

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ARTEJA ANDOLJŠEK

MAGISTRSKA NALOGA

Industrijska farmacija

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ARTEJA ANDOLJŠEK

**KOMPETITIVNI VEZAVNI TEST ZA DOLOČANJE
ZAVIRALNEGA DELOVANJA ANTAGONISTOV
RECEPTORJA DC-SIGN *IN VITRO***

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

MAGISTRSKA NALOGA

Industrijska farmacija

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju, izr. prof. dr. Marku Anderluhu, za strokovno pomoč, razumevanje in spodbujanje pri laboratorijskem delu ter pri izdelavi magistrskega dela. Zahvaljujem se tudi članoma komisije za njune koristne pripombe in usmeritve po pregledu magistrskega dela. Na koncu izražam zahvalo tudi svoji družini in vsem kolegom za podporo in spodbudo tekom celotnega študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom izr. prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm.

Ljubljana, 2015

Arteja Andoljšek

Predsednica komisije: prof. dr. Marija Bogataj, mag. farm.

Član: doc. dr. Rok Dreu, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

I. POVZETEK.....	I
II. ABSTRACT	II
III. SEZNAM OKRAJŠAV IN KRATIC.....	III
1. UVOD	1
1.1 LEKTINI.....	1
1.1.1.1 SPLOŠNA STRUKTURA	2
1.1.1.2 KLASIFIKACIJA	2
1.2 DC-SIGN	3
1.2.1 VLOGA DC-SIGN.....	4
1.2.2 STRUKTURA DC-SIGN	5
1.2.3 LIGANDI DC- SIGN	5
1.2.3.1 PLAŠČNI GLIKOPROTEIN 120 (GP120).....	6
2. NAMEN DELA	8
3. MATERIALI IN METODE	9
3.1 MATERIALI.....	9
3.1.1 REAGENTI IN TOPILA	9
3.1.2 OPREMA	13
3.1.3 APARATURA	13
3.2 METODE.....	14
3.2.1 IMUNOKEMIJSKA METODA	14
3.2.1.1 ELISA/EIA.....	14
3.2.1.2 KONJUGACIJA Z BIOTINOM (BIOTINILACIJA).....	15
3.2.1.3 KEMILUMINISCENCA.....	15
3.2.2 STATISTIČNE METODE	16
3.2.2.1 Z-FAKTOR.....	16
3.2.2.2 RAZMERJE MED ODZIVOM IN ŠUMOM (S/N) IN ODZIVOM IN OZADJEM (S/B).....	16
4. EKSPERIMENTALNO DELO.....	17

4.1 SPLOŠNI POSTOPKI.....	17
4.1.1 PRIPRAVA PUFROV.....	17
4.1.2 PRIPRAVA BIOTINILIRANEGA GP120.....	18
4.1.3 PRIPRAVA MIKROTITRSKE PLOŠČICE.....	19
5. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	23
5.1 REZULTATI ODZIVA NA MIKROTITRSKI PLOŠČICI V PRIMERJAVI MED »SVEŽE PRIPRAVLJENIM« IN » STARIM« BGP120	23
5.2 REZULTATI DOLOČANJA RELATIVNE AFINITETE POTENCIALNIH ANTAGONISTOV RECEPTORJA DC-SIGN.....	23
6. SKLEP	32
7. LITERATURA.....	33

KAZALO SLIK

<i>Slika 1: Pentametrična struktura lektina tipa C</i>	<i>2</i>
<i>Slika 2: Struktura DC-SIGN</i>	<i>5</i>
<i>Slika 3: Lokacija glikoproteina gp120 in gp41 na površini virusa HIV</i>	<i>7</i>
<i>Slika 4: Struktura dendrona, spojine UL-TTD-39.....</i>	<i>12</i>
<i>Slika 5: Biotinilacija proteina gp120.....</i>	<i>15</i>
<i>Slika 6: Kemiluminiscenca.....</i>	<i>15</i>
<i>Slika 7: Delež vezave gp120 na DC-SIGN v odvisnosti od koncentracije AAL-17.....</i>	<i>24</i>
<i>Slika 8: Delež vezave gp120 na DC-SIGN v odvisnosti od koncentracije AAL-18.....</i>	<i>24</i>
<i>Slika 9: Delež vezave gp120 na DC-SIGN v odvisnosti od koncentracije AMA-21.....</i>	<i>25</i>
<i>Slika 10: Delež vezave gp120 na DC-SIGN v odvisnosti od koncentracije AMW-5.....</i>	<i>25</i>
<i>Slika 11: Delež vezave gp120 na DC-SIGN v odvisnosti od koncentracije AMW-6.....</i>	<i>26</i>
<i>Slika 12: Delež vezave gp120 na DC-SIGN v odvisnosti od koncentracije TKV-19.....</i>	<i>26</i>
<i>Slika 13: Delež vezave gp120 na DC-SIGN v odvisnosti od koncentracije TKV-21.....</i>	<i>27</i>
<i>Slika 14: Delež vezave gp120 na DC-SIGN v odvisnosti od koncentracije TSV-20.....</i>	<i>27</i>
<i>Slika 15: Delež vezave gp120 na DC-SIGN v odvisnosti od koncentracije TSZ-15.....</i>	<i>28</i>
<i>Slika 16: Delež vezave gp120 na DC-SIGN v odvisnosti od koncentracije TTD-35.....</i>	<i>28</i>
<i>Slika 17: Delež vezave gp120 na DC-SIGN v odvisnosti od koncentracije TTD-38.....</i>	<i>29</i>
<i>Slika 18: Delež vezave gp120 na DC-SIGN v odvisnosti od koncentracije TTD-39.....</i>	<i>29</i>

KAZALO PREGLEDNIC

<i>Preglednica 1: Klasifikacija lektinov tipa C</i>	<i>3</i>
<i>Preglednica 2: Patogeni, ki jih veže DC-SIGN</i>	<i>6</i>
<i>Preglednica 3: Testirani potencialni antagonisti DC-SIGN-a.....</i>	<i>10</i>
<i>Preglednica 4: Interpretacija faktorja Z</i>	<i>16</i>
<i>Preglednica 5: Masa potrebnih reagentov za pripravo 1000 ml pufra za redčenje.....</i>	<i>17</i>
<i>Preglednica 6: Količina potrebnih reagentov za pripravo 1000 ml pufra za spiranje</i>	<i>17</i>
<i>Preglednica 7: Količina potrebnih reagentov za pripravo 1000 ml dializnega pufra.....</i>	<i>18</i>
<i>Preglednica 8: Rezultati odziva na mikrotitrski ploščici v primerjavi med »sveže pripravljenim« in »starim« bgp120.....</i>	<i>23</i>
<i>Preglednica 9: Rezultati IC50 testiranja potencialnih antagonistov receptorja DC-SIGN... </i>	<i>30</i>
<i>Preglednica 10: Izračunan Z-faktor za posamezne najnižje koncentracije spojin</i>	<i>31</i>

I. POVZETEK

Receptor DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) je lektinski receptor tipa C. Najdemo ga na dendritičnih celicah. Receptor je ključnega pomena pri prepoznavanju endogenih in eksogenih ligandov. Deluje kot adhezijska molekula. DC-SIGN je velikokrat prvi receptor, s katerim pridejo v stik patogeni. Prav zaradi preprečitve interakcije patogen-DC-SIGN je postal zanimiv kot tarča za nove zdravilne učinkovine (antagoniste). Pri potencialnih antagonistih je pomembno, da so močne spojine, ki imajo visoko afiniteto do receptorja DC-SIGN in kompetitivno zavirajo vezavo antigenov, v našem primeru gp120. To je plaščni glikoprotein na površini virusa HIV z molekulsko maso 120. Pri okužbi s HIV se gp120 veže na receptor CD4 na površini celic pomagalk. Uporabljali smo ga kot naravni ligand za DC-SIGN, za določanje zaviralnega delovanja spojin (antagonistov) receptorja DC-SIGN.

V magistrski nalogi smo spojinam, ki so bile sintetizirane v laboratoriju na Katedri za farmacevtsko kemijo, Fakultete za farmacijo, ovrednotili učinkovitost antagonističnega delovanja. Testirali smo različne spojine antagonistov receptorja DC-SIGN in spojinam določali inhibitorno koncentracijo IC_{50} . Za določanje inhibitornega delovanja smo uporabljali kompetitivni vezavni test, ki je encimsko-immunski test in se izvaja na mikrotitrski ploščici. Test temelji na tekmovanju vezave biotiliniranega gp120 (bgp120) s spojinami antagonistov na receptor DC-SIGN. Detekcija poteka preko biotinskega ostanka na gp120. S protitelesi proti biotinu, ki imajo konjugirano peroksidazo lahko kataliziramo reakcijo oksidacije, pri čemer pride do pojava kemiluminiscence, ki jo detektiramo. Pri testiranju antagonistov receptorja DC-SIGN smo dosegli dobro odzivnost metode. Določene spojine so se sicer v mediju mikrotitrskje ploščice izobarjale, zato smo pri teh dobili neustrezne rezultate. Težave smo se lotili z dodatnim redčenjem, vendar pri določenih spojinah nismo bili uspešni. Ugotovili smo tudi, da je sveže pripravljen bgp120 bolj učinkovit od tri leta starega, saj smo pri prvem dobili višje vrednosti vezave na receptor.

II. ABSTRACT

DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) is a C-type of lectin receptor. It can be found on dendritic cells. Receptor is essential to identify endogenous and exogenous ligands. It functions as an adhesion molecule. It is often the first receptor which they come into contact with pathogens. It has become an interesting target for new active substances to prevent pathogen-receptor interaction. The potential antagonists must have high affinity for DC-SIGN receptor and must competitively inhibit the binding of an antigen, in this case, the gp120. It is a glycoprotein which is located on the surface of the virus HIV, having a molecular weight of 120. In the case of infection, it binds to a receptor on the surface of the CD4 helper cells. We used it as a natural ligand for DC-SIGN to determine the inhibitory activity of the compounds (antagonists) of the receptor DC-SIGN.

In this master thesis we evaluated the effectiveness of the antagonism our compounds that have been synthesized in a laboratory in the Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy. We tested a variety of DC-SIGN antagonists and determined the inhibitory concentration IC₅₀. To determine the inhibitory activity, we used a competitive binding assay, which is an enzyme-immunoassay and is performed on a microtiter plate. Test is based on competition binding bgp120 with compounds antagonists to the receptor DC-SIGN. Detection was done via a biotin residue on gp120. The antibodies to biotin, which are conjugated with peroxidase, can catalyze the oxidation reaction, whereby there is a phenomenon of chemiluminescence which is detected. We achieved a good response method while assaying DC-SIGN antagonists. Certain compounds are formed precipitate in the medium of microtiter plates so we get to these inadequate results. Problems are tackled with extra thinning, but with certain compounds we were not successful. We have also found that freshly prepared bgp120 is more effective than three years old because we get higher levels of binding to the receptor.

III. SEZNAM OKRAJŠAV IN KRATIC

Ag	<i>antigen</i>
Ab	<i>protitelo</i>
bgp120	<i>biotiniliran plaščni glikoprotein na površini virusa HIV</i>
BSA	<i>goveji serumski albumin</i>
CD	<i>(Cluster of differentiation - skupina diferenciacije)</i>
CLR	<i>lektinski receptor tipa C</i>
CRD	<i>domena za prepoznavo ogljikovih hidratov</i>
CTLD	<i>domena lektinov tipa C</i>
DC	<i>dendritične celice</i>
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
DMF	<i>dimetilformamid</i>
DMSO	<i>dimetilsulfoksid</i>
ELISA	<i>encimsko imunski test na trdnem nosilcu</i>
gp120	<i>plaščni glikoprotein na površini virusa HIV</i>
HIV	<i>virus humane imunske pomanjkljivosti</i>
HRP	<i>hrenova peroksidaza</i>
ICAM	<i>medcelična adhezijska molekula</i>
IL-4	<i>interlevkin 4</i>
NHS	<i>N-hidroksisukcinimid</i>
PHK	<i>poglavitni histokompatibilnostni kompleks</i>
Pt	<i>protitelo</i>
TR	<i>transmembranska regija</i>

1. UVOD

1.1 LEKTINI

Lektini so proteini, specifični za vezavo ogljikovih hidratov, ki so prisotni na površini mikroba ali evkariontske celice. Delujejo kot prepoznavno mesto med celico in okoljem, ki ga obdaja. Njihova poglobitna naloga je medcelična vezava med lektini na površini ene celice in vrsto ogljikovih hidratov, ki so izraženi na površini druge celice. Lektini reverzibilno in specifično vežejo monosaharide, oligosaharide in določene strukture saharidov (polisaharide, glikozilirane proteine) in jih lahko najdemo v skoraj vseh organizmih od virusov do živali. Sestavljajo jih domene (CRD), katerih naloga je vezava ogljikovih hidratov. Med seboj se razlikujejo glede posameznih domen. V odvisnosti od vezave posameznega monosaharida so lektini razdeljeni v pet skupin, ki so specifične za (4):

- D- manozo,
- D-galaktozo in *N*-acetilgalaktozamin,
- *N*-acetilglukozamin,
- L-fukozo,
- *N*-acetilneuraminsko kislino.

Lektini vplivajo na vezavo kompleksa oligosaharidov v glikokonjugate. Lahko so zelo specifični, vežejo le en monosaharid ali pa je njihova specifičnost nizka, npr. pri manozno specifičnih lektinih, kateri prav tako vežejo L-fukozo in druge monosaharide. Poznamo dve družini lektinov: intracelularni (L-tip, P-tip...) in ekstracelularni (galektini, C-tip...). Intracelularni imajo nalogo vezave oligosaharidnih struktur v jedru celice in procesiranja glikoproteinov. Ekstracelularni pa so tisti, ki so odgovorni za prepoznavanje ogljikovih hidratnih epitopov patogenov in drugih celic ter so zaradi tega zanimive molekularne tarče (4).

1.1.1 LEKTINI TIPA C

Spadajo med skupino ekstracelularnih lektinov. So zelo raznolika in dobro raziskana skupina lektinov. Razlikujejo se od ostalih, ker vsebujejo Ca^{2+} ione. Odgovorni so za prepoznavo ogljikovih hidratov na površinah celic (5,6). Domena CRD je domena, ki je odgovorna za

vezavo ogljikovih hidratov na površini celice. Zaradi svoje globularne strukture je dobila ime CRD tipa C ali CTLD (domena lektinov tipa C). Ugotovili so tudi, da vsi proteini z določenim aminokislinskim zaporedjem ne vežejo ogljikovih hidratov ali Ca^{2+} (7). Lektini tipa C imajo pomembno vlogo tudi pri nespecifičnem imunskem odzivu (5,6).

1.1.1.1 SPLOŠNA STRUKTURA



Slika 1: Pentametrična struktura lektina tipa C (31)

Domena lektinov tipa C je sestavljena iz okrog 150 aminokislin, ki so pomembne za zvitje domene in koordinacijo Ca^{2+} ionov. Domeno lektinov tipa C delimo v dve skupini;

- skupino, ki veže ogljikove hidrate manoznega tipa in
- skupino, ki veže ogljikove hidrate galaktoznega tipa.

Specifičnost za ligande je odvisna od položaja hidroksilnih skupin na ogljikovih hidratih.

Zvitje CTLD ima obliko dvojne zanke. Strukturno lahko CTLD-je razdelimo v dve skupini; v skupino s področjem dolge zanke in skupino brez področja dolge zanke (6, 7).

1.1.1.2 KLASIFIKACIJA

Lektine delimo v 7 skupin (I-VII), ki vsebujejo različne proteinske domene v vsakemu proteinu. Klasifikacija je bila posodobljena leta 2002, z dodatnimi sedmimi skupinami (VIII-XIV). Nedavno pa so dodali še tri podskupine (XV do XVII) (2).

Preglednica 1: Klasifikacija lektinov tipa C (2)

<i>SKUPINA</i>	<i>IME</i>	<i>DOMENA</i>
I	Lektikani	EGF, Ig in Link
II	Asialoglikoprotein in DC receptor	/
III	Kolektini	/
IV	Selektini	EGF
V	NK-celični receptorji	/
VI	Multi-CTLD endocitski receptorji	Fnll, Ricin
VII	Reg skupina	/
VIII	Hondrolektin, Lajilin	/
IX	Tetranektin	/
X	Policistin	WSC, REJ, PKD
XI	Atraktin	PSI, EGF in CUB
XII	Eozinofilni bazični protein	/
XII	DGCR2	/
XIV	Trombomodulin	EGF
XV	Bimlek	/
XVI	SEEC	SCP in EGF
XVII	CBCP	CSPG in CalX-beta

1.2 DC-SIGN

DC-SIGN je lektinski receptor tipa C (CLR oziroma CD209). Nahaja se na površini dendritičnih celic (DC). Receptor je ključnega pomena pri prepoznavanju endogenih in eksogenih ligandov in deluje kot adhezijska molekula zanje. Vezava z antigenom povzroči dozorevanje DC. DC-SIGN sodeluje pri prilagoditvi imunskega odziva. Pri stiku s patogeni se pogosto pojavlja kot prvi receptor. Deluje kot posrednik okužbe pri stiku s patogeni saj prepoznava in veže različne viruse kot so: HIV-1, virus hepatitisa C, citomegalovirus, Ebola, herpes simpleks, koronavirusi, virus zahodnega Nila, in bakterije: *H. pylori*, *M. tuberculosis*, *L. Interrogans*, glive: *C. albicans*, *A. Fumigatus* in parazite *Leishmania*, *S. Manson* (8, 9). Specifične okužbe lahko zaviramo na naslednje načine:

- inhibicija vezave patogenov na DC-SIGN s specifičnimi ligandi,
- inhibicija vezave patogenov na DC-SIGN s specifičnimi polivalentnimi ligandi na osnovi ogljikovih hidratov,
- inhibicija vezave patogenov na DC-SIGN s specifičnimi protitelesi proti DC-SIGN in
- uporaba specifičnih DC-SIGN ciljanih vektorjev, ki kodirajo proteine patogenov.

1.2.1 VLOGA DC-SIGN

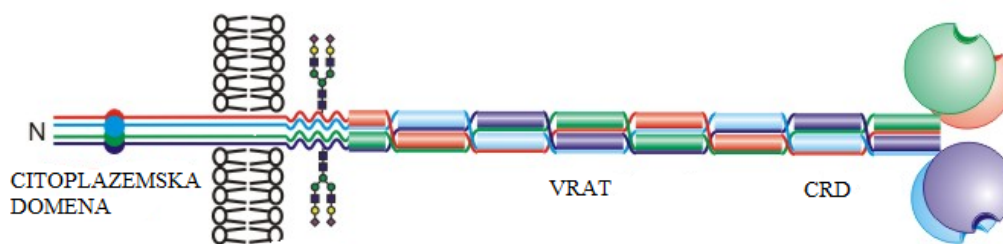
VPLETENOST V RAZLIČNE FUNKCIJE DENDRITIČNIH CELIC

DC-SIGN ima pomembno vlogo pri delovanju imunskega sistema (10). Receptor DC-SIGN prepozna različne patogene organizme (11). Primarna funkcija DC-SIGN je internalizacija antigenov, DC-SIGN ob vezavi liganda inducira internalizacijo, s čimer se izboljša predstavitev T-celicam s pomočjo PHK (poglavitni histokompatibilnostni kompleks). DC-SIGN ima torej pomembno vlogo kot receptor za antigene (12, 13, 14). Po vezavi antigenov in posledični aktivaciji, receptor DC-SIGN preko sinteze IL-4 vpliva na diferenciacijo DC iz monocitov. DC-SIGN omogoča migracijo dendritičnih celic, saj sodeluje pri premikanju DC po glikoziliranih površinah in adheziji DC na žilni endotelij (15). DC-SIGN sodeluje tudi pri aktivaciji T-celic, in sicer z vezavo na ICAM-3. S tem omogoča nespecifični stik med T-celicami in DC (16).

VEZAVA RAZLIČNIH LIGANDOV IN URAVNAVANJE IMUNSKEGA ODZIVA

DC-SIGN je odgovoren za prepoznavo glikanov, ki vsebujejo manozo ali fukozo. Te najdemo pri mnogih bakterijah, parazitih in virusih (17, 18). Poleg tega inducira tudi intracelularne signalne s čimer narekuje proces zorenja DC po vezavi antigena (14). DC so razvile poti, s katerimi regulirajo imunski sistem. DC-SIGN je vpleten v imunoregulacijo DC, saj deluje kot induktor imunskega sistema (14).

1.2.2 STRUKTURA DC-SIGN



Slika 2: Struktura DC-SIGN (26)

DC-SIGN je transmembranski protein, sestavljen iz treh delov: zunajceličnega, transmembranskega in citoplazemskega (19). Zunajcelični del vsebuje domeno CRD. Tvori globularno strukturo, sestavljeno iz 12-ih β -trakov, dveh α -vijačnic in treh disulfidnih mostov. Del proteina tvori zanko, ki je sestavljena iz dveh vezavnih mest za Ca^{2+} . Eno izmed teh vezavnih mest je odgovorno za konformacijo CTLD-ja, drugo pa za tvorbo vezi (8, 20, 21). Zunajcelični del (CRD) sestoji iz vratu, ki ga sestavljajo štiri verige. Vratu sledi transmembranska regija (TR), tej pa citoplazemska domena (8, 22).

1.2.3 LIGANDI DC-SIGN

DC-SIGN veže mnogo različnih ligandov. Posreduje med DC in T-celicami z vezavo na ICAM-3 in ICAM-2. Med drugim prepoznava tudi različne antigene na površini mikroorganizmov (14).

ICAM-3 vežejo DC z zelo visoko afiniteto (28). DC vežejo tudi ICAM-2, ne pa tudi ICAM-1. Z encimsko odstranitvijo ogljikovih hidratov, ki so vezani preko dušika preprečimo vezavo na DC-SIGN. Čeprav interakciji izkazujeta podobne lastnosti, DC-SIGN z ICAM-2 reagira drugače kot z ICAM-3, način interakcije pa je odvisen od ogljikohidratne strukture in velikosti molekule liganda (20, 21).

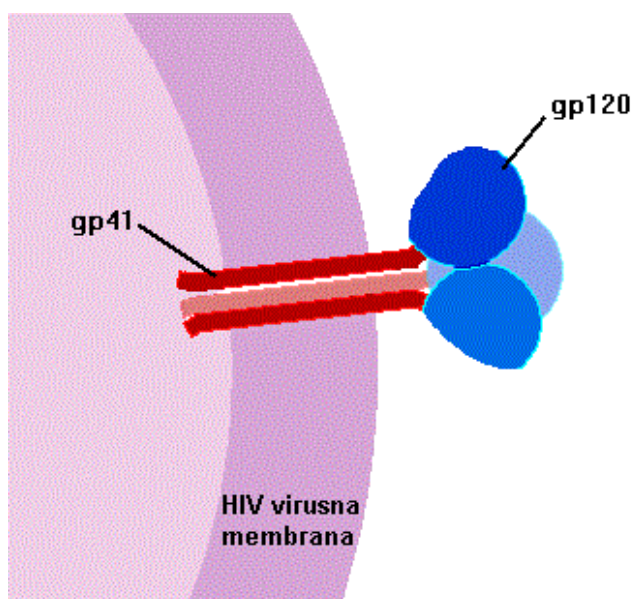
DC-SIGN veže glikoprotein gp120 virusa HIV-1. DC-SIGN ima posebno vezavno mesto za gp120, zato je vezava dugača kot v primeru vezave z ICAM-3 (14). DC-SIGN interagira tudi z visoko manoziliranimi oligosaharidi (23). Preko glikanov DC-SIGN interagira tudi z mnogimi različnimi patogeni, ki vsebujejo manozo ali fukozo (2).

Preglednica 2: Patogeni, ki jih veže DC-SIGN (2)

Patogen	Antigen	Ostali CLR-ji
<u>Virusi</u>		
HIV-1	gp120 (visoko manoziliran)	Manozni receptor in langerin
HIV-2	gp120	
SIV-1	gp120	
Ebola	glikoprotein (visoko manoziliran)	
Citomegalovirus	glikoprotein B	
Hepatitis C	E1/E2	
Denga	glikoprotein E	
<u>Bakterije</u>		
Helicobacter pylori	lipopolisaharid (Lewis-x)	
Mycobacteria	ManLAM (di-manoza, tri-manoza)	Manozni receptor
<u>Glive</u>		
Candida albicans	?	Manozni receptor
<u>Paraziti</u>		
Leshmania pifanoi	lipofosfoglikan (visoko manoziliran)	
Schistosoma mansoni	"Soluble egg antigen" (Lewis-x)	

1.2.3.1 PLAŠČNI GLIKOPROTEIN 120 (GP120)

Je glikoprotein z molekulsko maso 120. Najdemo ga na površini ovojnice virusa HIV. Prepoznajo ga različni receptorji (DC-SIGN, CD4). Plaščni glikoprotein 120 je vezan na transmembranski glikoprotein gp41 (Slika 2). Gp120 je bil eden prvih glikoproteinov, ki so ga uporabljali pri razvoju cepiva proti HIV-u. Razlog za to je prepoznavanje receptorja CD4, ki veže virus HIV pri okužbi. Virus HIV se preko gp120 lahko veže na DC-SIGN na površini DC, pri čemer pride do internalizacije virusa HIV v endosomom podobne kompartmente. Z vezavo nevtralizirajočega protitelesa b12 na gp120 lahko zavremo interakcijo virusa HIV s CD4+ celicami in tako transfekcijo virusa HIV iz DC na CD4+ (24).



Slika 3: Lokacija glikoproteina gp120 in gp41 na površini virusa HIV (25).

2. NAMEN DELA

V našem delu želimo ovrednotiti afiniteto potencialnih antagonistov (spojin sintetiziranih na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko kemijo) do receptorja DC-SIGN. Relativno afiniteto bomo ovrednotili tako, da bomo izvajali kompetitivni vezavni test med različnimi spojinami (potencialnimi antagonisti receptorja DC-SIGN) in z biotinom označenim ligandom gp120 ali bgp120. Gp120 je primeren ligand za tovrstno vrednotenje, saj se veže na CRD področje receptorja DC-SIGN, torej na vezavno mesto z visoko afiniteto za ogljikohidratne ligande. Poleg tega je gp120 smiselen ligand za DC-SIGN, saj je namen antagonistov DC-SIGN antiadhezivno delovanje oziroma preprečevanje adhezije patogenov, kot je virus HIV, na DC. Spojinam bomo določali inhibitorno koncentracijo IC_{50} . Za določanje inhibitornega delovanja antagonistov receptorja DC-SIGN bomo uporabljali kompetitivni vezavni test, ki je podoben ELISA metodi. To je encimsko-immunski test, ki se izvaja na mikrotitrski ploščici. Test temelji na tekmovanju vezave bgp120 s spojinami (potencialnimi antagonisti DC-SIGN) na receptor DC-SIGN. Rezultate bomo nato statistično obdelali in kvantitativno ovrednotili vezavo spojin, t.i. indirektno preko vrednosti inhibicije vezave gp120. Iz dobljenih rezultatov bomo nato določili konstante inhibicije IC_{50} za vsako testirano spojino upoštevajoč sigmoidni (logistični) model vezave. Te vrednosti nam omogočajo relativno primerjavo afinitete vezave potencialnih antagonistov DC-SIGN med seboj in so ključne za nadaljnji razvoj antagonistov DC-SIGN.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 REAGENTI IN TOPILA

Reagenti in topila so enaki, kot so predstavljeni v magistrskem delu Davida Hajška, mag. farm (2).

ANORGANSKI IN ORGANSKI REAGENTI

- **NaHCO₃**: natrijev hidrogenkarbonat, M = 84,01 g/mol, proizvajalec Merck KGaA, Nemčija
- **CaCl₂×2H₂O**: kalcijev klorid dihidrat, M = 147,02 g/mol, proizvajalec Acros Organics, Belgium
- **NaCl**: natrijev klorid, M = 58,44 g/mol, proizvajalec Fisher Scientific, ZDA
- **Tris**: tris (hidroksimetil) aminoetan, (CH₂OH)₃CNH₂, M = 121,14 g/mol, proizvajalec Fisher Scientific, ZDA
- **Tween[®] 20**: polioksietilen-(20)-sorbitanmonolavrat, M = 1227.54 g/mol, proizvajalec Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija

BIOKEMIJSKI REAGENTI

- **Anti-biotin kozja protitelesa konjugirana s hrenovo peroksidazo**: protitelesa proti biotinu konjugirana s hrenovo peroksidazo, c = 0,5 mg/ml, proizvajalec Calbiochem, ZDA.
- **Streptavidin**: je tetramerni protein, ki ga pridobivamo iz bakterije *Streptomyces avidinii*. Ima visoko afiniteto vezave z biotinom.
- **BSA**: goveji serumski albumin, liofiliziran prašek, proizvajalec Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija
- **DC-SIGN**: očiščen protein, proizveden v laboratoriju prof. dr. Francka Fieschi-a, Institut de Biologie Structurale (IBS), Francija
Shranjujemo pri -70°C. DC-SIGN je pri omenjeni temperaturi stabilen, izogibati pa se moramo večkratnemu odmrzovanju in zamrzovanju.

- **gp120:** rekombinantni plaščni glikoprotein 120 virusa HIV-1, ekspresijski sistem: človeške celice, proizvajalec Sino Biological Inc., Kitajska
- **NHS-biotin:** biotin N-hidroksisukcinimid ester (C₁₄H₁₉N₃O₅S), M = 341,4 g/mol, proizvajalec Merck KgaA, Nemčija
- **Reagent za kemiluminiscenco:** sestavljen iz reagenta A (pufrna raztopina, ki vsebuje luminol in 4-jodofenol) ter reagenta B (pufrna raztopina, ki vsebuje stabilizirano obliko H₂O₂), proizvajalec Roche Diagnostics GmbH, Nemčija.

TOPILA

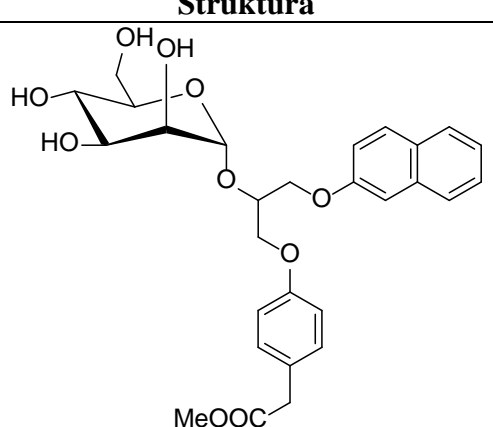
- **Bidestilirana voda**
- **DMF:** dimetilformamid (C₃H₇NO), M = 73,10 g/mol, proizvajalec Carlo Erba Reagenti SpA, Italija
- **DMSO:** dimetilsulfoksid, M = 78,13 g/mol, proizvajalec Acros Organics, Belgija

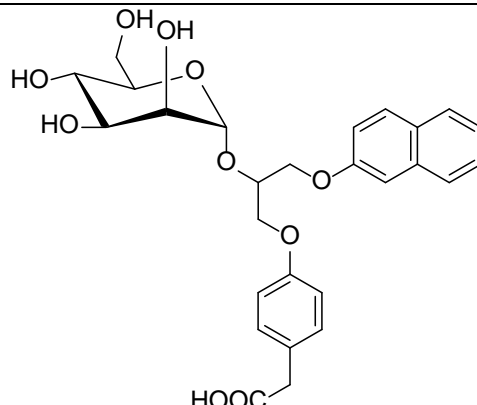
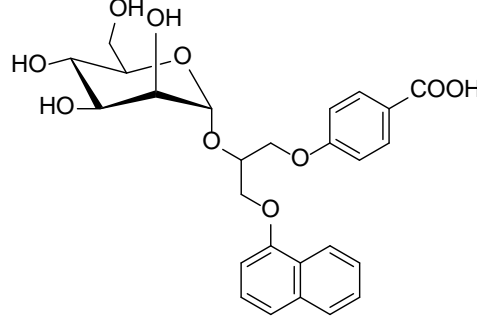
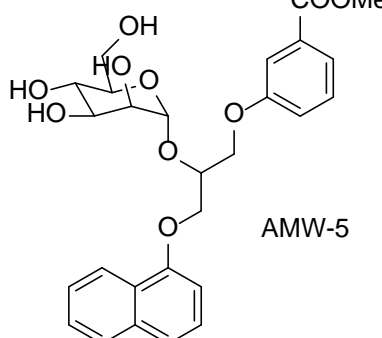
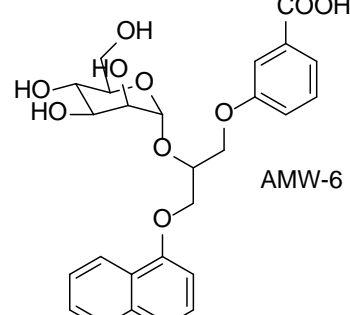
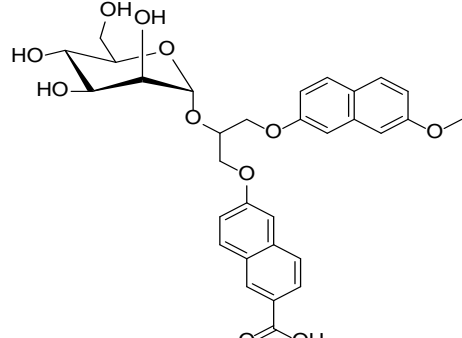
POTENCIALNI ANTAGONISTI DC-SIGN-A

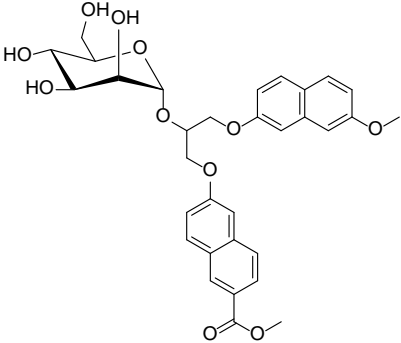
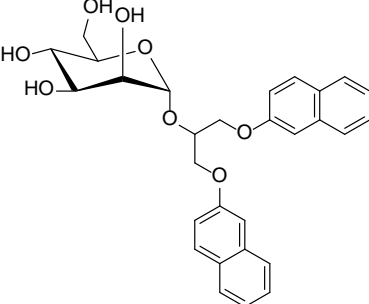
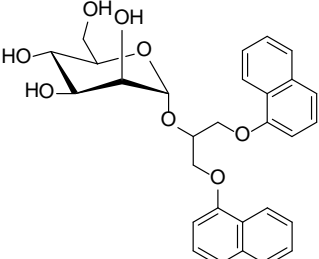
Za testiranja smo uporabljali potencialne antagoniste DC-SIGN-a sintetizirane na:

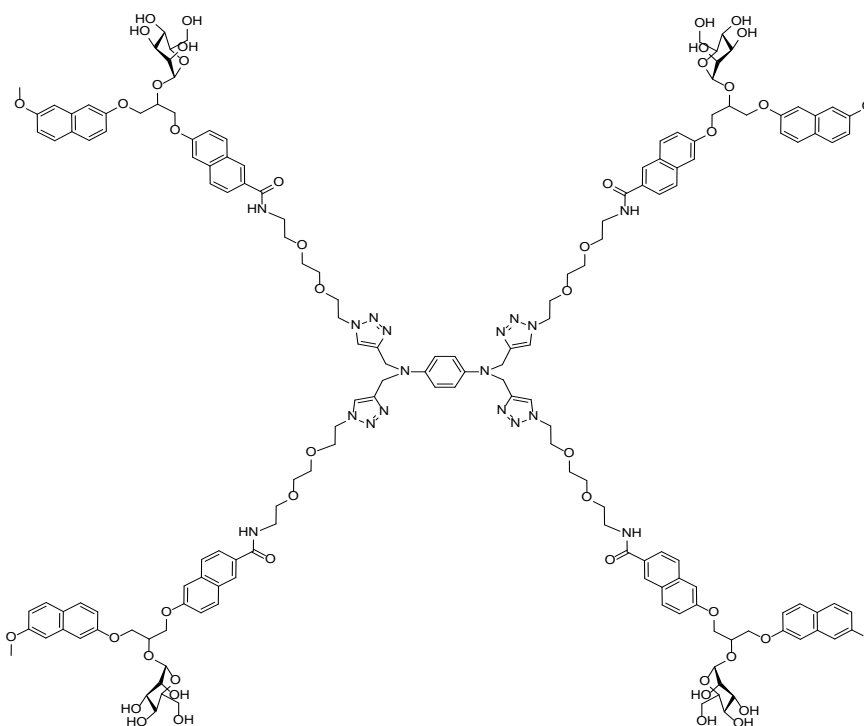
- Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko kemijo: AAL-17, AAL-18, AMA-21, AMW-5, AMW-6, TKV-19, TKV-21, TSV-20, TSZ-15, TTD-35, TTD-38, TTD-39

Preglednica 3: Testirani potencialni antagonisti DC-SIGN-a

Oznaka	Struktura	M[g/mol]	m [mg]
UL-AAL-17		528.55	40.2

Oznaka	Struktura	M[g/mol]	m [mg]
UL-AAL-18		514.53	71.3
UL-AMA-21		500.50	4,78
UL-AMW-5		514,53	
UL-AMW-6		500,50	
UL-TKV-19		580.59	4,80

Oznaka	Struktura	M[g/mol]	m [mg]
UL-TKV-21		594.61	6,32
UL-TSV-20		506.54	4,32
UL-TSZ-15		506,54	7,14



Slika 4: Struktura dendrona, spojine UL-TTD-39

3.1.2 OPREMA

- **Mikropipete, elektronske mikropipete in elektronske multipipete:** proizvajalec Biohit Deutschland GmbH, Nemčija
- **Mikrotitrne ploščice**
- **Graduirane plastične epruvete z zamaški**
- **Bio-Pure kadičke za nanos z multipipeto:** proizvajalec Diversified Biotech, ZDA
- **Epice:** proizvajalcev Eppendorf AG, Nemčija in Brand GmbH & Co.KG, Nemčija
- **Plastične epruvetke z zamaški in stojalo zanje:** 1 ml, proizvajalec Brand GmbH & Co.KG, Nemčija
- **Dializni kit:**
 - dializno črevo
 - dializni kit ZelluTrans
 - proizvajalec Carl Roth, GmbH & Co., Nemčija
- **Steklovina:** erlenmajerice, čaše in steklenice različnih velikosti, kapalka z mešičkom

3.1.3 APARATURA

- **Tehnika:** Mettler Toledo AG245
- **Avtoklav:** Systec
- **Bidestilator:** Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System
- **Hibridni čitalec mikrotitrskih ploščic:** Synergy H4 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader
- **Mešalo vorteks:** Vibromix 10
- **Mini centrifuga:** GMC-060
- **pH meter:** Mettler Toledo MP220
- **Stresalnik**

3.2 METODE

3.2.1 IMUNOKEMIJSKA METODA

3.2.1.1 ELISA/EIA

ENCIMSKO IMUNSKA METODA (ELISA) oziroma EIA je encimsko imunska metoda, ki jo uporabljamo za detekcijo protiteles ali antigenov v vzorcu. Je pogosta laboratorijska metoda, ki se izvaja na mikrotitrskih ploščicah. Kadar v vzorcu določamo specifična protitelesa govorimo o posredni (indirektni) ELISI, kadar pa določamo prisotnost antigena, govorimo o direktni - sendvič ELISI. Encimi, ki jih pri ELISI najpogosteje uporabljamo so: hrenova peroksidaza (HRP), alkalna fosfataza (AP) in β -D-galaktozidaza (β -GAL). Encim deluje na substrat zaradi česar se tvori obarvan produkt (kompleks). Nastali kompleks merimo spektrofotometrično (27) ali s katero drugo metodo, v našem primeru kemiluminiscenco. S protitelesi proti biotinu, ki imajo konjugirano peroksidazo lahko kataliziramo reakcijo oksidacije ftalhidrazinskega derivata z vodikovim peroksidom, pri čemer pride do emisije t.i. »hladne svetlobe« oz. do pojava kemiluminiscence.

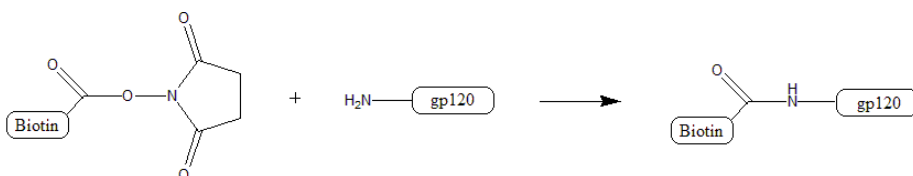
Pri testu ELISA za določanje specifičnih protiteles na mikrotitrsko ploščo najprej vežemo plast antigena, nato pa dodamo vzorec, ki vsebuje protitelesa proti vezanemu antigenu. Nastane kompleks Ag-Ab. Nato vezana protitelesa označimo s sekundarnimi protitelesi, ki imajo kovalentno vezan encim. Encim po dodatku substrata tvori obarvan produkt. Intenziteto obarvanega produkta določimo spektrofotometrično ali s kakšno drugo metodo. V vmesnih stopnjah postopka sledi spiranje, da odstranimo tisto kar se ni vezalo (27).

Pri testu za določanje prisotnosti antigena v vzorcu (sendvič ELISI), adsorbiranemu protitelesu, ki je vezano na mikrotitrsko ploščico dodamo vzorec, ki predstavlja antigen, ki ga določamo. Nastane kompleks Ag-Ab. Nastalemu kompleksu dodamo sekundarno protitelo, ki je označeno z encimom (detektorsko protitelo). Nato pa dodamo substrat, pri čemer se tvori obarvan produkt. Obarvani produkt merimo spektrofotometrično ali s podobno metodo (27).

3.2.1.2 KONJUGACIJA Z BIOTINOM (BIOTINILACIJA)

Biotinilacija je proces, pri katerem se kovalentno veže molekula biotina na površino tarčne molekule. Naravni ligand gp120, ki se nahaja na površini humanega virusa HIV-1, je predstavljal tarčno molekulo. Ligand gp120 smo biotinilirali, pri čemer je potekla kovalentna vezava biotina na gp120 s pomočjo aktiviranega estera NHS-biotina. S tem smo ustvarili specifičen antigen za protitelesa proti biotinu konjugirana s hrenovo peroksidazo, ki katalizira kemiluminiscenčno reakcijo.

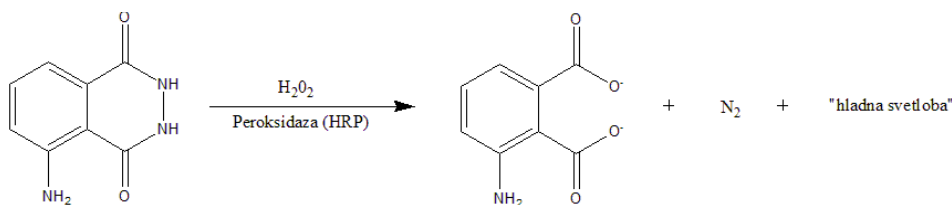
Z NHS-biotinom ciljamo amine, ki so pogosto ciljana funkcionalna skupina zaradi prisotnih *N*-terminalnih α -aminov in ϵ -aminov na lizinu v stranskih verigah v večini proteinov. Pri konjugaciji se tvori amidna vez med z *N*-hidroksisukcinimidom (NHS) aktivirano karboksilno kislino biotina in amino skupino na proteinu, pri čemer izstopi NHS (1).



Slika 5: Biotinilacija proteina gp120 (2)

3.2.1.3 KEMILUMINISCENCA

Kemiluminiscenca je sevanje svetlobe (emisija) kot rezultat kemijske reakcije. Za pojav sta navadno potrebna dva reaktanta in ustrezen katalizator (29). Encim hrenova peroksidaza (HRP) v prisotnosti vodikovega peroksida katalizira reakcijo oksidacije luminola (5-amino-2,3-dihidro-ftalazin-1,4-dion). Produkt reakcije pri prehodu iz višjega energijskega stanja v osnovno energijsko stanje oddaja svetlobo (30).



Slika 6: Kemiluminiscenca (2)

3.2.2 STATISTIČNE METODE

3.2.2.1 Z-FAKTOR

Z-faktor je statistični parameter, ki se uporablja za oceno ustreznosti testnega sistema. Z-faktor zagotavlja uporabno orodje za primerjavo in oceno kakovosti testov, ki jih je mogoče uporabiti med optimizacijo in validacijo (3). Z-faktor je odvisen od povprečnih vrednosti in standardnih deviacij pozitivne in negativne kontrole. Izračunamo ga iz naslednje enačbe 1:

$$Z' = 1 - \frac{(3\sigma_{c+} + 3\sigma_{c-})}{|\mu_{c+} - \mu_{c-}|} \quad [1]$$

σ_{c+} - standardna deviacija odziva pozitivnih kontrol σ_{c-} - standardna deviacija odziva negativnih kontrol

μ_{c+} - povprečna vrednost odziva pozitivnih kontrol μ_{c-} - povprečna vrednost odziva negativnih kontrol

Preglednica 4: Interpretacija faktorja Z (3)

Z-faktor	Interpretacija
1.0	Idealno, Z-faktor ne presega vrednosti 1.
0.5 - 1.0	Odličen test.
0 – 0.5	Mejni test.
Manj kot 0	Test ni ustrezen, preveliko prekrivanje rezultatov.

3.2.2.2 RAZMERJE MED ODZIVOM IN ŠUMOM (S/N) IN ODZIVOM IN OZADJEM (S/B)

S/N razmerje nakazuje stopnjo zaupanja, s katero lahko signal označimo kot odziv, ki ni posledica šuma, S/B razmerje pa ne vsebuje informacij o variabilnosti podatkov (2). Razmerje med odzivom in šumom (S/N razmerje) ter razmerje med odzivom in ozadjem (S/B razmerje) sicer ne podata dovolj informacij za oceno ustreznosti testnega sistema.

4. EKSPERIMENTALNO DELO

Pri eksperimentalnem delu smo testirali različne spojine antagonistov receptorja DC-SIGN ter spojinam določali inhibitorno koncentracijo IC_{50} . Za določanje afinitete antagonistov receptorja DC-SIGN uporabljamo kompetitivni vezavni test, ki je test podoben ELISA metodi. Test temelji na kompeticiji vezave bgp120 s spojinami antagonistov na receptor DC-SIGN. Kupili smo tudi streptavidin, konjugiran s hrenovo peroksidazo, in ga primerjali z anti-biotin kozjimi protitelesi, konjugiranimi s hrenovo peroksidazo, ki jih običajno uporabljamo pri metodi.

4.1 SPLOŠNI POSTOPKI

Pod splošne postopke štejejo postopki, ki smo jih potrebovali pri pripravi mikrotitrne ploščice, potrebnih pufrov za redčenje, spiranje in dializo ter postopek priprave biotiniziranega gp120 (2).

4.1.1 PRIPRAVA PUFROV

Preglednica 5: Masa potrebnih reagentov za pripravo 1000 ml pufra za redčenje

<u>Reagent</u>	<u>Masa (g)</u>
Tris	3,026
NaCl	8,766
CaCl ₂ X H ₂ O	0,586

Preglednica 6: Količina potrebnih reagentov za pripravo 1000 ml pufra za spiranje

<u>Reagent</u>	<u>Količina</u>
Tris	3,028 g
NaCl	8,766 g
CaCl ₂ X H ₂ O	0,586 g
Tween 20 (1%)	10 ml

Preglednica 7: Količina potrebnih reagentov za pripravo 1000 ml dializnega pufra

<u>Reagent</u>	<u>Masa (g)</u>
Tris	3,028
NaCl	8,766
CaCl ₂ X H ₂ O	0,588

Pufre smo pripravili tako, da smo najprej natehtali ustrezne količine reagentov za pripravo posameznega pufra. Nato smo pufer dopolnili z bidestilirano vodo do 90 % končnega volumna. Ob mešanju z magnetnim mešalom smo s pomočjo 4M klorovodikove kisline uravnali pH pufra na 7,4. Pufer smo nato dopolnili z bidestilirano vodo do končnega volumna. Pri pufu za spiranje smo po dopolnitvi do končnega volumna dodali še 10 ml 1% Tweena 20.

4.1.2 PRIPRAVA BIOTINILIRANEGA GP120

Naravni ligand gp120 (glikoprotein z molsko maso 120), ki se nahaja na površini humanega virusa HIV-1, smo biotinilirali, pri čemer je potekla kovalentna vezava NHS biotina na gp 120. S tem smo povečali specifičnost antigena za protitelesa proti biotinu konjugirana s hrenovo peroksidazo, ki katalizira kemiluminiscenčno reakcijo.

Biotinilacija je potekala po naslednjem protokolu.

1.) Priprava raztopine proteina gp120 v 0,05 M NaCl

Najprej smo natehtali 0,146 g NaCl in ga raztopili v 50 ml bidestilirane vode (s tem smo pripravili 0,05 M raztopino NaCl). Nato smo vzeli stekleničko s 100 µg proteina gp120 in ga raztopili v 300 µl 0,05 M raztopine NaCl.

2.) Priprava raztopine NHS-biotina v DMF

Natehtali smo 1,26 mg NHS-biotina in ga raztopili v 1 ml DMF-a.

3.) Priprava reakcijske zmesi za biotinilacijo

Najprej smo natehtali 2,1 g NaHCO₃ in ga raztopili v 25 mL bidestilirane vode v 50 mL centrifugirni epruveti (dobili smo 1M raztopino NaHCO₃). Nato smo pripravili reakcijsko zmes.

- najprej smo v 2 mL mikroepreveto dodali 600 µl bidestilirane vode,
- nato smo dodali 100 µL 1 M raztopine NaHCO₃,
- potem smo dodali 300 µL 0,05 M raztopine NaCl v raztopini gp120,

- in na koncu še 100 μ L pripravljene raztopine NHS-biotina v DMF.

4.) Biotinilacija

Zmes smo ob rahlem mešanju z magnetnim mešalom inkubirali 1 h.

5.) Dializa

Dializa je namenjena ločevanju biotiniliranega gp120 od nevezanega NHS-biotina. Ta pri dializi difundira skozi pore dializnega črevesa v dializni pufer. Z dializo ločimo naš NHS-biotin, ker moti nadaljnjo določitev kemijske reakcije pri testnem sistemu.

Najprej smo pripravili dializno črevo, ki je moralo biti ustrezne dolžine. Nato smo ga za nekaj minut namočili v dializni pufer, da se je ovlažilo. Nato smo dializno črevo previdno izvili, ga namestili na plastični nastavek, na vrhu zatesnili z gumico in ga na dnu zaprli s plastično sponko. Zatem smo ga s stekleno kapalko napolnili z raztopino biotiniliranega gp 120. Napolnjeno dializno črevo smo potopili v 1L erlenmajerico, ki je bila napolnjena z dializnim pufrom. Pufer smo rahlo mešali z magnetnim mešalom, pri čemer smo morali biti pozorni, da se črevo ni zvijalo, saj bi se lahko pretrgalo. Dializo smo izvajali 1 h. Postopek smo ponovili 3 \times , vsakič s svežo menjavo dializnega pufera. Po treh dializah smo dializno raztopino s stekleno kapalko prenesli v 15 mL plastično epruveto ter dopolnili s pufrom za redčenje do 5 ml. S tem smo dobili osnovno raztopino biotiniliranega gp120 s približno vsebnostjo proteina 20 μ g/mL.

6.) Shranjevanje

Raztopino bgp120 smo nato hranili v hladilniku (2-8 $^{\circ}$ C).

4.1.3 PRIPRAVA MIKROTITRSKE PLOŠČICE

Receptor DC-SIGN smo hranili v zamrzovalniku pri -70 $^{\circ}$ C. Receptor DC-SIGN smo najprej razdelili na 25 alikvotov, v vsako Eppendorfovo epruveto smo dali po 2 μ L raztopine DC-SIGN-a s koncentracijo 10 mg/mL. Nato smo en alikvot uporabili, ostalih 24 pa pustili zamrznjenih. S tem smo se izognili večkratnemu odmrzovanju in zamrzovanju proteina. Vsak alikvot je vseboval po 20 μ g DC-SIGN-a. Najprej smo vsebino enega alikvota segreli na sobno temperaturo, ga kvantitativno prenesli v 15 mL plastično epruveto in s pufrom za redčenje dopolnili do 10,2 mL. Raztopino smo nato homogeno premešali, s tem smo dobili koncentracijo DC-SIGN-a 20 μ g/10,2 mL pufera. Nato smo 5,1 mL (polovično vsebino) raztopine 20 μ g/10,2 mL pufera prenesli v drugo plastično epruveto in s pufrom dopolnili do 10,2 mL. Dobili smo koncentracijo raztopine 10 μ g/10,2 mL pufera. Nato smo zopet polovično

vsebinsko druge epruvete prenesli v tretjo in s pufrim dopolnili do 10,2 mL in dobili koncentracijo 5 µg/10,2 mL pufr. Mikrotitrsko ploščico smo razdelili na 3 dele glede na različno koncentracijo DC-SIGN-a. S tem smo želeli preveriti kakšna količina DC-SIGN-a ustreza za dober odziv metode ter ustrezno razmerje med signalom in šumom. S pomočjo večkanalne pipete smo v vdolbinice na mikrotitrski ploščici nanesti po 100 µL pripravljene raztopine. Ploščico smo potresli, s tem smo se znebili zračnih mehurčkov v vdolbinicah, potem pa smo jo čez noč (12-24 h) inkubirali v hladilniku (2-8°C), pri čemer je potekla vezava receptorja na ploščico.

➤ VEZAVA RECEPTORJA DC-SIGN NA MIKROTITRSKO PLOŠČICO

V vsakem alikvotu imamo po 20 µg DC-SIGN-a. Ugotovili smo, da je koncentracija DC-SIGN-a 5 µg/10,2 mL pufr najbolj optimalna koncentracija za vezavo našega bgp 120, saj smo pri tej koncentraciji dosegli najboljši odziv metode in razmerje med signalom in šumom ob čim manjši porabi proteina, zato smo jo tudi uporabili pri nadaljnjih testiranjih. 2 µL DC-SIGN-a dopolnimo z 38 µL pufr za redčenje in homogeno premešamo s pipeto. Iz tako pripravljene raztopine vzamemo 10 µL in dodamo v 10,2 mL pufr za redčenje. S tem dobimo koncentracijo raztopine 5 µg/10,2 mL. Nato nanesimo na ploščico po 100 µL raztopine na vdolbinico in rahlo potresemo. Sledi inkubacija, ki poteka čez noč (12-24h) v hladilniku (2-8°C), pri čemer potече vezava receptorja na ploščico.

➤ BLOKIRANJE PROSTIH VEZAVNIH MEST NA MIKROTITRSKI PLOŠČICI

V 50 mL plastično epruveto smo natehtali 250 mg BSA (albuminski prašek govejega seruma) in dopolnili s pufrim za redčenje do 25 mL. Dobili smo 25 mL 1% raztopine BSA. Raztopino smo nato z uporabo magnetnega mešala 10 minut previdno mešali, saj bi ob prehitrem mešanju prišlo do penjenja. Nato smo iz mikrotitrski ploščice z vezanim proteinom, iz prejšnjega dne odstranili raztopino iz vdolbinic tako, da smo ploščico obrnili in z zamahi odstranili raztopino. Po stresanju smo ploščico dobro osušili. Nato smo na ploščico nanesti po 200 µL pripravljene 1% raztopine BSA na vdolbinico. Sledila je 1 ura inkubacije pri sobni temperaturi. Med inkubacijo je potekala vezava BSA-ja na prosta vezavna mesta na ploščici. Z vezavo BSA smo preprečili kovalentno vezavo naravnega liganda bgp120 na mikrotitrsko ploščico. Na ta način smo izboljšali razmerje med signalom in šumom ter specifičnost metode.

➤ **PRIPRAVA IN NANOS POTENCIALNIH ANTAGONISTOV IN OZNAČENEGA LIGANDA BGP-120**

Po inkubaciji z BSA najprej odstranimo raztopino iz vdolbinic tako, da ploščico sunkovito obrnemo in iztresemo vsebino raztopine. V vdolbinice odpipetiramo po 300 µL puфра za spiranje in postopek ponovimo 3x, vsakič s svežo zamenjavo puфра. Po zadnjem spiranju ploščico dobro osušimo, saj bi lahko prišlo do razredčenja raztopine z antagonistom in bgp120.

PRIPRAVA LIGANDA BGP 120: V 15 mL epruveto damo 325 µL pripravljene raztopine bgp 120 in 4875 µL puфра za redčenje (dopolnimo do 5,2 mL).

PRIPRAVA RAZTOPIN ANTAGONISTOV: Osnovne raztopine antagonistov smo pripravljali v DMSO. Najprej smo po enačbi 2 izračunali potreben volumen DMSO (dimetilsulfoksid), ki ga potrebujemo za posamezno spojino s koncentracijo 50 mM. Nato smo posamezni spojini dodali potreben volumen DMSO-ja in jo raztopili. Določene spojine so se pri koncentraciji 50 mM izobarjale zato smo jih redčili, izbrali koncentracijo 10 mM ter preračunali potreben volumen dodanega DMSO-ja.

$$C = n/V \quad n = m/M \quad [2]$$

Uporabili smo že pripravljene spojine antagonistov in jih najprej segreli na sobno temperaturo, da so se raztopile in jih nato dobro premešali. Za pripravo raztopine spojine s koncentracijo 1,0 mM smo potrebovali 6 µL osnovne 50 mM raztopine v DMSO («stock») in 294 µL puфра za redčenje z dodatkom 1% DMSO. Tega smo pripravili tako, da smo k 49,5 mL puфра za redčenje dodali 0,5 mL DMSO. Za pripravo spojine s koncentracijo 5 mM smo potrebovali 30 µL osnovne raztopine in 270 µL puфра za redčenje v 1% DMSO. Če so se spojine še naprej izobarjale smo pripravili še nadaljnje redčitve spojin.

NANOS ANTAGONISTOV IN LIGANDA BGP 120:

Na mikrotitrsko ploščico smo na vdolbinico nanесли po 50 µL raztopin antagonistov in 50 µL bgp 120. Za negativno kontrolo smo dodali 100 µL puфра za redčenje, kot pozitivno kontrolo pa 50 µL bgp120 in 50 µL puфра za redčenje. Ploščico smo inkubirali 2 uri na sobni temperaturi.

➤ **PRIPRAVA IN NANOS STREPTAVIDINA ALI PROTITELES
KONJUGIRANIH S HRENOVO PEROKSIDAZO**

Po inkubaciji z raztopinama antagonistov in bgp120 je zopet sledilo spiranje s pufrom, 3 krat 300 μ L pufru za spiranje, vsakokrat po 5 minut.

Pred pripravo smo najprej sterilizirali nastavke za pipete v avtoklavu (121°C). S tem smo preprečili kontaminacijo izvorne raztopine protiteles. V 15 mL epruveto smo odpipetirali 1,2 mL predhodno pripravljene 1 % raztopine BSA in dopolnili do 12 mL s pufrom za redčenje (dodamo 10,8 mL pufru za redčenje). S sterilnim nastavkom smo raztopini BSA dodali 20 μ L anti-biotin kozjih protiteles oziroma streptavidina. Z vezavo streptavidina na NHS-biotin smo želeli preprečiti nespecifično vezavo spojin in s tem izboljšati učinkovitost metode. Zato smo ga želeli primerjati s protitelesi konjugiranimi s hrenovo peroksidazo, ki jih ponavadi uporabljamo pri metodi. Nato smo v vsako vdolbinico nanесли po 100 μ L pripravljene raztopine protiteles. Ploščico smo nato inkubirali 1 uro.

➤ **PRIPRAVA IN NANOS KEMILUMINISCENČNEGA REAGENTA**

Po inkubaciji s protitelesi je zopet sledilo spiranje s pufrom. Izpirali smo 3 krat po 300 μ L pufru za spiranje, vsakokrat po 5 minut. Nato pa ploščico dobro osušili. Zatem smo v plastično epruveto odpipetirali 6 mL reagenta A (raztopina, ki vsebuje luminol in 4-jodofenol) in 60 μ L reagenta B (raztopina, ki vsebuje vodikov peroksid). Nato smo pripravljeno raztopino mešali z magnetnim mešalom 15 minut. V vsako vdolbinico smo zatem nanесли po 50 μ L pripravljenega reagenta, potresli in količino sproščene svetlobe merili na mikrotitrskem čitalcu BioTek Synergy H4. Vsakič smo izvedli po tri meritve. Pred samim merjenjem smo v programu Gen5™ definirali protokol samega postopka meritve. Pri meritvi smo uporabili ekscitacijsko svetlobo valovne dolžine 495 nm, emitirano svetlobo pa smo detektirali pri valovni dolžini 525 nm.

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 REZULTATI ODZIVA NA MIKROTITRSKI PLOŠČICI V PRIMERJAVI MED »SVEŽE PRIPRAVLJENIM« IN »STARIM« BGP120

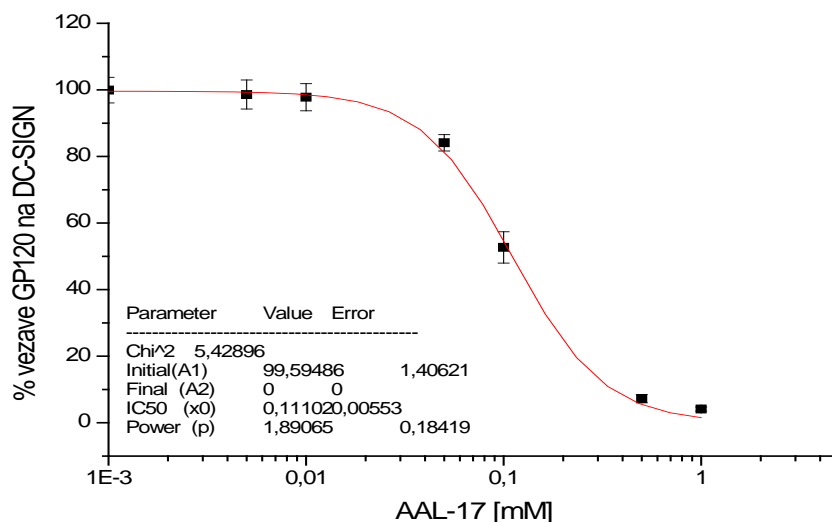
Preglednica 8: Rezultati odziva na mikrotitrski ploščici v primerjavi med »sveže pripravljenim« in »starim« bgp120

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	127	223	263	177	150	113	197	153	230	93	170	110
B	343687	354860	354997	353347	104307	99503	95947	84063	14010	13857	11137	10157
C	338333	353013	345243	351767	123070	99800	93743	89737	15797	13533	11983	10333
D	329313	345157	337900	343753	122303	98463	94960	89570	14620	12877	11177	10210
E	227427	239717	249720	241223	29180	18627	16037	14650	1660	1447	1307	1253
F	163	273	227	253	207	183	153	193	117	117	293	157
G	197	77	200	173	120	150	120	173	137	170	97	203
H	103	203	77	177	150	170	113	190	190	140	137	137

V vrstice B-E smo nanesti raztopino sveže pripravljene bgp120 v zadnje tri vrstice (F-H) pa raztopino »starega« bgp120. Ugotovimo, da je sveže pripravljen bgp120 bolj učinkovit od »starega«, saj dobimo višje vrednosti vezave na receptor in s tem večji odziv metode.

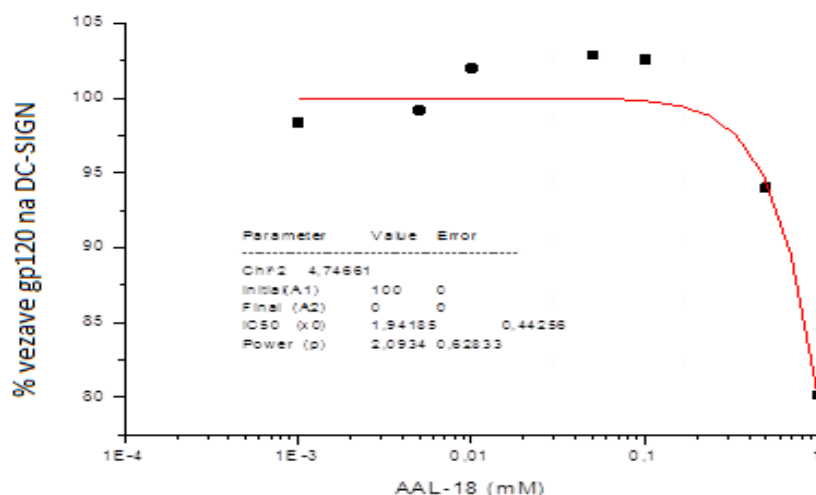
5.2 REZULTATI DOLOČANJA RELATIVNE AFINITETE POTENCIALNIH ANTAGONISTOV RECEPTORJA DC-SIGN

Po izvedbi testa za določanje relativne afinitete potencialnih antagonistov receptorja DC-SIGN smo opravili kemiluminiscenčno merjenje signala na mikrotitrskem čitalcu BioTek Synergy H4. Vsakič smo izvedli po tri meritve. Pred samim merjenjem smo v programu Gen5™ definirali protokol samega postopka meritve. Podatke smo računalniško obdelali s programoma Microsoft Excel in Origin® 8.0. Po obdelavi podatkov smo dobili graf s sigmoidno krivuljo, podatke o začetni in končni vrednosti, vrednosti v točki prevoja (IC50) in standardnih deviacijah.



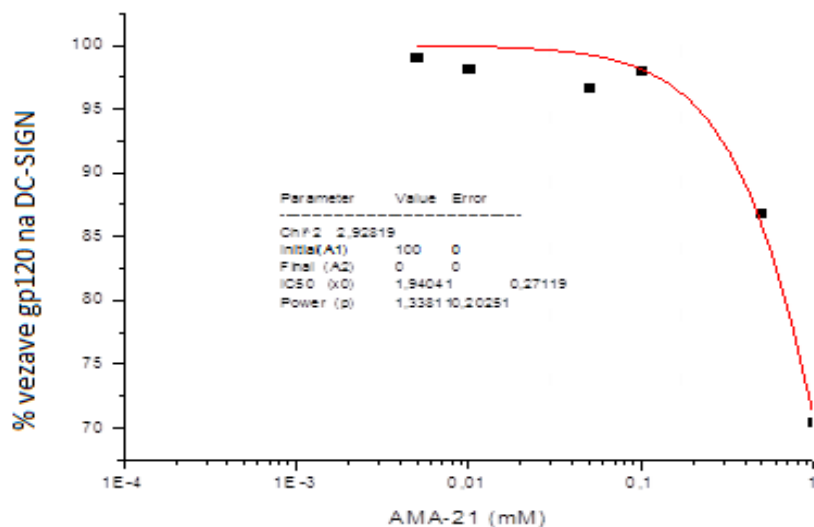
Slika 7: Delež vezave gp120 na DC-SIGN v odvisnosti od koncentracije AAL-17

Rdeče obarvana krivulja predstavlja krivuljo sigmoidnega modela vezave, ki omogoča izračun IC₅₀ v prevoju krivulje. Pri spojini AAL-17 smo dobili odlično korelacijo izmerjenih vrednosti inhibicije z modelno sigmoidno krivuljo. Poleg tega smo uporabili ustrezne koncentracijske vrednosti, saj te pokrivajo vse tri teoretične »dele« sigmoidne krivulje (prvi plato, prevoj, drugi plato), poleg tega pa smo dosegli popolno inhibicijo vezave gp120. Spojina dobro zavira vezavo bgp120.



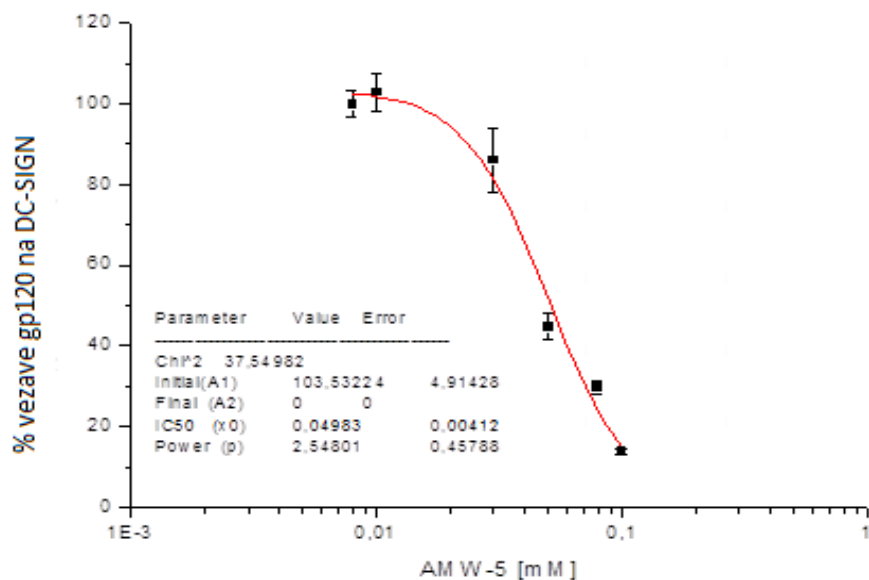
Slika 8: Delež vezave gp120 na DC-SIGN v odvisnosti od koncentracije AAL-18

Spojina AAL-18 v testiranih koncentracijah ni uspela popolnoma zavreti vezavo gp120, ker je spojina prešibek ligand za DC-SIGN. Zaradi tega določena vrednost IC₅₀ ni zanesljiva.



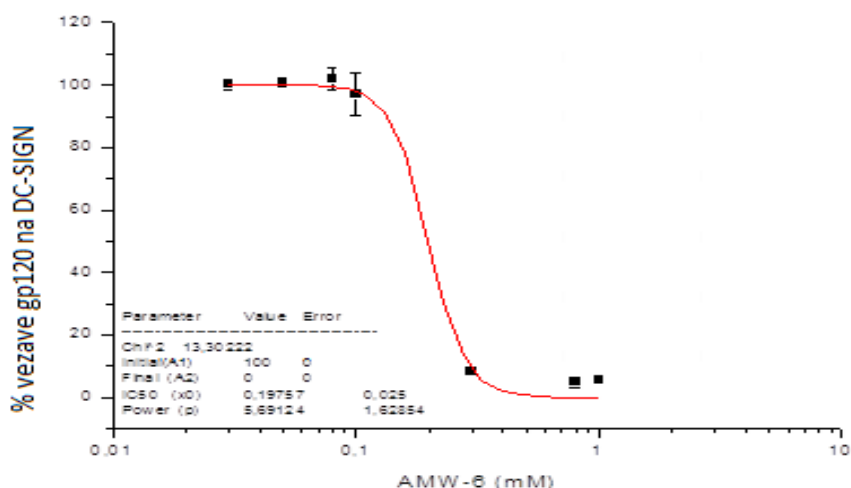
Slika 9: Delež vezave gp120 na DC-SIGN v odvisnosti od koncentracije AMA-21

IC₅₀ nismo mogli določiti, ker je spojina prešibek ligand za DC-SIGN. Vzrok je lahko v opaženem izobarjanju spojine.



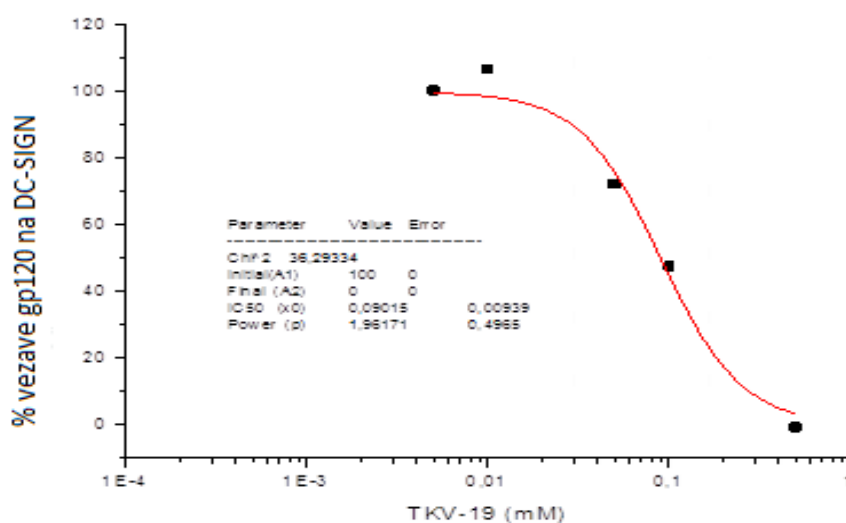
Slika 10: Delež vezave gp120 na DC-SIGN v odvisnosti od koncentracije AMW-5

Pri spojini AMW-5 dobimo ustrezne vrednosti, ki nam omogočajo izračun IC₅₀, spojina dobro zavira vezavo bgp120.



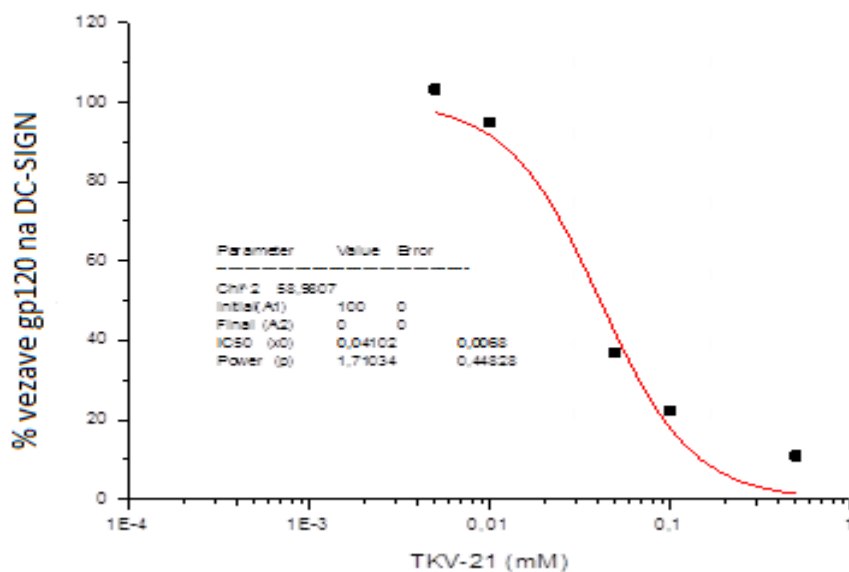
Slika 11: Delež vezave gp120 na DC-SIGN v odvisnosti od koncentracije AMW-6

Tudi pri spojini AMW-6 dobimo ustrezne vrednosti, saj nam omogočajo izračun IC_{50} , spojina dobro zavira vezavo bgp120. Poleg tega koncentracijske vrednosti dobro pokrivajo vse teoretične dele sigmoidne krivulje.



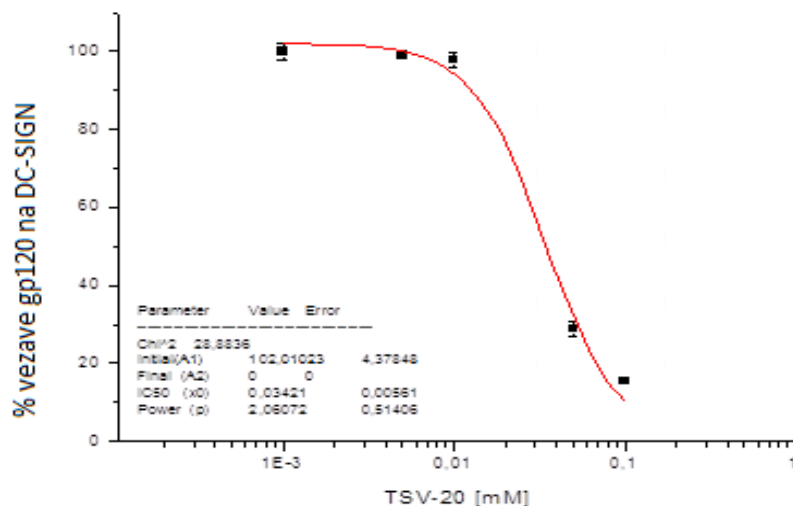
Slika 12: Delež vezave gp120 na DC-SIGN v odvisnosti od koncentracije TKV-19

Spojina TKV-19 ima zelo visoko afiniteto do DC-SIGN in pričakovano je bilo, da dobro zavira vezavo bgp120. Spojino smo še dodatno razredčili pri vmesnih koncentracijah in s tem bolj točno ocenili IC_{50} . Dobili smo ustrezne vrednosti, ki so nam omogočile določitev IC_{50} . Koncentracijske vrednosti nam dobro pokrivajo območje sigmoidne krivulje.



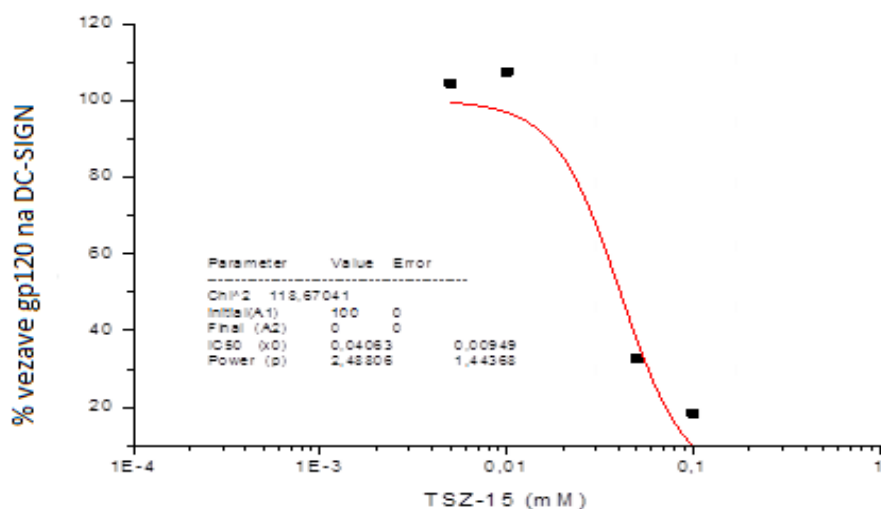
Slika 13: Delež vezave gp120 na DC-SIGN v odvisnosti od koncentracije TKV-21

Pri spojnini TKV-21 smo dobili sprejemljive rezultate in dosegli ustrezno inhibicijo vezave gp120 z določitvijo IC_{50} . Spojina kar dobro pokriva področje sigmoidne krivulje.



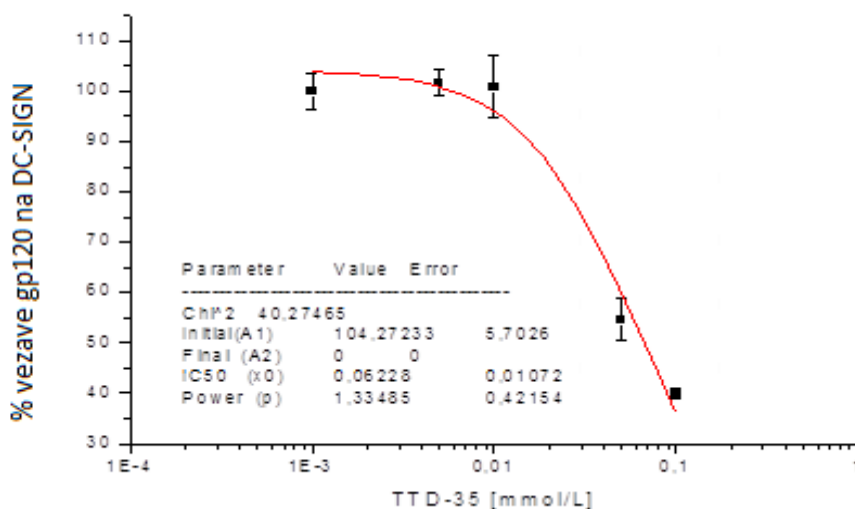
Slika 14: Delež vezave gp120 na DC-SIGN v odvisnosti od koncentracije TSV-20

Spojina TSV-20 se je izobarjala, zato smo jo ustrezno razredčili, da smo razširili območje sigmoidne krivulje. Dobili smo zadovoljive vrednosti IC_{50} in dosegli ustrezno inhibicijo vezave gp120.



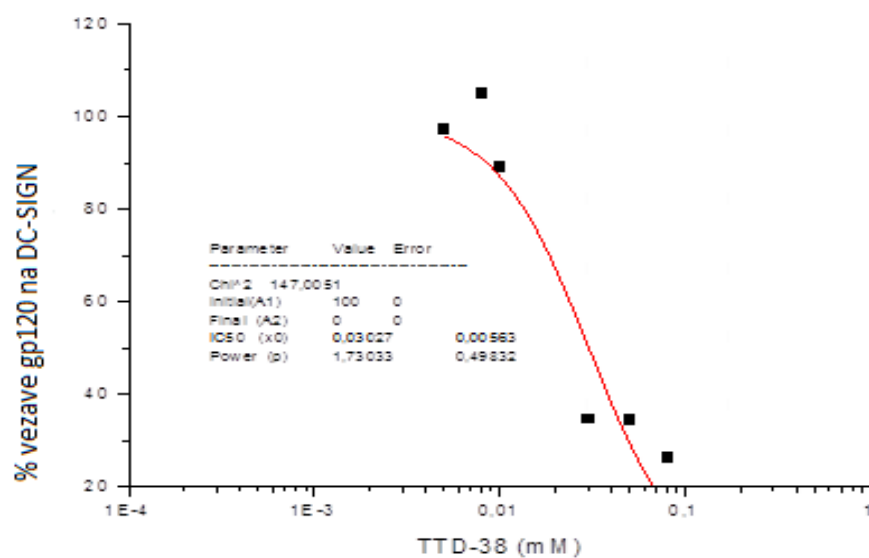
Slika 15: Delež vezave gp120 na DC-SIGN v odvisnosti od koncentracije TSZ-15

Spojina TSZ-15 je močna spojina, saj dobro zavira vezavo gp120. Spojina se je najprej izobarjala, zato smo pripravili vmesne redčitve, da smo natančneje določili IC₅₀.



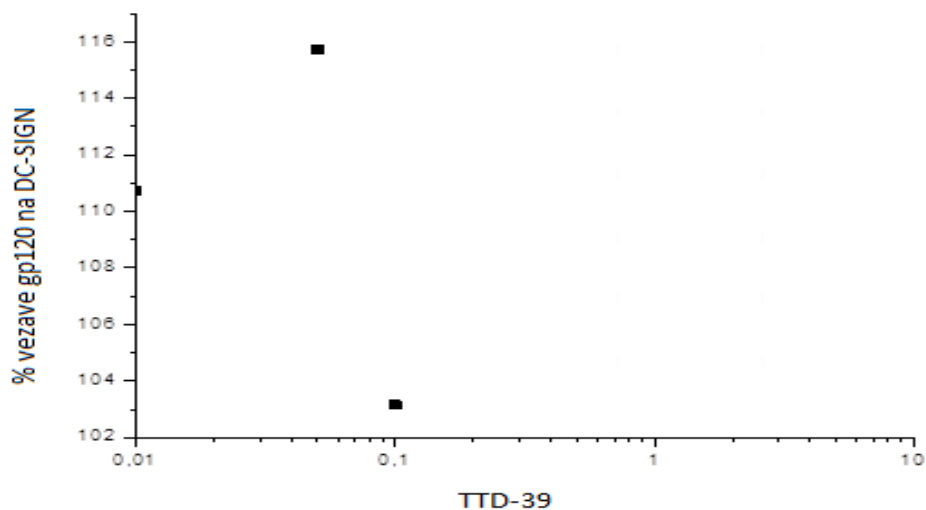
Slika 16: Delež vezave gp120 na DC-SIGN v odvisnosti od koncentracije TTD-35

Spojina TTD-35 se je izobarjala zato smo pripravili tudi vmesne koncentracije in jih ovrednotili s kompetitivnim testom vezave. Kljub temu, da je nakazana sigmoidna krivulja pa nismo dobili popolne inhibicije vezave gp120, saj se odstotek vezave gp120 po trendu upadanja ustavi pri približno 40% (60% inhibicije).



Slika 17: Delež vezave gp120 na DC-SIGN v odvisnosti od koncentracije TTD-38

Tudi spojina TTD-38 se je izobarjala pri višjih koncentracijah (1 mM) zato smo jo redčili, da smo dosegli ustrezne rezultate in določili IC₅₀.



Slika 18: Delež vezave gp120 na DC-SIGN v odvisnosti od koncentracije TTD-39

IC₅₀ nismo mogli določiti, ker je spojina prešibek ligand za DC-SIGN.

Pri izvajanju testov smo imeli težave s slabo topnostjo spojin oziroma izobarjanjem. Gre za pogosto težavo pri bioloških testih. Zaradi opažene slabe topnosti spojin smo imeli težave pri določitvi IC₅₀. Problema smo se lotili tako, da smo spojine dodatno redčili s topilom DMSO (dimetil sulfoksidom), pri čemer smo pazili, da masni odstotek DMSO ni bil prevelik oz. pod vrednostjo 5%, ki še ne kaže vpliva na določanje IC₅₀. DMS bi namreč vplival na vezavne lastnosti spojin (2). Po ustrezni redčitvi smo pri večini spojin dosegli ustrezne vrednosti IC₅₀, spojine so dobro zavirale vezavo bgp120. Dobili smo tudi dobro korelacijo izmerjenih vrednosti inhibicije z modelno sigmoidno krivuljo. Koncentracijske vrednosti so dobro pokrivalo območje sigmoidne krivulje. V primeru izobarjanja ali šibke vezave liganda nismo dosegli IC₅₀. V primeru izobarjanja testne učinkovine smo dobili manj smiselne rezultate vrednosti zaviranja adhezije v odvisnosti od koncentracije liganda.

Preglednica 9: Rezultati IC₅₀ testiranja potencialnih antagonistov receptorja DC-SIGN

<u>POTENCIALNI ANTAGONIST</u>	<u>IC₅₀ (mM)</u>
AAL-17	111 ± 5,5 μM
AMA-21	/
AMW-5	49,8 ± 4,12 μM
AMW-6	197,6 ± 25,0 μM
TKV-19	90,1 ± 9,3 μM
TKV-21	41,0 ± 6,8 μM
TSV-20	34,2 ± 5,6 μM
TSZ-15	40,6 ± 9,4 μM
TTD-35	62,28 ± 10,7 μM
TTD-38	30,2 ± 5,6 μM

Preglednica 10: Izračunan Z-faktor za posamezne najnižje koncentracije spojin

SPOJINA	Z- faktor
AMW-6 (0,03mM)	0,918
AAL-17 (0,01mM)	0,904
TTD-38 (0,005mM)	0,597
AMW-5 (0,008mM)	0,862
AAL-18 (0,001mM)	0,918
TSV-20 (0,1mM)	0,823
TKV-19 (0,1mM)	0,552
TKV-21 (0,1mM)	0,777
TTD-35 (0,1mM)	0,849
TTD-39 (0,1mM)	0,902
TSZ-15 (0,1mM)	0,747
AMA-21 (0,1mM)	0,799

Za vsako spojino smo izračunali Z-faktor po formuli in pri tem vzeli najnižjo koncentracijo spojine, ki smo jo uporabili v setu podatkov za določanje IC_{50} vrednosti. Pri vseh spojinah smo dobili ustrezne rezultate, saj so se vrednosti Z-faktorja gibale med 0,5 in 1. Z-faktor je statistični parameter, ki se uporablja za oceno ustreznosti testnega sistema za rutinsko reševanje spojin. Če imamo vrednosti, ki se gibljejo med 0,5 in 1, to pomeni, da smo dobili uporabne rezultate vrednotenja aktivnosti, kar kaže na dobro odzivnost metode in visoko razmerje signal-šum.

6. SKLEP

V okviru magistrskega dela smo želeli ovrednotiti relativno afiniteto potencialnih antagonistov receptorja DC-SIGN z izpodrivanjem vezave označenega liganda bgp120. Z uporabo kompetitivnega vezavnega testa smo spojinam določali inhibitorno konstanto, ki kvantitativno definira relativno afiniteto: IC_{50} .

Na podlagi rezultatov lahko zaključimo naslednje:

- pri testiranju spojin, antagonistov receptorja DC-SIGN smo dosegli dobro odzivnost metode,
- koncentracija DC-SIGN-a 5 $\mu\text{g}/10,2$ ml pufra je bila najbolj optimalna koncentracija za vezavo pripravljenega bgp120 na mikrotitrsko ploščico, pri tej koncentraciji smo dosegli najboljšo odzivnost metode,
- na mikrotitrsko ploščico smo tudi nanесли raztopino »starega« bgp120 (hranjen v hladilniku približno 6 mesecev pri 4°C) in sveže pripravljenega bgp120; ugotovili smo, da je sveže pripravljen bgp120 bolj učinkovit od »starega« bgp120, saj smo dobili višje vrednosti vezave na receptor in s tem boljši odziv metode,
- določeni antagonisti receptorja DC-SIGN so izkazovali ustrezno inhibitorno delovanje zato so obetavni za nadaljnje raziskovanje.

Vendar pa smo pri izvajanju testov kompetitivne vezave imeli težave z izobarjanjem določenih spojin, zato so tudi določene spojine izkazovale neustrezne rezultate, saj nismo mogli določiti IC_{50} . Težave smo se lotili z dodatnim redčenjem, vendar pa so se tudi po redčitvi določene spojine še vedno opaženo izobarjale.

7. LITERATURA

- 1.) Thermo Scientific Avidin-Biotin Technical Handbook, dostopano: (10.02.2015)
URL: http://www.piercenet.com/files/1601675_AvBi_HB_INTL.pdf
- 2.) Hajšek D.: Testni sistem za določanje afinitete antagonistov receptorja DC-SIGN *in vitro*, Ljubljana 2012, 25-26
- 3.) Wikipedia: Z-factor: dostopano: (15.02.2015)
URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/Z-factor>
- 4.) Antončič M.: Sinteza alfa-d-manoziliranih glikokonjugatov kot ligandov za lektine specifične za manozo., Ljubljana 2014, 2
- 5.) Varki A, Cummings R, Esko J, et al.: Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1999; Chapter 25.
- 6.) McGreal EP, Martinez-Pomares L, Gordon S: Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Mol Immunol* 2004; 41: 1109-1121.
- 7.) Zelensky AN, Gready JE: The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J* 2005; 272: 6179-6217.
- 8.) Anderluh M, Jug G, Svajger U, Obermajer N: DC-SIGN antagonists, a potential new class of anti-infectives. *Curr Med Chem* 2012; 19: 992-1007
- 9.) Anderluh M: DC-SIGN Antagonists-A Paradigm of C-type Lectin Binding Inhibition. *Carbohydrates-Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*. InTech 2012
- 10.) Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-252
- 11.) Janeway CA, Jr., Medzhitov R: Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216.
- 12.) Figdor CG, Van KY, Adema GJ: C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 77-84.
- 13.) Engering A, van Vliet SJ, Geijtenbeek TB, Van KY: Subset of DC-SIGN(+) dendritic cells in human blood transmits HIV-1 to T lymphocytes. *Blood* 2002; 100: 1780-1786.

- 14.) Svajger U, Anderluh M, Jeras M, Obermajer N: C-type lectin DC-SIGN: an adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity. *Cell Signal* 2010; 22: 1397-1405.
- 15.) Geijtenbeek TB, Krooshoop DJ, Bleijs DA, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Grabovsky V, Alon R, Figdor CG, Van KY: DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol* 2000; 1: 353-357.
- 16.) Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, Van KY, Figdor CG: Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 2000; 100: 575-585.
- 17.) Appelmelk BJ, van D, I, van Vliet SJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Geijtenbeek TB, Van KY: Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells. *J Immunol* 2003; 170: 1635-1639.
- 18.) Van KY, Geijtenbeek TB: DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 697-709.
- 19.) Zhou T, Chen Y, Hao L, Zhang Y: DC-SIGN and immunoregulation. *Cellular and Molecular Immunology* 2006;3, 4: 279-283
- 20.) Feinberg H, Mitchell DA, Drickamer K, Weis WI: Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science* 2001; 294: 2163-2166.
- 21.) Geijtenbeek TB, van Duijnhoven GC, van Vliet SJ, Krieger E, Vriend G, Figdor CG, Van KY: Identification of different binding sites in the dendritic cell-specific receptor DC-SIGN for intercellular adhesion molecule 3 and HIV-1. *J Biol Chem* 2002; 277: 11314-11320.
- 22.) Van KY, Geijtenbeek TB: DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 697-709.
- 23.) Guo Y, Feinberg H, Conroy E, Mitchell DA, Alvarez R, Blixt O, Taylor ME, Weis WI, Drickamer K: Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11: 591-598.
- 24.) Wikipedia: Envelope glycoprotein GP120 (dostopano: 26.02.2015)
URL: http://en.wikipedia.org/wiki/Envelope_glycoprotein_GP120
- 25.) The molecules of HIV (dostopano: 26.02.2015)
URL: <http://www.mclid.co.uk/hiv/?q=gp120>
- 26.) DC-SIGN (dostopano: 03.03.2015)

[URL: http://www.functionalglycomics.org/CFGparadigms/index.php/DC-SIGN](http://www.functionalglycomics.org/CFGparadigms/index.php/DC-SIGN)

- 27.) Andoljšek A.: Določanje tumorskega označevalca HE4 pri raku jajčnika oziroma endometrija, Ljubljana 2010, 28-29
- 28.) Bogoevska V, Nollau P, Lucka L, Grunow D, Klampe B, Uotila LM, Samsen A, Gahmberg CG, Wagener C: DC-SIGN binds ICAM-3 isolated from peripheral human leukocytes through Lewis x residues. *Glycobiology* 2007; 17: 324-333.
- 29.) Kemiluminiscenca (dostopano:15.5.2015)
URL:<http://sl.wikipedia.org/wiki/Kemiluminiscenca>
- 30.) Navodilo za uporabo (dostopano 12.10.2012):
URL:https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/11582950001_en_05.pdf
- 31.) Pentametrična struktura lektina tipa C (dostopano: 29.5.2015)
URL: http://en.wikipedia.org/wiki/C-type_lectin