretočne citometrije za preučevanje mehanizmov citotoksičnosti (25.3.2013).
25. Spletna stran: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/fitc1bul.Par.0001.File.tmp/fitc1bul.pdf> (4.1.2013).
26. Spletna stran: [http://www.ehow.com/list\\_7617920\\_fitc-conjugation-protocols.html](http://www.ehow.com/list_7617920_fitc-conjugation-protocols.html); Deborah Farson, eHow Contributor: FITC conjugation protocols (5.4.2013).