

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**ANDREJA BRILI**

**MAGISTRSKA NALOGA**

**ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA**

Ljubljana, 2015

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**ANDREJA BRILI**

**NAČRTOVANJE IN VREDNOTENJE  
AKTIVNOSTI PEPTIDNIH  
ZAVIRALCEV INFLAMASOMA  
NLRP3**

**DESIGN AND ACTIVITY  
ASSESSMENT OF INFLAMMASOME  
NLRP3 PEPTIDE INHIBITORS**

**ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA**

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravila na Kemijskem inštitutu v Ljubljani, v laboratoriju za biotehnologijo.

## **ZAHVALA**

**Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Tomažu Bratkoviču in somentorici dr. Ivi Hafner Bratkovič, da sta mi dala priložnost za delo na področju, ki me zanima, in da sta si vedno vzela čas, ko sem potrebovala njuno pomoč.**

Zahvaljujem se tudi vsem domačim in prijateljem za izkazano podporo, potrpežljivost in razumevanje tekom priprave magistrske naloge in celotnega študija.

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Bratkoviča in somentorstvom dr. Ive Hafner Bratkovič.

**Kazalo**

Povzetek .....	VI
Ključne besede.....	VII
Abstract.....	VIII
Keywords.....	IX
Seznam okrajšav – urejeno po abecednem redu .....	IX
1 UVOD .....	1
1.1 Inflamasom.....	1
1.1.1 Aktivacija inflamasoma NLRP3 .....	3
1.1.2 Negativna regulacija inflamasoma NLRP3.....	9
1.3 Protivnetne učinkovine z delovanjem na inflamasom NLRP3 .....	13
2 NAMEN DELA.....	18
3 METODE IN MATERIALI.....	19
3.1 Materiali .....	19
3.1.1 Kemikalije .....	19
3.1.1.2 Uporabljene raztopine in pufri .....	20
3.1.1.3 Laboratorijska oprema in potrošni material .....	20
3.2 Metode dela.....	21
3.2.1 Načrtovanje peptidnih inhibitorjev.....	21
3.2.2 Delo s sesalskimi celičnimi kulturami .....	21
3.2.2.1 Odmrznitev.....	22
3.2.2.3 Redčenje .....	23
3.2.2.4 Štetje celic .....	23
3.2.3 Priprava raztopine aktivatorjev oz. inhibitorjev .....	23
3.2.4 Aktivacija inflamasoma NLRP3 .....	23
3.2.4.1 Encimskoimunski test (ELISA) .....	24
3.2.5 Piroptoza in preživelost celic po tretiranju z aktivatorji inflamasoma v prisotnosti zaviralcev .....	26
3.2.5.1 Preizkusi citotoksičnosti.....	26
3.2.5.1.1 Test viabilnosti .....	27
3.2.5.1.1.1 Test LDH.....	27
3.2.5.1.1.2 XTT-test viabilnosti .....	28

4	REZULTATI IN RAZPRAVA .....	30
	4.1 Izbor in načrtovanje peptidov.....	30
	4.2 Testiranje delovanja načrtovanih peptidov in znanih inhibitorjev inflamasma NLRP3 v celičnem modelu .....	37
	4.3 Spremljanje živosti celic v prisotnosti aktivatorjev inflamasma in peptidnih zaviralcev .....	47
	4.4 Razprava o delovanju načrtovanega peptidnega zaviralca v luči strukture polimerov PYD ASC.....	50
5	SKLEP.....	51
6	LITERATURA.....	53

## Povzetek

Inflamasom NLRP3 je proteinski kompleks, ki nastane zaradi prisotnosti različnih dražljajev tujega ali endogenega izvora. Tvorijo ga receptor NLRP3, adaptor ASC in prokaspaza-1, ki se med seboj povezujejo preko homotipnih interakcij med domenami. Pri tem pride do aktivacije kaspaze 1, s tem pa piroptotične celične smrti in zorenja vnetnih citokinov IL-1 $\beta$  in IL-18. Mutacije v NLRP3 povzročajo redke dedne vnetne bolezni, nedavne študije pa nakazujejo, da inflamasom NLRP3 sodeluje pri pogostih kroničnih boleznih, kot so diabetes tipa II, neurodegenerativne bolezni in protin. Cilj magistrskega dela je bil načrtovati in preveriti delovanje peptidnih zaviralcev inflamasoma NLRP3. Na osnovi obstoječe literature, predvsem znanih struktur komponent inflamasoma in podobnih proteinov, smo načrtovali štiri različne peptide, ki bi potencialno lahko zavirali interakcije, ki sodelujejo pri tvorbi inflamasoma. Delovanje načrtovanih peptidov smo nato preverili na mišjih makrofagih, ki smo jih aktivirali z različnimi aktivatorji inflamasoma NLRP3. Uporabili smo tako topne (ATP, nigericin) kot tudi koloidne sprožilce (alum, nanodelci SiO<sub>2</sub>) in nato spremljali zorenje vnetnega citokina IL-1 $\beta$  s pomočjo encimskoimunskega testa. Peptida, ki izvirata iz proteinov POP1 in pirinske domene NLRP3, za katera smo predvideli, da bi onemogočala interakcijo med NLRP3 in ASC, nista delovala. Na isti stopnji naj bi deloval tudi peptid, ki izvira iz pirinske domene ASC. Pokazali smo, da ta peptid zavira zorenje IL-1 $\beta$  v odvisnosti od koncentracije pri različnih sprožilcih inflamasoma NLRP3. Pokazali smo tudi, da peptid pri nižjih koncentracijah, kjer že zavira inflamasom NLRP3, ne poveča citotoksičnosti dodanih aktivatorjev. Blag zaviralni efekt smo opazili pri peptidu, ki izvira iz domene CARD adapterja ASC, za katerega predvidevamo, da deluje na interakcijo med ASC in prokaspazo-1. Inflamasomu NLRP3 pripisujejo pomembno vlogo pri številnih boleznih, zato so študije potencialnih zaviralcev inflamasoma NLRP3 izredno pomembne, tako za razumevanje molekularnega mehanizma sestavljanja inflamasoma NLRP3, kot tudi za načrtovanje novih terapij za bolezni, kot so neozdravljive neurodegenerativne bolezni.

## **Ključne besede**

Slovenske:

- Domena ASC
- Domena PYD
- Inflamasom NLRP3
- Interlevkin-1 beta (IL-1 $\beta$ )
- Peptidni inhibitor

**Abstract**

The NLRP3 inflammasome is a protein complex which forms in response to various stimuli of either exogenous or endogenous origin. It consists of the receptor NLRP3, adaptor ASC and procaspase-1, which assemble through homotypic interactions between the domains. This leads to caspase-1 activation and promotes pyroptotic cell death and maturation of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18. Mutations in the gene encoding NLRP3 cause rare genetic disorders, but recent studies indicate that NLRP3 inflammasome plays a role in widespread chronic diseases such as type 2 diabetes, neurodegenerative diseases and gout. The aim of this master's thesis was to design and test the activity of peptide inhibitors repressing the NLRP3 inflammasome. On the basis of the existing literature, resolved structures of the inflammasome components and similar proteins, we designed four different peptides with potential to inhibit interactions involved in the inflammasome formation. The activity of the designed peptides was subsequently tested on mouse macrophages which were activated with different triggers of the NLRP3 inflammasome. We used both soluble (ATP, nigericin) and particulate activators (alum, SiO<sub>2</sub> nanoparticles) and monitored the maturation of proinflammatory cytokine IL-1 $\beta$  by ELISA. The peptides originating from proteins POP1 and pyrin domain of NLRP3, for which we had assumed successful prevention of interaction between NLRP3 and ASC, did not inhibit NLRP3 inflammasome activation. Interestingly, a peptide originating from pyrin domain of ASC, which is predicted to inhibit the same interaction, inhibits IL-1 $\beta$  maturation in a concentration-dependent manner for different NLRP3 inflammasome activators. We have also shown that at lower inhibitory concentrations, this peptide did not increase the cytotoxicity of NLRP3 inflammasome activators. Mild inhibitory effect was observed with the peptide originating from the CARD domain of the adaptor ASC, which affects the interaction between ASC and procaspase-1. NLRP3 inflammasome is attributed an important role in numerous diseases, therefore the studies of potential NLRP3 inflammasome inhibitors are highly relevant for both, understanding the molecular mechanism of NLRP3 inflammasome assembly and designing new therapies for the diseases such as incurable neurodegenerative diseases.



## Keywords

Angleške:

- Domain ASC
- Domain PYD
- Inflammasome NLRP3
- Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ )
- Peptide inhibitor

## Seznam okrajšav – urejeno po abecednem redu

APAF-1 – apoptotični proteazni aktivatorski dejavnik 1

ASC – adaptorski protein (angl. *Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*)

CAPS – periodični vročinski sindromi povezan s kriopirinom (angl. *Cryopyrin-Associated Periodic syndromes*)

CARD – N-končna domena CARD (ang. *Caspase activation and recruitment domains*)

ELISA – encimskoimunski test (angl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

IL-1 $\beta$  – interleukin-1 beta (angl. *Interlukin-1 beta*)

IL-1-RA – antagonist receptorja interleukin-1

LPS – lipopolisaharid

PYD – pirinska domena (angl. *Pyrin domain*)

TLR – membranski Tollu podobni receptorji (angl. *Toll-like receptors - TLRs*)

## 1 UVOD

### 1.1 Inflamasom

Prirojeni imunski sistem je sofisticiran sistem za zaznavanje signalov nevarnosti, kot so patogeni mikrobi ali pa signali oziroma molekule celičnega stresa, ki jih proizvede celica sama. Gostitelj prirojeni imunski sistem preko receptorjev, ki prepoznavajo značilne molekulske vzorce (angl. *pattern recognition receptors-PRRs*), aktivirajo bodisi edinstvene mikrobnne komponente, imenovane s patogeni povezani molekulski vzorci (angl. *pathogen associated molecular patterns - PAMPs*), ali pa endogeni z nevarnostjo povezani molekulski vzorci (angl. *danger associated molecular patterns -DAMPs*). Slednji nastanejo v primeru celične poškodbe ali poškodbe tkiva [1].

Receptorji, ki prepoznavajo značilne molekulske vzorce, so prva linija obrambe proti okužbam in se izražajo v različnih celicah, vključno z makrofagi, dendritičnimi celicami, monociti, nevtrofilci, epiteljskimi celicami in tudi na nekaterih celicah pridobljenega imunskega sistema. Obstajajo štiri vrste receptorjev, ki prepoznavajo značilne molekulske vzorce:

- ❖ membranski Tollu podobni receptorji (angl. *Toll-like receptors - TLRs*),
- ❖ citosolni NODu podobni receptorji (angl. *nucleotide-binding oligomerization domain receptors, NOD-like receptors - NLRs*),
- ❖ helikazi RIG-I podobni receptorji (angl. *RIG-I-like receptors - RLRs*),
- ❖ lektinom C-tipa podobni receptorji (angl. *C-type lectins - CTLs*)

Membranski Tollu podobni receptorji (TLRs) in lektinom C-tipa podobni receptorji (CTLs) so transmembranski receptorji in zaznavajo PAMP, ki se nahajajo zunaj celic in v endosomih. Helikazi RIG-I podobni receptorji (RLRs) so znotrajcelični PRR in detektirajo npr. citosolno dvoverižno RNA. Nazadnje so odkrili receptorje NLR, ki so prav tako znotrajcelični PRR. Zaznavajo celo serijo snovi (materialov), vključno z mikrobnimi komponentami, molekulami endogenega stresa (npr. reaktivne kisikove spojine in njihove produkte) [2].

Do danes so našli 23 človeških in 34 mišjih genov, ki kodirajo predstavnike družine NLR. Zanje je značilna osrednja oligomerizacijska domena, ki veže nukleotide (NBD oziroma NACHT). N–končna domena je bodisi pirinska (PYD) ali pa CARD (angl. *caspase activation and recruitment domain*). C–končna domena je praviloma domena z levcinom bogatimi ponovitvami (angl. *C-terminal leucine-rich repeats* - LRR). Filogenetska analiza domene NACHT je razkrila tri različne poddružine znotraj družine NLR:

- ❖ Receptorji NOD (NOD1–2, NOD3 / NLRC3, NOD4 / NLRC5, NOD5 / NLRX1, CIITA)
- ❖ Receptorji NLRP (NLRP1–14, imenovani tudi NALP)
- ❖ IPAF, ki jo sestavljata IPAF (NLRC4) in NAIP [3].

Po analogiji z receptorji iz družine TLR so predpostavili, da aktivacijske signale pri NLR zazna domena LRR. Domena NACHT je edina skupna domena celotni družini NLR. Omogoča aktivacijo signalizacijskega kompleksa preko od ATP odvisne oligomerizacije. Domeni CARD in PYD posredujeta pri homotipnih interakcijah med proteini [2].

Inflamasom je večproteinski kompleks, sestavljen iz senzornega proteina NLR, ki ob aktivaciji veže adaptorski protein ASC in vnetno proteazo kaspazo 1 [4]. Ta potem cepi proIL-1 $\beta$  in proIL-18, pomaga pri zorenju in sekreciji teh močnih vnetnih citokinov. Aktivirana kaspaza 1 povzroča tudi celično smrt, imenovano piroptoza [5].

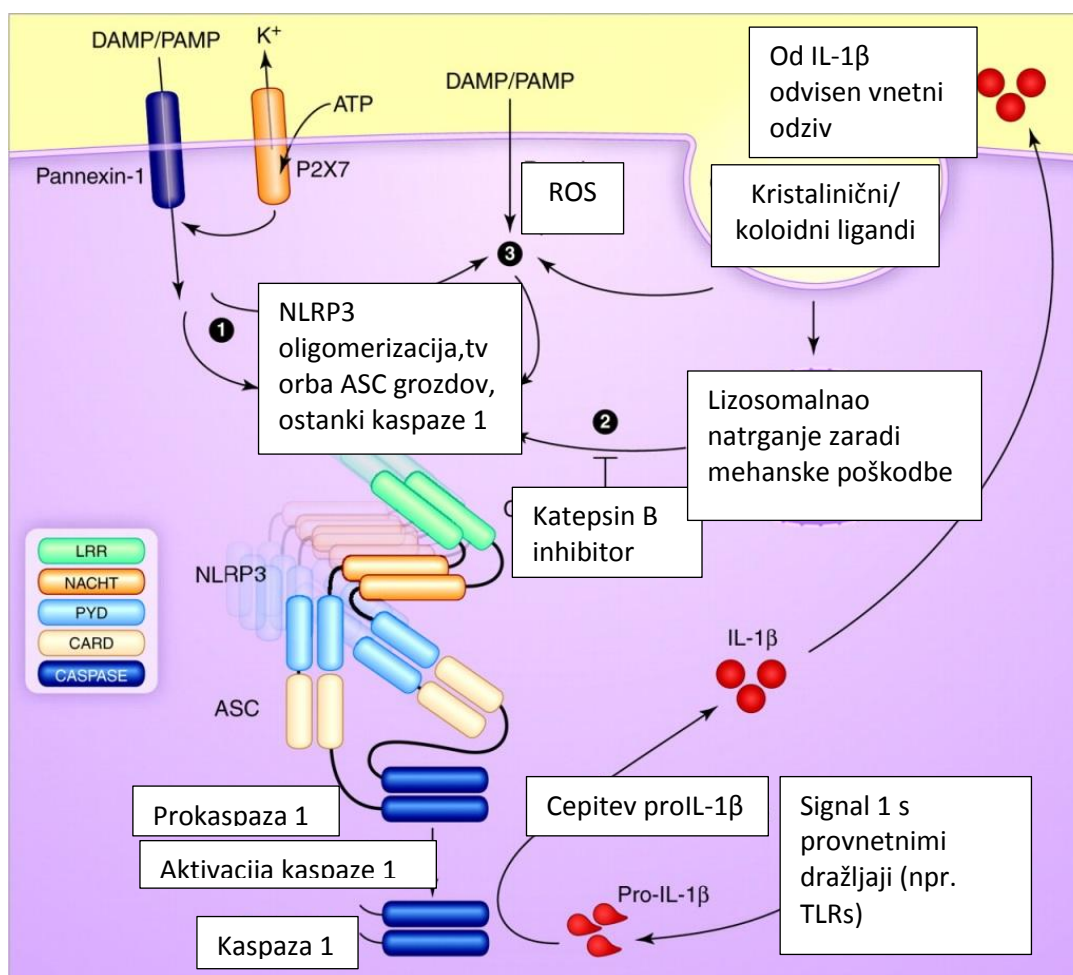
Do sedaj so odkrili štiri inflamosome, ki se imenujejo po senzorskem proteinu: NLRP1, NLRP3, NLRC4 in AIM2 [2, 6]. Tvorbo inflamosomov NLRP1, NLRC4 in AIM2 spodbudijo specifični dražljaji. Inflamasom NLRP1 je prvi opisani inflamomasom, ki ga v glavnem aktivira smrtonosen toksin bakterije *Bacillus anthracis* [4, 7], AIM2 zazna dvoverižno DNA virusnega ali bakterijskega izvora [8], medtem ko se NLRC4 odziva na bakterijski flagelin in PrgJ, komponento sekrecijskega sistema tipa III (T3SS) [9].

Inflamasom NLRP3 je trenutno najbolj v celoti opredeljen inflamomasom, ki se odziva na številne, različne fizikalne in kemične dražljaje [10]. Ob aktivaciji domena NACHT oligomerizira in N-končna domena PYD veže adaptor ASC. Po vezavi adaptorja ASC na domeno PYD, ASC z domeno CARD interagira z domeno CARD prokaspaze 1. Prokaspaza 1 se potem avtoproteolitično aktivira. Receptor NLRP3, kaspaza 1 in adaptor

ASC sestavljajo inflammasom NLRP3. Kaspaza 1 je potrebna in odgovorna za procesiranje in sproščanje provnetnih citokinov IL-1 $\beta$  in IL-18.

### 1.1.1 Aktivacija inflammasoma NLRP3

Za aktivacijo inflammasoma NLRP3 poleg aktivacijskega signala (t.i. signal 2) predhodno potrebujemo še prepisovalni signal (signal 1), ki ga sprožimo bodisi preko TNF ali aktivacije receptorjev NLRP3, temu pa potem sledi translokacija transkripcijskega dejavnika NF- $\kappa$ B v jedro. Pri translokaciji prihaja do izražanja pro IL-1 $\beta$  in povečanega izražanja gena za receptor NLRP3 [11].



Slika 1: Oligomerizacija inflammasoma NLRP3 [12]

Za sestavo inflammasoma NLRP3 poleg signala 1 potrebujemo še signal 2. Le-tega povzročijo številni dražljaji, kot so ROS, efluks kalijevih ionov, bakterijski toksini,

fagocitoza kristalov in delcev. Oligomerizacija inflammasoma NLRP3 je posledica delovanja teh dražljajev. Kaspaza 1 se avtokatalitično aktivira med sestavljanjem inflammasoma NLRP3, nadalje pa s cepitvijo povzroči nastanek provnetnih citokinov IL-1 $\beta$  in IL-18. Pozitivna povratna zanka se vzpostavi, ko zunajcelični IL-1 $\beta$  preko svojega receptorja ponovno sproži prepisovalni signal. Pro-IL-18 se izraža v različnih celicah in ne potrebuje prepisovalnega signala [13].

#### 1.1.1.1 Aktivatorji inflammasoma NLRP3

Aktivatorji inflammasoma NLRP3 so zelo raznoliki in vključujejo dražljaje iz okolja, endogene nevarnostne signale, patogene mikroorganizme in različne PAMPs. Natančneje, inflammasom NLRP3 aktivirajo različni mikroorganizmi, kot so na primer adenovirus, virus influence [14], *Candida albicans* [15] in pa tudi endogeni dražljaji ter trdni delci, vključno z zunajceličnim ATP [16], zunajcelično glukozo, kristali, holesterolom [17], silicijevim dioksidom, adjuvansi na osnovi aluminijevih soli in maščobnimi kislinami [18].

Aktivacijo inflammasoma NLRP3 sprožijo številni dražljaji, zato ga povezujejo s številnimi boleznimi. Mutacije v domeni NACHT receptorja NLRP3 povzročajo periodične vročinske sindrome, povezane s kriopirinom (angl. Cryopyrin-Associated Periodic syndromes-CAPS). Gre za tri avtoinflamatorne bolezni: družinski avtoinflamatorni sindrom, povzročen z mrazom, Muckle-Wellsov sindrom (MWS) in multisistemsko bolezen z začetkom pri novorojenčku (NOMID) [19]. Mononuklearne celice bolnikov s CAPS spontano izločajo IL-1 $\beta$  in IL-18. Antagonisti receptorjev IL-1 so dokazano učinkoviti v primeru zdravljenja teh avtoinflamatornih sindromov [20]. Nedavno pridobljeni dokazi kažejo, da je nepravilna regulacija nastajanja IL-1 $\beta$  vpletena v patofiziologijo več pogostih bolezni; aterosklerozo [16], osteoartritis, presnovni sindrom [21] in sladkorno bolezen tipa 2 [22].

Glede na kemijsko in strukturno raznolikost aktivatorjev inflammasoma NLRP3 so postavili hipotezo, da NLRP3 ne interagira neposredno s svojimi aktivatorji. Namesto tega dejansko sprožitev inflammasoma NLRP3 povzročijo in posredujejo celični signali, sproženi s strani vseh aktivatorjev. Predlagali so številne teorije za identifikacijo celičnega signala, ki je odgovoren za aktivacijo inflammasoma NLRP3. Te vključujejo efluks kalijevih ionov (K<sup>+</sup>),

tvorba por v celični membrani, poškodbe lizosomov, prisotnost reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) in poškodbe mitohondrija. Agonisti inflammasoma NLRP3, kot so ATP, nigericin in podobni toksini, ki povzročajo tvorbo por v celični membrani, vodijo v znižanje znotrajcelične koncentracije in povišanje zunajcelične koncentracije kalijevih ionov ( $K^+$ ) [6, 16].

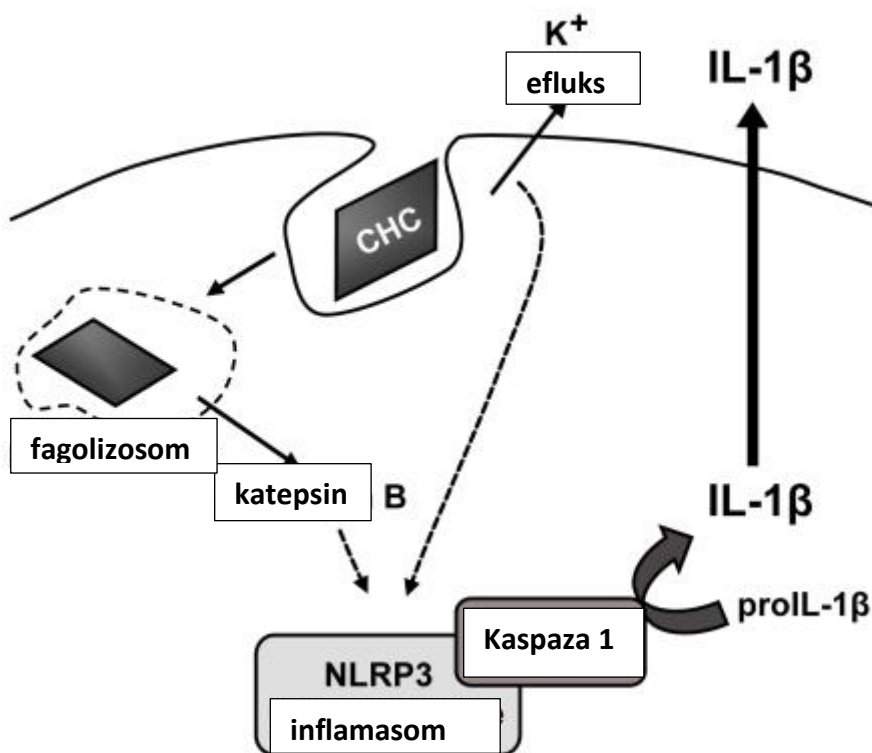
Aktivacija inflammasoma NLRP3, ki jo povzročijo kristali, se nanaša na fagocitozo, ki vodi v poškodbe lizosoma. Inflammasom NLRP3 zaznava lizosomalno vsebino v citoplazmi, npr. katepsin B, kot neposredni ligand inflammasoma NLRP3. To hipotezo podpira učinkovitost endocitoznih zaviralcev pri blokiranju oz. zaviranju aktivacije inflammasoma NLRP3 z delci. Poleg tega lahko zaviralci katepsina B preprečijo aktivacijo kaspaze 1, inducirane z različnimi mikrobi [23]. Reaktivne kisikove zvrsti (ROS) naj bi delovale kot skupni celični signal za povečanje aktivacije inflammasoma NLRP3 [24].

#### **1.1.1.1.1 Kristali holesterola**

Kristale holesterola v aterosklerotičnih lezijah smo dolgo smatrali kot inertni material in sekundarni znaki bolezni. Novejši podatki nakazujejo, da naj bi imeli kristali holesterola pomembno proinflatatorno vlogo pri aterosklerozi. Pokazali so, da kristali holesterola inducirajo aktivacijo inflammasoma NLRP3 in sekrecijo proinflatornih citokinov IL-1 $\beta$  v človeških makrofagih. Ta način aktivacije makrofagov v aterosklerotičnih lezijah lahko predstavlja pomemben vir vnetja v prizadetem tkivu [25]. Pomembno je, da so pokazali, da fagocitirani kristali holesterola lahko izzovejo vnetno reakcijo s sproženo sekrecijo IL-1 $\beta$  iz makrofagov. Sproščanje IL-1 $\beta$  kot odziv na kristale holesterola je odvisen od kaspaze 1, kaže pa na z inflammasomom posredovan mehanizem delovanja. Pokazali so, da kristali, ki nastanejo v aterosklerotičnih lezijah, niso tako inertni, kot so mislili, saj so sposobni izzvati močno vnetno reakcijo. Podatki kažejo tudi, da tako efluks kalijevih ionov kot katepsin B prispevata k aktivaciji inflammasoma NLRP3, posredovani s kristali holesterola. Potrebne so nadaljnje raziskave za pojasnitev morebitnih medsebojnih povezovanj in relativnega pomena teh celičnih dejavnikov v primeru s kristali holesterola inducirane aktivacije inflammasoma NLRP3 [26]. Na primer, v številnih raziskavah vlogo katepsina B pojasnjujejo z eksperimenti, v katerih inhibitor CA-074Me zniža aktivacijo inflammasoma NLRP3. Vendar pa so pokazali, da v mišjih fibroblastih selektivni zaviralec CA-074Me zavira

katepsin B in tudi njemu zelo soroden katepsin L, kar nakazuje na možnost, da so v aktivacijo inflammasoma NLRP3 vpletene tudi druge proteaze [27]. Zaradi lastnega pro-IL-1 $\beta$  inducirajočega efekta, je bila sprožitev delovanja makrofagov z LPS esencialnega pomena za sekrecijo IL-1 $\beta$ , povzročeno s kristali holesterola. Več raziskav nakazuje, da v aterosklerotični intimi arterije poteka aktivacija TLR, kar lahko prispeva k patogenezi bolezni [28].

Glede na te ugotovitve je razumljivo, da lahko kristali holesterola skupaj s proaterogenimi ligandi TLR izzovejo aktivacijo inflammasoma NLRP3 v leziji. Ugotovitev je podprta s tem, da kaspazo 1 (mRNA in protein) najdemo v humanih aterosklerotičnih lezijah, medtem ko je v normalnih arterijah praktično ne najdemo [29]. Ugotovitve skupaj kažejo, da kristali holesterola in skupne sestavine aterosklerotičnih lezij izzovejo aktivacijo inflammasoma NLRP3 in sekrecijo IL-1 $\beta$ . Predlagani mehanizem aktivacije inflammasoma NLRP3 s kristali holesterola vključuje tako efluks kalijevih ionov kot prehajanje katepsina B v citoplazmo.



Slika 2: Predlagani mehanizem aktivacije inflammasoma NLRP3 s kristali holesterola [30]

Posledično lahko aktivacija inflammasoma NLRP3, ki jo inducirajo kristali holesterola, predstavlja pomembno povezavo med metabolizmom holesterola in vnetjem v

aterosklerotičnih lezijah. Duewell in sodelavci [17] so v podobni študiji pokazali, da kristali holesterola aktivirajo inflamasaom NLRP3 v mišjih makrofagih preko poškodbe lizosomov in da gre za s katepsinom posredovan mehanizem. Pokazali so tudi, da enaka aktivacija inflamasma NLRP3 deluje tudi v humanih makrofagih, ki so bili izpostavljeni kristalom holesterola. Kristale holesterola lahko zaznamo in odkrijemo že v zgodnji fazi razvoja bolezni [17].

#### 1.1.1.1.2 Sladkorna bolezen tipa 2

Kronično vnetje in aktivacija inflamasma igrata pomembno vlogo v patogenezi sladkorne bolezni tipa 2 [31]. Nedavno so pokazali, da z debelostjo inducirani nevarnostni signali aktivirajo inflamasaom NLRP3 in povzročijo nastajanje IL-1 $\beta$  v maščobnem tkivu pri diabetikih [32]. Pokazali so, da NLRP3 igra pomembno vlogo pri interakciji med makrofagi in T-celicami, ki so trajnostno povezane s kroničnim vnetjem pri presnovnih boleznih, ki so posledica debelosti [32]. Poleg tega nasičene maščobne kisline, npr. palmitat, sprožijo aktivacijo inflamasma NLRP3 v hematopoetskih celicah, ki so odgovorne za oslabitev signalizacije inzulina in pojav glukozne tolerance v miših [33].

V preteklosti so predpostavljali, da obstaja močna povezava med inflamasaomom NLRP3 in patogenezo sladkorne bolezni tipa 2, vendar niso poročali o tem, ali so ravni IL-1 $\beta$  in IL-18 pri sladkornih bolnikih povišane v hematopoetskih celicah in ali se ta raven zniža po zdravljenju z antidiabetiki. Kasneje je Dasu s sodelavci [34] jasno pokazal, da imajo bolniki s sladkorno boleznijo tipa 2 povišane ravni NLRP3, ASC, IL-1 $\beta$  in IL-18 na nivoju mRNA, izražene v perifernih krvnih mononuklearnih celicah (angl. *peripheral blood mononuclear cells* – PBMCs) in makrofagih, pridobljenih iz monocitov (angl. *monocytes-derived macrophages* – MDMs). Nedavna študija kaže tudi na to, da makrofagi pridobljeni iz monocitov iz bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 2 povečajo aktivacijo kaspaze 1, zorenje IL-1 $\beta$  in raven IL-18 v primerjavi s tistimi iz zdravih kontrol [34]. Opazili so tudi, da je bilo izločanje in zorenje IL-1 $\beta$  statistično značilno povišano v MDMs, ki so bili izpostavljeni visoki koncentraciji glukoze. Podatki jasno kažejo, da so endogene nevarnostne molekule sistemsko povišane pri sladkorni bolezni tipa 2, kar vodi do intrinzične aktivnosti inflamasma NLRP3, okarakterizirane s povišanim bazalnim izražanjem NLRP3 in ASC v MDMs in povišano serumsko koncentracijo IL-1 $\beta$  in IL-18 .



### 1.1.1.1.3 Reaktivne kisikove zvrsti (ROS)

Reaktivne kisikove spojine (ROS) so reaktivni intermediati, ki vsebujejo vsaj en atom kisika in vključujejo vodikov peroksid, superoksidni anion in hidroksilni radikal. ROS predstavljajo stranski produkt presnove kisika v elektronski transportni verigi mitohondrijev. Celično nastajanje ROS uravnava več pomembnih fizioloških odzivov, na primer zaznavanje kisika, angiogenezo, nadzor žilnega tonusa, regulacijo celične rasti, diferenciacijo in migracijo. Pomembni so za celično signalizacijo, povišan nivo, ki vodi v oksidativni stres, pa lahko povzroči poškodbe celic. Zaščitni antioksidativni procesi zajemajo nevtralizacijo ROS s tioredoksinom (TRX), superoksid dismutazo in katalazo, pa tudi z nizkomolekularnimi antioksidanti kot je npr. glutation.

Z ROS posredovan oksidativni stres ima pomembno vlogo v patoloških procesih, kot so staranje, ateroskleroza, rakava obolenja, pljučna obolenja, nevrodegenerativne bolezni in sladkorna bolezen [35].

ROS predstavljajo sekundarne sporočevalce, ki obveščajo imunski sistem o nevarnostih [36]. Do aktivacije NADPH-oksidade (NOX) pride ob fagocitozi silicijevega dioksida in azbesta. NADPH-oksidaza tvori superoksidne radikale in v primeru zaviranja le-te (NADPH-oksidade) se aktivacija NLRP3 zniža.

Dosert [37] in Bauernfeind [38] si v svojih študijah nasprotujeta, saj Dosert trdi, da je NOX pomemben vir ROS, ki nato aktivira inflamatom NLRP3, medtem ko pa je Bauernfeind pokazal, da makrofagi z izbitimi esencialnimi komponentami NOX normalno aktivirajo inflamatom NLRP3. Tako so prišli do ugotovitve, da naj bi bil glavni vir ROS mitohondrij in ne NOX [39]. Pokazali so tudi, da so ROS vpleteni samo v prepisovalni signal [36]. Z blokado transmembranskega kationskega kanala TRPM2, skozi katerega pride do vstopa kalcijevih ionov, se pomembno zniža koncentracija sproščenega IL-1 $\beta$  in posledično tudi aktivacija inflamatosoma NLRP3 [39]. Sproščeni kalcijevi ioni vzdržujejo mitohondrije v poškodovanem stanju in na tak način pospešujejo tvorbo ROS [40]. Z oksidativno poškodbo mitohondrijev prehaja mitohondrijska DNA v citosol, kar privede do aktivacije inflamatosoma NLRP3.

#### 1.1.1.1.4 Destabilizacija lizosoma

Hornung in sodelavci so pokazali, da že sama destabilizacija lizosoma privede do aktivacije inflammasoma NLRP3. Za aktivacijo inflammasoma NLRP3 niso potrebni drugi, dodatni zunanji sprožilci [41]. Kot smo že omenili je eden možnih mehanizmov aktivacije inflammasoma NLRP3 fagocitoza kristalov in agregatov. V primeru Parkinsonove bolezni prihaja do fagocitoze agregatov  $\alpha$ -sinukleina [42], pri Alzheimerjevi bolezni fibril amiloida  $\beta$  in v primeru prionskih bolezni fibril prionskega proteina [43]. Nabrekanje in destabilizacija lizosomov je posledica fagocitoze in nezmožnosti razgrajevanja delcev v lizosomih, pri čemer katepsin B in druge lizosomalne proteaze prehajajo v citosol.

#### 1.1.2 Negativna regulacija inflammasoma NLRP3

Zorenje in sproščanje IL-1 $\beta$  in IL-18, kot tudi piroptoza, ki sledi aktivaciji inflammasoma, imajo potencial, da poškodujejo tkivo gostitelja. Napačna regulacija inflammasoma lahko privede do avtoinflamatornih bolezni kot so CAPS. Za učinkovit nadzor poškodbe mora biti delovanje inflammasoma hitro in učinkovito in nadalje pod strogim nadzorom, se izklopiti, ko dražljaji niso več prisotni; ali pa se sproži pridobljeni imunski odgovor, da ne pride do nepotrebnih poškodb. Kot zaviralce inflammasoma so preučevali številne proteine, tako endogenega kot mikrobnege izvora.

##### 1.1.2.1 Avtofagija

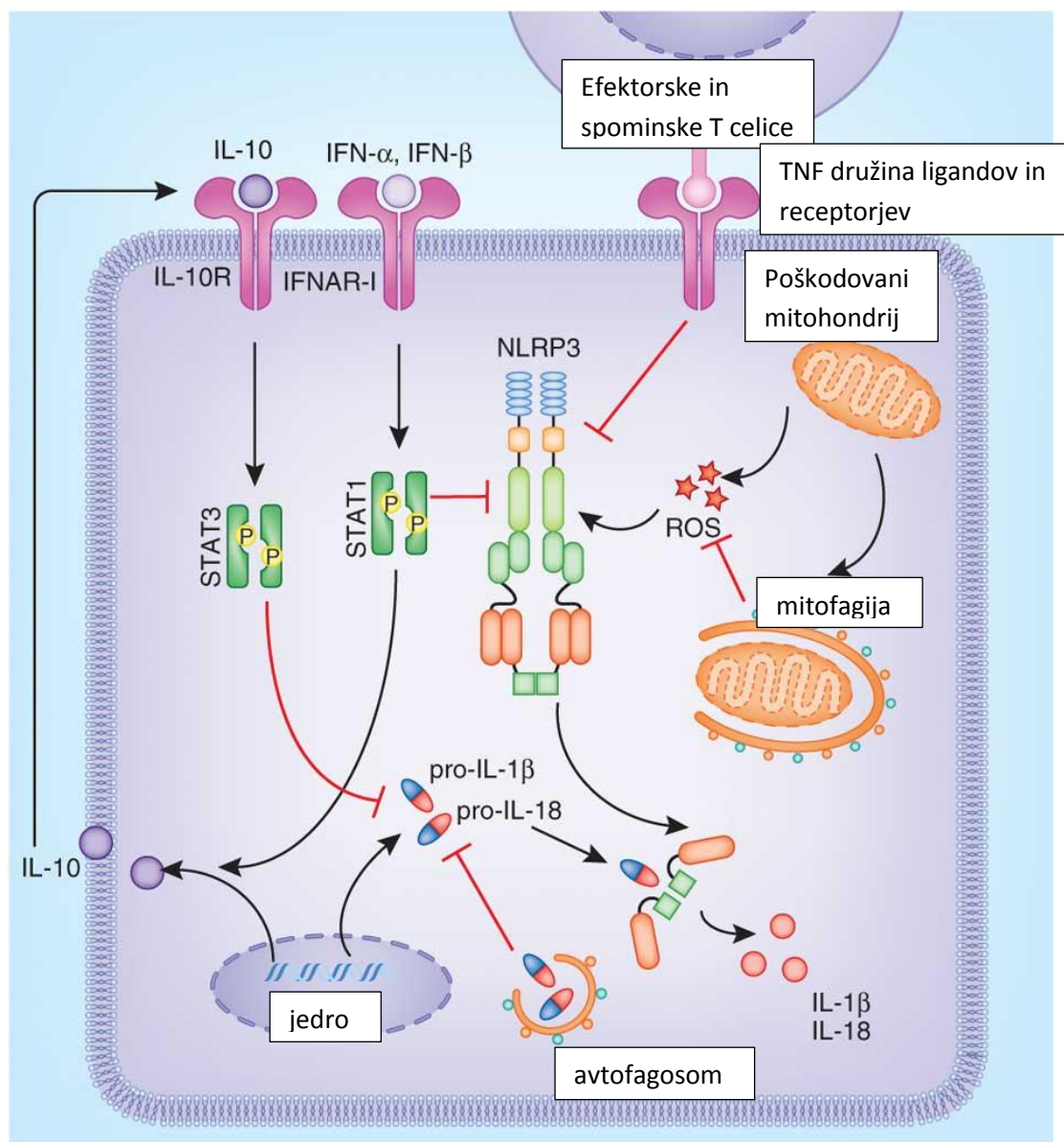
Avtofagija omogoča odstranjevanje poškodovanih celičnih organelov in molekul. Nedavne študije so razkrile več vlog avtofagije pri urejanju celične smrti, diferenciacije, antigen-predstavitvenih in anti-mikrobnih odzivov [44].

Študije na miših z izbitim genom *ATG16L1* (angl. *autophagy related 16-like 1 gene*), ki kodira enakoimenski protein z osrednjo vlogo pri avtofagiji, nakazujejo pomembno regulacijsko vlogo avtofagije pri inflammasomu NLRP3. Blokada (zaviranje) avtofagije z genetsko delecijo *ATG16L1* okrepi aktivnost inflammasoma NLRP3. Avtofagija zavira aktivacijo IL-1 $\beta$  posredno z znižanjem endogenih virov aktivacije inflammasoma in neposredno z razgradnjo komponent inflammasoma (npr. NLRP3 in pro-IL-1 $\beta$ ). ROS, ki

nastanejo v poškodovanih mitohondrijih, zavirajo avtofagijo in s tem posledično aktivirajo inflamason NLRP3. V primeru, da zaviramo aktivnost mitohondrijev, zmanjšamo tudi nastajanje ROS in tako zaviramo aktivacijo inflamasona NLRP3 [45].

### **1.1.2.2 Interferoni razreda I**

Interferoni razreda I zavirajo nastajanje IL-1 preko dveh mehanizmov: preko IL-10 zmanjšajo količino pro-IL-1 $\alpha$  in pro-IL-1 $\beta$ , zmanjšajo pa tudi aktivacijo inflamasonov NLRP1 in NLRP3 preko transkripcijskega dejavnika STAT1 [46]. Kako točno STAT1 zavira (blokira) aktivacijo kaspaze 1, ni znano. Zanimivo je, da izločajo monociti, izolirani iz bolnikov z multiplo sklerozo, ki se zdravijo z interferonom  $\beta$ , manj IL-1 $\beta$  kot monociti iz zdravih darovalcev [46].



Slika 3: Regulacija NLRP3 z interferoni razreda I, avtofagijo in T celicami [47].

Druga študija kaže pomembnost IFN razreda I v zaviranju IL-1 v obeh vnetnih procesih, tako v monocitno-makrofagni populaciji kot pri dendritičnih celicah v pogojih *in vivo*/ med infekcijo z *M. tuberculosis*, pri kateri sta IL-1 $\alpha$  in IL-1 $\beta$  kritično potrebna za gostiteljevo odpornost [48].

### 1.1.2.3 Celice T

Pridobljeni imunski sistem ima lahko močan zaviralni učinek na prirojeni imunski sistem. Efektorske in spominske T-celice CD4<sup>+</sup> odpravijo od inflammasoma posredovano aktivacijo

kaspaze 1 in sproščanje IL-1 $\beta$  v makrofagih in dendritičnih celicah. Omenjeni zaviralni učinek zahteva stik med celicama in signalizacijo z ligandi iz naddružine TNF (CD40L, OX40L in RANKL). Še vedno pa je nejasno, kako interakcije med ligandi iz družine TNF in njihovimi receptorji posredujejo zaviranje kaspaze 1, od katere je odvisno nastajanje IL-1 $\beta$  [49].

Učinek IFN- $\gamma$  je sporen: IFN- $\gamma$  okrepi sproščanje IL-1 $\beta$  iz človeških celic, vendar prehodno zavira tvorbo IL-1 $\beta$  iz mišjih celic [48].

#### 1.1.2.4 Dušikov oksid

Dušikov oksid (NO) je majhna molekula, ki nastaja v številnih celicah, različnih tkivih in je vključena v številne fiziološke in patološke odzive, vključno s krvnim obtokom, krvnim tlakom, delovanjem trombocitov, obrambo gostitelja in prenosom signala v centralnem in perifernem živčnem sistemu [50]. Dušikov oksid igra mnogo vlog tudi v imunskem odzivu [51], vključno z nadzorom okužbe in regulacijo signalnih kaskad, transkripcijskih faktorjev, žilnih odgovorih, migraciji celic, tvorbi citokinov in T-celično diferenciacijo. NO je kot obrambni mehanizem pomemben predvsem pri miših, manj pri človeku [52].

Nedavna študija kaže, da dušikov oksid zavira aktivacijo inflammasoma NLRP3, kar preprečuje tvorbo agregatov ASC, aktivacijo kaspaze 1 in sekrecijo IL-1 $\beta$  v mieloidnih celicah miši. V makrofagih s pomanjkanjem inducibilne NO-sintaze (iNOS) je bila aktivacija inflammasoma NLRP3 okrepljena s kopičenjem nefunkcionalnih mitohondrijev. *In vivo* pomanjkanje iNOS ali farmakološko zaviranje nastajanja dušikovega oksida okrepi od NLRP3 odvisno nastajanje citokinov.

Dušikov oksid je znan kot imunomodularna molekula, čeprav so mehanizmi imunomodulacije slabo poznani. Ugotovili so, da je dušikov oksid kritični negativni regulator inflammasoma NLRP3 preko stabilizacije mitohondrijev [53].

### 1.1.2.5 Virusi

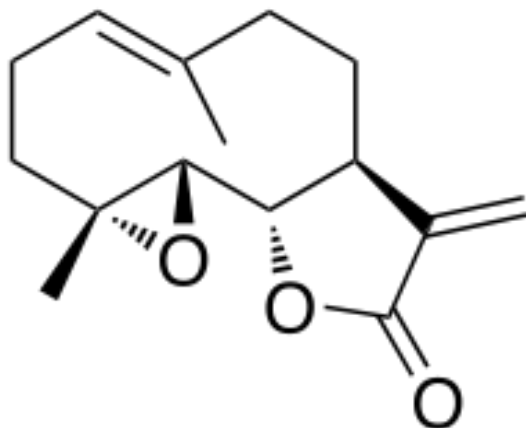
Virusi zavirajo aktivacijo inflammasoma NLRP3 na različne načine. Pri transgenih miših, ki nimajo komponent inflammasoma NLRP3, kot so NLRP3, ASC ali kaspaza 1, se je dramatično povečala smrtnost po virusni okužbi. Poleg proteinov POP (angl. *Pyrin-only proteins*, (glej 4.1.2)) in mikro RNA, nekateri virusi kodirajo specifične proteine, da bi zavrlji prirojeni imunski sistem gostitelja. Orf63 je virusni homolog humanega NLRP1, Kaposijevega s sarkomom povezanega herpes virusa (KSHV; angl. *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*). Orf63 blokira od NLRP1 odvisen odgovor prirojenega imunskega sistema, vključno z aktivacijo kaspaze 1 in zorenjem IL-1 $\beta$  in IL-18. Zaviranje izražanja Orf63 vodi k povečanemu izražanju IL-1 $\beta$  med življenjskim ciklom KSHV. Čeprav Orf63 ne kaže močne homologije z NLRP3, interagira z njim in zavira njegovo aktivnost [54].

## 1.3 Protivnetne učinkovine z delovanjem na inflammasom NLRP3

### 1.3.1 Partenolid in Bay 11-7082 kot zaviralca inflammasoma NLRP3

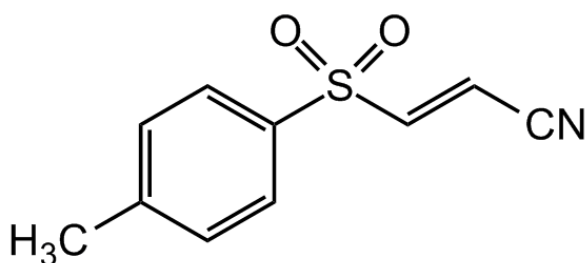
Inflammasom NLRP3 je pomembna komponenta prirojenega imunskega odgovora na široko paleto mikrobov in endogene nevarnostne signale, vključujoč bakterijske toksine, ATP in mononatrijeve uratne kristale (MSU) [55].

Partenolid (slika 4), Bay 11-7082 (slika 5) in strukturno sorodni fenil vinil sulfoni so prvi potencialni zaviralci nizke molekulske mase, ki ciljno delujejo na več nivojev aktivacije inflammasoma [56]. Partenolid je rastlinski seskviterpenski lakton, ki je komponenta zeliščnih zdravil za zdravljenje več vnetnih bolezni, vključujoč povišano telesno temperaturo, migrene, artritis, luskavico in aterosklerozo [57-59]. Nedavne študije so pokazale, da je zdravljenje s partenolidom izboljšalo preživetje miši po tretiranju z lipopolisaharidom (LPS), zaviralo je aterosklerotične spremembe v miših z dodanim apolipoproteinom (apoE) in izboljšalo stanje vnetja mehurja pri podganah. Te terapevtske učinke pripisujejo zaviranju NF- $\kappa$ B s partenolidom. Rezultati kažejo, da je močan zaviralec več inflammasomov. Pokazali so, da je partenolid neposredni zaviralec proteazne aktivnosti kaspaze 1; prav tako je zaviral ATPazno aktivnost NLRP3 (glej spodaj).



Slika 4: Strukturna formula partenolida [60]

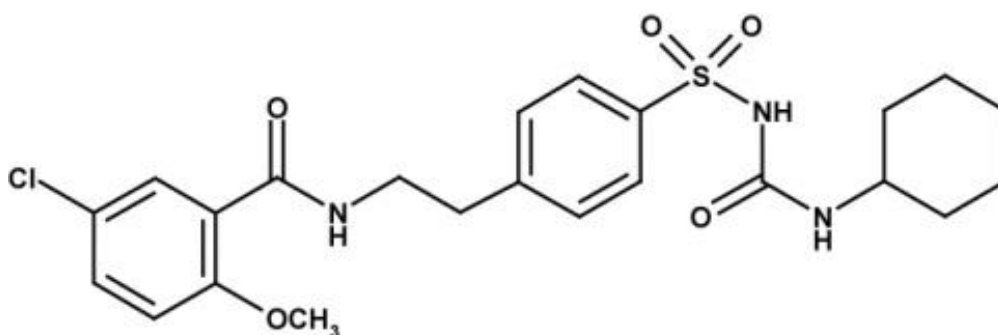
Sprememba v migraciji podenote p20 kaspaze 1 pri poliakrilamidni gelski elektroforezi SDS-PAGE, ki poteka pod denaturirajočimi pogoji, nakazuje da spojina zavira aktivnost kaspaze 1 z alkilacijo kritičnih cisteinskih ostankov v podenoti p20 kaspaze 1. Analiza z masno spektrometrijo je potrdila, da partenolid modificira aktivno mesto Cys285 kaspaze 1, cisteinski ostanek v podenoti p20. Za razliko od partenolida naj bi bile Bay 11-7082 in sorodne spojine bolj selektivne za inflamatom NLRP3, ker Bay 11-7082 ni zaviral aktivnosti kaspaze 1 v pogojih *in vitro*. Prav tako ni vplival na aktivacijo inflamatosoma NLRP1 preko letalnega toksina antraksa. Inflamatom NLRP1 ima tudi ATPazno aktivnost, ki je pomembna, da je le-ta sposoben aktivirati kaspazo 1 [61]. Poskusi nakazujejo, da Bay 11-7082 zavira ATPazno aktivnost NLRP1. Parcialni zaviralni učinek Bay 11-7082 na NLRC4, predhodno aktiviran s salmonelo, je lahko posledica toksičnega učinka Bay 11-7082 na samo salmonelo. Vzroke lahko iščemo tudi drugje, npr. v zaviranju makrofagnega sprejema bakterij, ali pa parcialni inhibiciji ATPazne aktivnosti samega NLRC4.



Slika 5: Strukturna formula Bay 11 – 7082 [62]

Kakorkoli, Partenolid, Bay 11-7082 in sorodni fenil vinil sulfoni zavirajo tarčne proteine najpogosteje preko alkilacije esencialnih aminokislinskih ostankov. Zaviranja z ATP inducirane aktivacije kaspaze 1 s partenolidom in Bay 11-7082 ob odstranitvi učinkovine ne znižamo, kar ustreza ireverzibilni kovalentni inaktivaciji.

Nedavne študije so jasno pokazale inhibitorni učinek Gliburida (slika 6) na inflamatom NLRP3 [63]. Gliburid je zdravilo za sladkorno bolezen tipa 2 in je približno desetkrat manj učinkovit kot Bay 11-7082 in ne vpliva na ATPazno aktivnost NLRP3, nakazuje tudi, da ni neposredni inhibitor NLRP3, ampak deluje hierarhično gledano za  $P_2X_7$  (dvo-transmembranski ionotropni receptor) in tako zavira aktivacijo inflamatosoma NLRP3.



Slika 6: Strukturna formula Gliburida [64]

V nasprotju z gliburidom predvidevajo glede na *in vitro* biokemične študije, da Bay 11-7082 inhibira ATPazno aktivnost NLRP3, ki je odgovorna za njegovo aktivacijo [65], kar kaže, da je učinek Bay 11-7082 in sorodnih vinil sulfonskih spojin na inflamatom lahko posledica zaviranja ATPazne aktivnosti NLRP3 s temi spojinami. Še vedno pa je možno, da te spojine, tako kot gliburid zavirajo aktivatorje NLRP3.

Nedavne raziskave strukture so pokazale, da so fenil vinil sulfoni in fenil vinil sulfonati ireverzibilni zaviralci protein tirozin fosfataz [66]. Zaradi strukturne podobnosti s fosfotirozinom se spojine vežejo na cistein v aktivnem mestu protein tirozin fosfataz z visoko afiniteto in ga inaktivirajo. Lizosomalni cisteinski protein katepsin B so v preteklosti obravnavali kot aktivator inflamatosoma NLRP3 [67-69]. Raziskava, v kateri so uporabili selektivne zaviralce katepsina B ali pa E-64, splošni zaviralec cisteinskih proteaz,



je pokazala, da nobena od spojin ni sposobna zavirati aktivacije kaspaze 1, inducirane z ATP.

Nedavne predklinične študije derivatov vinil sulfonskih spojin kot protiparazitnih sredstev na miših in psih so pokazale, da učinkovine niso mutagene, nimajo neželenih stranskih učinkov in imajo sprejemljiv farmokokinetični profil [70]. Nadalje ovrednotenje Bay 11-7082 in sorodnih vinil sulfon ali sulfonatnih spojin kot učinkovitih zaviralcev inflammasoma NLRP3 predstavlja okvir za prihodnji razvoj učinkovin, ki selektivno delujejo na inflamasom NLRP3 za zdravljenje vnetnih bolezni. Te spojine imajo tudi precejšen potencial kot sonde za opredelitev kritičnih komponent, ki z različnimi dražljaji sodelujejo v aktivaciji inflammasoma NLRP3.

### 1.3.2 Anakinra, canakinumab in rilonacept

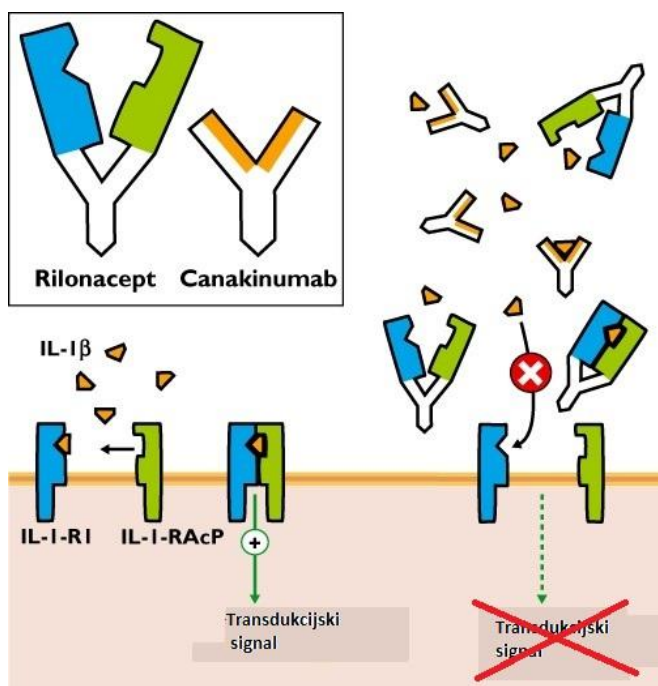
Anakinra je zdravilna učinkovina za zdravljenje revmatoidnega artritisa in je antagonist receptorja za IL-1. Gre za rekombinantno, neglikolizirano različico humanega antagonista receptorja interleukina-1 (IL-1-RA). Pripravljena je iz kulture gensko spremenjene *E. coli* z uporabo tehnologije rekombinantne DNA. Od nativnega humanega IL-1-RA se razlikuje po dodatku metioninskega ostanka na N-koncu [71]. Anakinra zavira biološko aktivnost IL-1, vključno z vnetjem in propadanjem hrustanca, povezanega z revmatoidnim artritissom.



Slika 7: Struktura anakinre [72]

Riloncept in canakinumab sta biološki učinkovini, ki sta kot zdravili siroti predpisani za zdravljenje s kriopirinom povezanih sindromov (CAPS). To je redka vnetna dedna bolezen, kjer imajo bolniki mutacijo v genu za NLRP3. Ti dve zdravili vrednotijo tudi v kliničnih poskusih za zdravljenje bolj pogostih boleznih, npr. revmatoidnega artritisa in sistemskega juvenilnega idiopatskega artritisa [73].

Pri bolnikih s CAPS prihaja do konstitutivnega izločanja IL-1 $\beta$ . IL-1 $\beta$  nato tvori kompleks z dvema receptorjema, in sicer receptorjem za IL-1 in pomožnim proteinom (IL-1-RAcP, angl. IL-1 receptor accessory protein). Oba receptorja tvorita kompleks na membrani, ki je potreben za transdukcijo signala. Riloncept in Canakinumab delujeta tako, da ujameta IL-1 $\beta$  preden se ta veže na receptorski kompleks in s tem preprečita proinflamatorne učinke, ki povzročijo izražanje simptomov CAPS. Riloncept sestavljata zunajcelični domeni IL-1-RAcP in IL-1-R1, spojeni s Fc-regijo humanega protitelesa IgG1. Canakinumab je specifično humano monoklonsko protitelo IgG1, usmerjeno proti IL-1 $\beta$ . To protitelo nima navzkrižne reaktivnosti z IL-1 $\alpha$  niti z receptorjem IL-1-R1. Vsa ta zdravila apliciramo subkutano, njihovi neželeni učinki so podobni in blagi. Z zaviranjem delovanja IL-1 slabimo odziv imunskega sistema, zato se kot neželeni učinek poveča dovzetnost za okužbe [74].



Slika 8: Mehanizem delovanja riloncepta in canakinumaba [75]

## 2 NAMEN DELA

Inflamasom NLRP3 poleg mikrobnih komponent aktivirajo tudi različne endogene molekule. Inflamasom NLRP3 igra tako pomembno vlogo pri različnih bolezenskih stanjih, od razmeroma redkih genetskih bolezni do pogostih bolezni, kot so sladkorna bolezen tipa II, srčno-žilne bolezni in nevrodegenerativne bolezni. Čeprav poznamo širok nabor različnih aktivatorjev inflamasoma NLRP3, mehanizma njegovega sestavljanja ne poznamo, tako je tudi načrtovanje zaviralcev inflamasoma NLRP3, ki jih sicer nujno potrebujemo, zapleteno.

V magistrskem delu bomo načrtovali peptidne zaviralce inflamasoma NLRP3. Pri načrtovanju peptidnih zaviralcev se bomo oprli na znane strukture proteinov, ki sodelujejo pri tvorbi inflamasoma ali pa jo zavirajo. Uporabili bomo tudi obstoječe znanje o interakcijah med temi proteini. V času načrtovanja peptidov so bile znane strukture le manjših proteinov, npr. adaptorja ASC, in še to le v monomerni obliki, tako smo lahko le predpostavili, da bodo peptidi zavirali aktivacijo inflamasoma NLRP3.

Odziv inflamasoma NLRP3 lahko sprožijo različni aktivatorji. Zanima nas, kako bodo učinkovali peptidi pri odzivu na različne aktivatorje, kar bomo spremljali na celični liniji mišjih makrofagov. Uporabili bomo topne aktivatorje (ATP, nigericin) in koloidne aktivatorje (alum, nanodelci SiO<sub>2</sub>) ter spremljali zorenje vnetnega citokina IL-1 $\beta$  z encimskoimunskim testom. V nekaterih primerih bomo spremljali tudi vpliv peptidov na preživelost celic po tretiranju z aktivatorji. Ker gre verjetno v primeru vseh aktivatorjev za enako sestavljanje inflamasoma NLRP3, predvidevamo, da bo tudi učinek peptidov podoben v primeru vseh uporabljenih aktivatorjev.

Zanima nas tudi, kako učinkoviti bodo peptidi v primerjavi z že znanima zaviralcema partenolidom in Bay11-7082, katerih delovanje bomo tudi ovrednotili s spremljanjem zorenja IL-1 $\beta$  z encimskoimunskim testom.

Peptidni zaviralci inflamasoma so pomembni tako zaradi pojasnitve mehanizma sestavljanja inflamasoma NLRP3 kot tudi kot osnova za načrtovanje novih in specifičnih zaviralcev inflamasoma NLRP3.

### 3 METODE IN MATERIALI

#### 3.1 Materiali

##### 3.1.1 Kemikalije

Preglednica I: Uporabljene kemikalije, standardi in encimi

Proizvajalec	Kemikalije
Sigma	Gliburid
	ATP
	Bay 11-7082
	Nigericin
	Partenolid
	Tripsin
	Triton X-100
	Tween-20
	DMSO
	XTT(2,3-Bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2 <i>H</i> -tetrazolijev-5-karboksanilid)
	INT (Jodonitrotetrazolijev klorid)
	LAKTAT
	PMS (Fenazin metosulfat (P – 9625))
	NAD
	ProteoGenix
Invitrogen	Tripansko modro
eBioscience	Komplet za encimskoimunski test za IL-1 $\beta$
Invivogen	Silica
	LPS <i>E. coli</i> O111:B4
Thermo Scientific	Alum

### 3.1.1.2 Uporabljene raztopine in pufri

Preglednica II: Uporabljene raztopine in pufri

Proizvajalec	Raztopina / puffer
GIBCO	Dulbecco modificiran Eagle medij (DMEM)-medij za gojenje celic Goveji fetalni serum (FBS) Fosfatni puffer s soljo (PBS) Voda
	<b>Puffer (0,2 M Tris HCl pH 8,2)</b>
	<b>Puffer za spiranje (PBS, 0.05% Tween-20)</b>

### 3.1.1.3 Laboratorijska oprema in potrošni material

Preglednica III: Uporabljena laboratorijska oprema in potrošni material

Proizvajalec	Laboratorijska oprema / potrošni material
Kambič (Slovenija)	Avtoklav
Eppendorf	Avtomatske pipete z maksimalnim volumnom pipetiranja: 1 mL, 200 µL, 100 µL, 20 µL, 10 µL, 2,5 µL
Gilson	Avtomatske pipete z maksimalnim volumnom pipetiranja: 5 mL, 1 mL, 200 µL, 100 µL, 20 µL Avtomatski hemocitometer Countessa
Invitrogen	Avtomatski števec celic Countess
Eppendorf	Namizna centrifuga MiniSpin
<b>Hanna Instruments</b>	<b>Magnetno mešalo</b>
<b>Nunc</b>	<b>Mikrotitrne plošče Maxisorp</b>
<b>TPP</b>	<b>Posode za gojenje celic (75 cm<sup>2</sup>), drugi</b>

---

<b>HP</b>	<b>plastični pripomočki za gojenje celic</b> <b>Spektrofotometer in pripadajoči</b> <b>računalniški program za obdelavo</b> <b>podatkov</b>
<b>Tehtnica Železniki</b>	<b>Stresalnik</b>
<b>Sartorius</b>	<b>Tehtnica ET – 1111</b> <b>Tehtnica – analitska</b>
<b>Tehtnica</b>	
<b>Binder</b>	<b>Vibracijski mešalnik - Vibromix 104</b>
<b>Iskra pio</b>	<b>EV</b> <b>Inkubator za gojenje celic</b> <b>Brezprašna komora</b>

---

### **3.2 Metode dela**

#### **3.2.1 Načrtovanje peptidnih inhibitorjev**

V postopku načrtovanja zaviralcev inflammasoma NLRP3 peptidnega izvora smo se opirali na že znane strukture proteinov, ki sodelujejo bodisi pri tvorbi inflammasoma, ali pa jo zavirajo. Pristop je podrobneje predstavljen v poglavju 4.1, (glej tudi preglednico IV).

#### **3.2.2 Delo s sesalskimi celičnimi kulturami**

V magistrski nalogi smo uporabili celično linijo imortaliziranih makrofagov iz kostnega mozga miši C57BL/6, ki je bila darilo K. Fitzgerald (Univerza Massachusetts, ZDA). Pri delu s sesalskimi celičnimi linijami smo uporabili nekatere osnovne tehnike, kot so odmrznitev celic, tripsinizacija, redčenje in pa štetje le teh. Delo z omenjenimi celičnimi linijami poteka v brezprašni komori pod aseptičnimi pogoji, da preprečimo možnost kontaminacije med delom.

### 3.2.2.1 Odmrznitev

Trajne kulture sesalskih celičnih linij so zamrznjene v mediju, ki ga sestavljata 90 % goveji fetalni serum (FBS) in 10 % DMSO. Shranjujemo jih v posebnih posodah (proizvajalca CBS), v parah tekočega dušika in pri temperaturi  $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$ . DMSO je krioprotektivna snov, ki zmanjšuje tveganje za nastanek kristalov in celične poškodbe. Pri temperaturi  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  je DMSO citotoksičen v tako visoki koncentraciji, zato ga je med odmrzovanjem potrebno odstranjevati. Hitro odmrznjeno celično kulturo (1-1,5 mL) smo v 15 mL sterilni centrifugirki razredčili z 10 mL gojišča DMEM (Gibco) z 10 % FBS. Po petminutnem centrifugiranju pri 1200 rpm smo gojišče odstranili in celice ponovno suspendirali ter jih prestavili v posodo za gojenje. Celice smo gojili v pogojih 5 % ogljikovega dioksida v inkubatorju pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.2.2 Tripsinizacija

S postopkom tripsinizacije želimo doseči prekinitev proteinskih povezav med celicami in pa med celicami ter posodo za gojenje. To nam omogočata proteaza tripsin in kelator EDTA. Postopek tripsinizacije najpogosteje uporabljamo pri redčenju celičnih kultur ali pred nasajanjem celic za eksperimente. Po končani tripsinizaciji ostanejo celice suspendirane v ravnem gojišču. Nadalje je potrebno inaktivirati tripsin in EDTA, to pa dosežemo z dodatkom gojišča s serumom. Slednji je bogat s proteini in dvovalentnimi magnezijevimi oz. kalcijevimi ioni.

Da nam je v posodi za gojenje ostala samo celična linija, smo iz posode posrkali gojišče. Celice smo sprali s 5 mL pufra PBS in pri tem pazili, da ga nismo dodali neposredno na celice. Nato smo dodali 2,5 mL tripsina, ki služi za ločevanje celic od površine posode za gojenje in celice nekaj minut inkubirali pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Za ponovno suspendiranje celic smo dodali 7,5 mL gojišča DMEM z 10 % govejega fetalnega seruma (FBS). Ustrezno količino ponovno suspendiranih celic smo gojili dalje.

### **3.2.2.3 Redčenje**

Vzdrževanje celične linije vključuje tudi menjavo in pa redčenje celičnih linij, ko le-te dosežejo ustrezno gostoto. Najprej je bilo potrebno odstraniti staro gojišče in opraviti tripsinizacijo. Od zelene gostote celic je bilo nadalje odvisno, kolikšen volumen celic smo premestili v novo posodo za gojenje in dodali ustrezen volumen gojišča do skupnega volumna 10 mL.

### **3.2.2.4 Štetje celic**

Z avtomatskim hemocitometrom Countess smo določali število celic. V napravo smo vstavili stekelce z vzorcem in določili število celic v 1 mL gojišča. Vzorec smo predhodno pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirki zmešali 10  $\mu$ L 0,4 % barvila tripansko modro in 10  $\mu$ L celic. Od tako pripravljenega vzorca smo na stekelce nanegli 10  $\mu$ L. Barvilo tripansko modro prehaja samo skozi membrane mrtvih celic in na podlagi tega lahko ločimo med mrtvimi in živimi celicami.

### **3.2.3 Priprava raztopine aktivatorjev oz. inhibitorjev**

Pri pripravi aktivatorjev oz. inhibitorjev izhajamo iz začetne znane koncentracije ali pa molekulske mase. Vsaka spojina ima svojo dokumentacijo, iz katere razberemo njene osnovne lastnosti. Primerno zatehto smo raztopili v ustreznem volumnu topila (DMSO) do želene koncentracije.

### **3.2.4 Aktivacija inflamasma NLRP3**

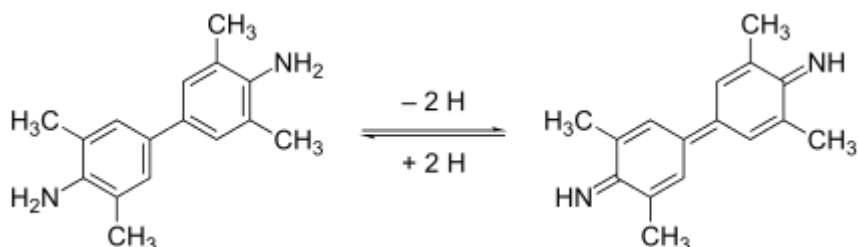
Na začetku poskusa smo na mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami sejali makrofage. Po 10-12-urni inkubaciji smo gojišče zamenjali za gojišče brez seruma. Slednje je vsebovalo 100 ng/mL LPS. Na posamezno vdolbinico smo dali 100  $\mu$ L. Mikrotitrsko ploščo smo pustili čez noč v inkubatorju pri 37 °C. Po 12-16-urni inkubaciji z LPS smo gojišče odstranili in na posamezno vdolbinico dodali po 80  $\mu$ L že pripravljenih raztopin inhibitorjev.



Najprej smo uporabili že preverjene inhibitorje inflammasoma NLRP3, kot so partenolid, Bay 11-7082 in gliburid. V nadaljnjih poskusih smo preverjali naše izbrane peptide P1 – P4. Po uri inkubacije smo dodali po 20  $\mu$ L aktivatorjev. Vsak posamezni pogoj smo izvedli v treh ponovitvah. Po določenem času, ki je potreben, da posamezni aktivator ustrezno deluje, smo ločili celično gojišče od celic in ga shranili do analize pri  $-80^{\circ}\text{C}$ .

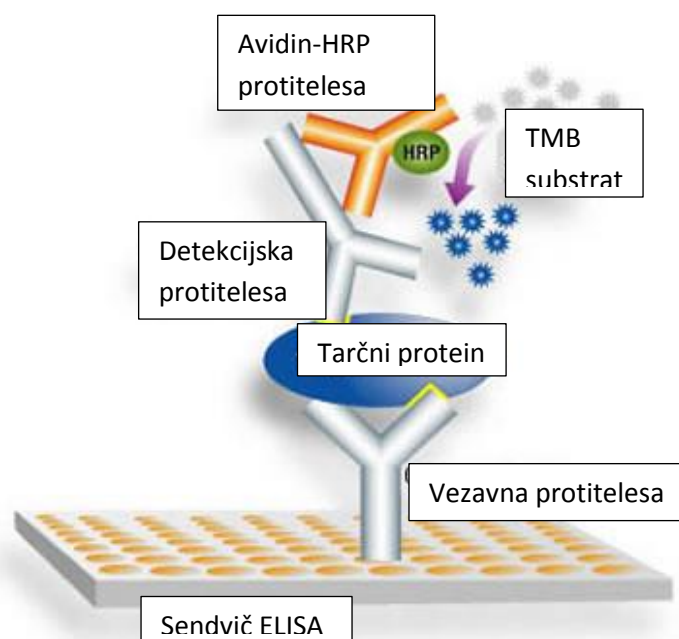
### 3.2.4.1 Encimskoimunski test (ELISA)

Encimskoimunski test smo uporabili za določanje koncentracije IL-1 $\beta$ , ki se je ob aktivaciji inflammasoma izločil v gojišče. Uporabili smo tehniko neposrednega testa (sendvič) ELISA. Princip te tehnike je ujetje antigena med dve protitelesi. Najprej specifično protitelo za IL-1 $\beta$  ujame antigen na površino mikrotitrne plošče. S spiranjem odstranimo vse nevezane antigene. Na ujete antigene se nato veže primarno detekcijsko protitelo z vezanim biotinom. Biotin ima močno afiniteto za intermolekularno vezavo z avidinom ali streptavidinom. Nevezana detekcijska protitelesa speremo. Na biotin se veže avidin, ki je konjugiran s hrenovo peroksidazo (HRP). Pri nadaljnjem spiranju odstranimo le presežni konjugat avidin-HRP. Ob prisotnosti oksidantov, kot je  $\text{H}_2\text{O}_2$  in peroksidaz, kot je HRP, se kromogeni substrat TMB (3,3',5,5' – tetrametilbenzidin) oksidira. Nastane 3,3',5,5' – tetrametilbenzidin diimin, ki ima strukturo s sistemom sedmih konjugiranih vezi.



Slika 9: Oksidacija TMB do 3,3',5,5' – tetrametilbenzidin diimin [76]

Pri tej reakciji molekula izgubi aromatični značaj. Produkt ima več konjugiranih dvojnih vezi, kar se kaže v elektronski gostoti, ki absorbira svetlobo vidnega dela spektra. Posledica tega je nastanek modre barve. Ob koncu testa dodamo raztopino za ustavitev reakcije in barva se spremeni iz modre v rumeno. Absorbanco smo detektirali pri valovni dolžini 450 nm. Koncentracijo analita v vzorcih določimo s pomočjo raztopin standarda in umeritvene krivulje njihove absorbance.



**Slika 10: Zaporedje vezave pri testu sendvič ELISA [77]**

Za test ELISA smo uporabili posebne mikrotitrne plošče z visoko kapaciteto vezave proteinov. Dan pred izvajanjem testa smo na mikrotitrsko ploščo nanesli po 100  $\mu\text{L}$  raztopine protiteles (vsa protitelesa pri IL-1 $\beta$  redčimo 250  $\times$ , da dobimo delovno koncentracijo; koncentracija ni znana) na posamezno vdolbinico. Ploščo smo preko noči inkubirali pri 4  $^{\circ}\text{C}$ . Nato smo ploščo petkrat sprali s pufrom za spiranje. Dodali smo 200  $\mu\text{L}$  blokirnega pufra na posamezno vdolbinico in inkubirali eno uro na stresalniku. Sledilo je petkratno spiranje s pufrom za spiranje. Zatem smo v vdolbinice nanesli 50  $\mu\text{L}$  analiznega pufra. V vdolbinice, ki smo jih namenili za standard, pa smo v prvo vdolbinico dodali še 50  $\mu\text{L}$  analiznega pufra in izvedli serijsko redčitev standarda za faktor 2. V preostale vdolbinice smo prenesli po 50  $\mu\text{L}$  celičnega supernatanta. Sledila je dvournna inkubacija na stresalniku in ponovno petkratno spiranje. Potem smo dodali 100  $\mu\text{L}$  protiteles za detekcijo, inkubirali eno uro na stresalniku in ponovno petkrat sprali. Dodali smo še 100  $\mu\text{L}$  detekcijskega konjugata avidin-HRP in inkubirali 30 minut na stresalniku in sedemkrat sprali s pufrom za spiranje. Povsem na koncu smo dodali 100  $\mu\text{L}$  substrata TMB in opazovali nastanek modre barve. Raztopino za ustavitev reakcije (fosforjeva(V) kislina) smo dodali po 10 minutah. Absorbanco smo pomerili na čitalcu mikrotitrskih plošč.

### 3.2.5 Piroptoza in preživelost celic po tretiranju z aktivatorji inflammasoma v prisotnosti zaviralcev

#### 3.2.5.1 Preizkusi citotoksičnosti

Izraz citotoksičnost pomeni strupenost za celice. S tem ko izpostavimo celice citotoksičnim snovem, lahko izzovemo različne pojave:

- nekrozo: celica izgubi integriteto membrane, pride do lize in celica propade;
- zmanjšanje viabilnosti: celica preneha s svojo aktivnostjo, rastjo in razmnoževanjem;
- apoptozo: programirana celična smrt.

Nekrozo celic prepoznamo po hitrem nabrekanju, izgubi membranske integritete, zmanjšani presnovi in izpustu vsebine celice v okolje. V *in vitro* razmerah lahko celice doživijo hitro nekrozo, kar pomeni, da te celice niso sposobne aktivirati apoptotičnega mehanizma in ne izražajo apoptotskih označevalcev. Za apoptozo so značilni dobro definirani celični in molekularni dogodki, npr. sprememba v refrakcijskem količniku celice, krčenje citoplazme, kondenzacija jedra in cepitev DNA v fragmente določene velikosti. Apoptotične celice sčasoma preidejo v sekundarno nekrozo. V tej fazi ustavijo svojo presnovo, izgubijo membransko integriteto in lizirajo.

Preskuse citotoksičnosti pogosto uporabljamo predvsem v farmaciji, kjer preverjamo citotoksičnost snovi. *In vitro* kultivirane celice so najpogosteje heterogene populacije, ki lahko reagirajo v roku nekaj ur do nekaj dni, če so izpostavljene toksinom. To je odvisno od številnih dejavnikov: mehanizma celične smrti, koncentracije toksina in časa izpostavljenosti toksinu. Kot rezultat poskusov večinoma dobimo povprečje celotne celične populacije [78].

V uporabi so različni testi, ki omogočajo določitev citotoksičnih sprememb v celici:

- Test viabilnosti se nanaša na takojšnjo odzivnost celice, npr. sprememba v permeabilnosti membrane celice;
- Test preživetja gre za dolgotrajno ohranitev celične kulture (5 in več generacij);
- Inflamatorni test;

- Metabolni test določa spremembe v presnovi [79].

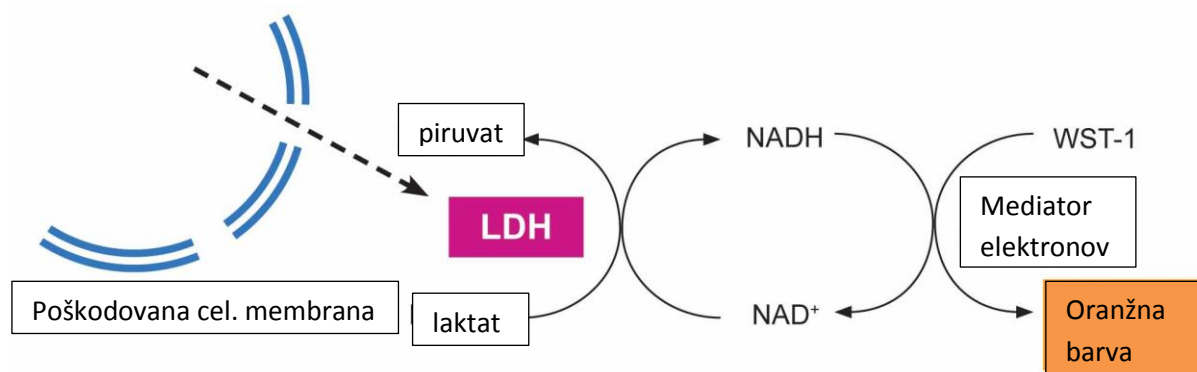
### 3.2.5.1.1 Test viabilnosti

Ocenjevanje integritete celične membrane je eden najpogostejših načinov merjenja celične viabilnosti in citotoksičnih učinkov. Spojine, ki imajo citotoksični učinek, pogosto spremenijo integriteto membrane. Nekatera barvila (propidijev jodid, eritrozín, nigrozín, naftalensko črno...) po navadi ne morejo vstopiti v zdravo celico, ko pa pride do izgube membranske integritete, pa lahko prosto vstopajo preko membrane in obarvajo znotrajcelično vsebino. Membransko integriteto lahko ocenjujemo tudi s sprostitvijo snovi, ki se običajno nahajajo v notranjosti celic (npr. laktat dehidrogenaza) [78].

#### 3.2.5.1.1.1 Test LDH

Piroptozo, to je nekrotična celična smrt, katere značilnost je aktivirana kaspaza 1, smo spremljali s testom izločanja laktat-dehidrogenaze (LDH).

Test LDH ni specifičen, kajti uporabljamo ga pri vrednotenju številnih bolezni in stanj. LDH je encim, ki ga najdemo v vseh vrstah celic in katalizira oksidacijo laktata do piruvata v prisotnosti koencima  $\text{NAD}^+$ . Zunajcelična prisotnost LDH pomeni, da so celice poškodovane. Do poškodb oz. oslabitev celice lahko pride zaradi celičnega stresa, mehanskih poškodb, kemikalij ali medceličnih signalov. Merjenje količine sproščene LDH iz celic predstavlja eno glavnih metod za presojo celične smrti. Kot pokazatelj, koliko NADH je nastalo ob katalizi z LDH, uporabljamo tetrazolijevo barvilo (slika 11).



Slika 11: Mehanizem LDH detekcije [80]

Za izvedbo testa smo potrebovali:

<b>Pufer</b>	0,2 M Tris pH 8
<b>Laktat</b>	50 mM mlečne kisline v pufru
<b>PMS</b>	Fenazin metosulfat (P – 9625) 0,9 mg/100 $\mu$ L MQ
<b>NAD</b>	NAD (N – 0632) 8,6 mg/2,3 mL MQ
<b>INT</b>	Jodonitrotetrazolijev klorid (I – 8377) 3,3 MG/100 $\mu$ L
<b>DMSO</b>	

Za izvedbo testa smo najprej pripravili posamezne komponente, ki jih potrebujemo. Nato smo zmešali 100  $\mu$ L PMS, 100  $\mu$ L INT in 2,3 mL NAD, nastala raztopina je stabilna nekaj ur, čeprav lahko pride do rahle potemnitve. Odvečno raztopino smo zamrznili in jo shranili za naslednji poizkus.

Na mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami smo najprej dodali reagente; 50  $\mu$ L pufra (200 mM Tris s pH 8), 50  $\mu$ L 50 mM laktata in 50  $\mu$ L pripravljene raztopine PMS, INT in NAD. Nato smo nanесли 50  $\mu$ L vzorca na posamezno vdolbinico.

Za kasnejši izračun citotoksičnosti (%) potrebujemo: vzorce v najmanj treh paralelah, ozadje (samo pufer brez celic), negativno kontrolo (netretirane celice) in pozitivno kontrolo (1% Triton X-100 v gojišču). Absorbanco smo merili po končani reakciji pri 490 nm.

Citotoksičnost smo normalizirali na negativno kontrolo (netretirane celice) po formuli 1, kjer  $OD_{neg}$  pomeni absorbanco slepega vzorca (netretirane celice) in  $OD_{poz}$  absorbanco pozitivne kontrole (celice, tretirane z 1% Tritonom X-100).

$$\text{CITOTOKSIČNOST (\%)} = (\text{OD}_{\text{vzorec}} - \text{OD}_{\text{neg}}) / (\text{OD}_{\text{poz}} - \text{OD}_{\text{neg}}) \times 100 \quad (\text{formula 1})$$

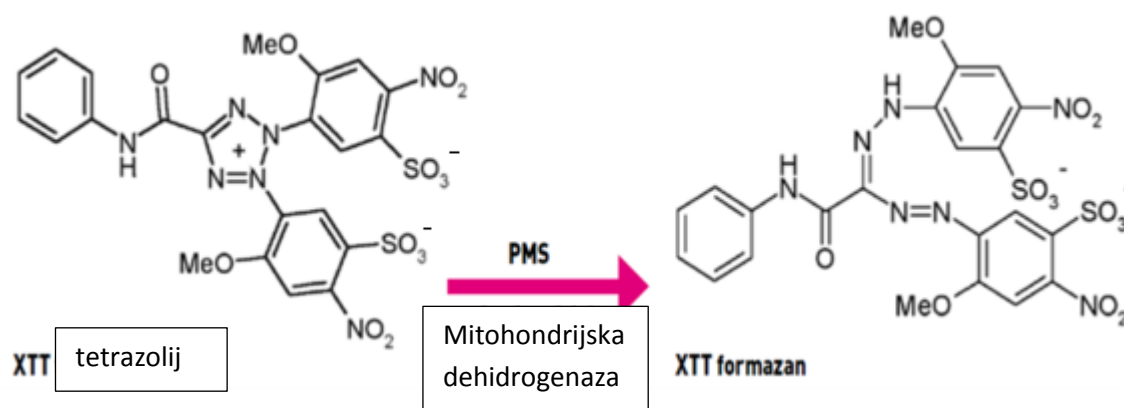
#### 3.2.5.1.1.2 XTT-test viabilnosti

XTT-test viabilnosti je kolorimetrični test, ki zazna metabolično aktivnost celic. Med testom se v metabolično aktivnih celicah rumena tetrazolijeva sol XTT s pomočjo encimov dehidrogenaz reducira v močno obarvan formazan. Pretvorba se pojavi samo v živih,

vitalnih celicah in tako proizvedena količina formazana je sorazmerna številu živih celic v vzorcu.

Barvilo formazan, ki se tvori, je topno v vodni raztopini in ga kvantificiramo spektrofotometrično, z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 450 nm. Celična preživelost in proliferacijski testi so široko uporabljeni pri odkrivanju in karakterizaciji novih učinkovin, za proučevanje rastnih dejavnikov, citokinov in citotoksičnih snovi. Rešetanje visokih zmogljivosti (HTS) v fazi razvoja učinkovin in kasneje v študijah varnosti zdravil in toksičnosti zahteva zanesljive, občutljive in preproste teste z zmožnostjo analize velikega števila vzorcev [81].

Za izvedbo testa smo predhodno pripravili raztopini XTT (0,9 mg/mL v gojišču brez fenolno rdečega) in PMS (0,3 mg/mL v MQ na -20 °C in v temi) in ju zamrznili do uporabe. Pred uporabo smo 5 mL XTT dodali 100  $\mu$ L, kar zadošča za ploščo s 96 vdolbinicami. Nadalje smo celicam zamenjali gojišče za 100  $\mu$ L gojišča brez fenolno rdečega in dodali 50  $\mu$ L zmesi XTT+PMS. Časovni odziv XTT testa je odvisen od gostote celic, zato odzive spremljamo ob različnih časih (npr. po 1h, 2h, 3h... 12h).



Slika 12: Sprememba, ki jo spremljamo pri testu XTT [82].

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 Izbor in načrtovanje peptidov

Pri aktivaciji inflammasoma NLRP3 pride do spremembe v konformaciji receptorja NLRP3, ki povzroči oligomerizacijo. Oligomeri NLRP3 nato preko svojih pirinskih domen vežejo pirinske domene adaptorja ASC. Na slednjega se preko CARD-CARD interakcij veže prokaspaza 1 in se avtoproteolitično aktivira.

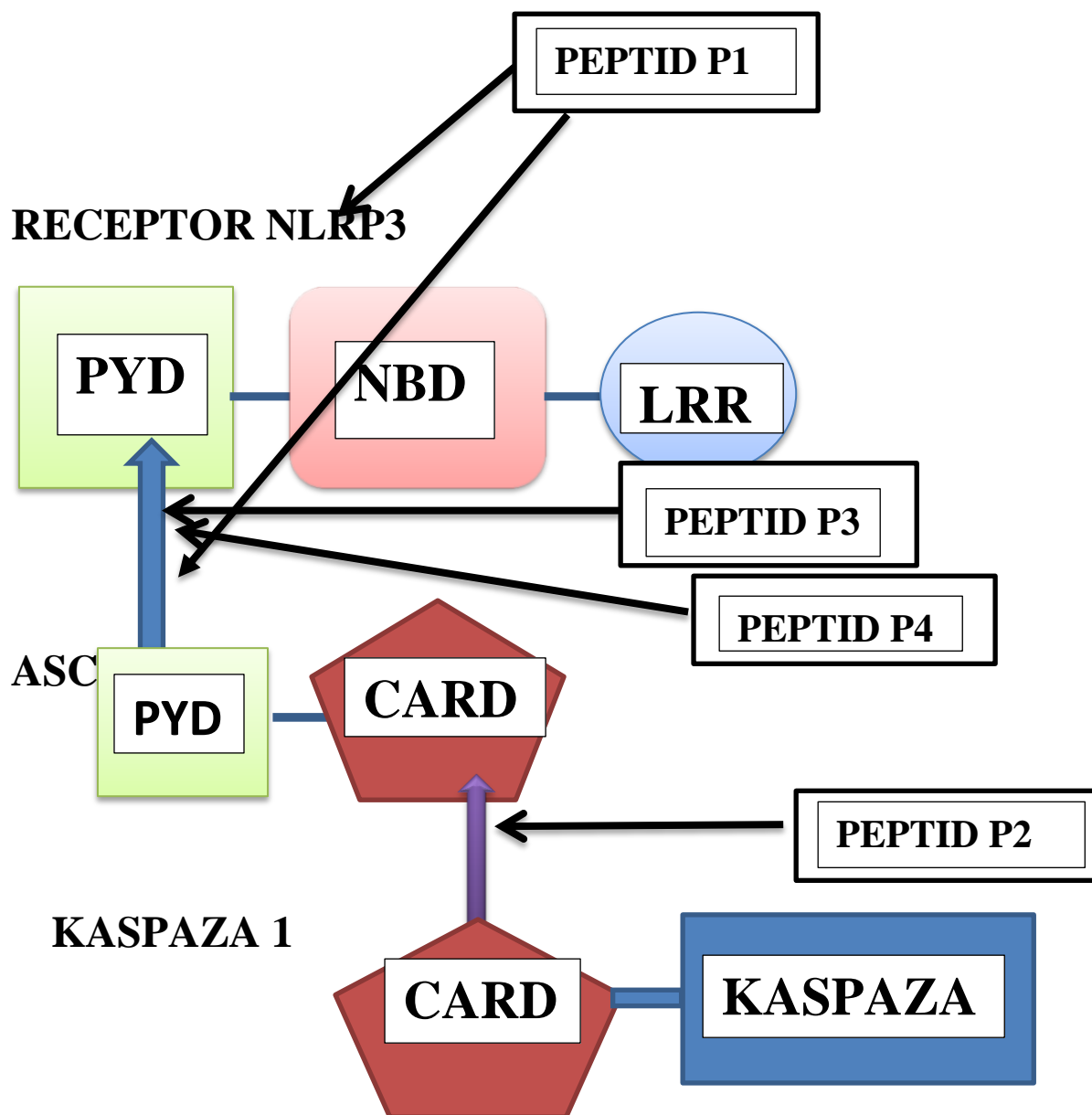
V nalogi smo načrtovali peptidne inhibitorje inflammasoma NLRP3 (sintetizirali so jih v Proteogenix, Francija) in sicer tako, da bi potencialno blokirali določene interakcije v inflammasomu NLRP3. Predvsem smo v magistrski nalogi želeli oslabiti interakcije med domenami PYD/PYD NLRP3 in ASC ter interakcije med CARD/CARD domenami ASC in prokaspaze 1. Na sliki 13 shematsko prikazujemo, na katere interakcije naj bi načrtovani peptidi delovali.

V spodnji tabeli so navedena zaporedja peptidov, ki smo jih izbrali za našo raziskavo kot potencialne inhibitorje inflammasoma NLRP3. V nadaljevanju pojasnjujemo podrobneje, kaj je bila osnova za izbiro posameznega peptida. Pri tem smo načrtovali tudi miristoilacijo (konjugacijo z miristinsko kislino), kjer opravimo modifikacijo na N – koncu peptida, da le ta lažje prehaja v celico [83]. Na N-koncu smo dodali tudi triptofan, da bi lahko spektroskopsko spremljali koncentracijo peptida ter na C-koncu lizin za potencialne kemijske modifikacije.

**Preglednica IV: Izbor peptidov kot potencialnih zaviralcev inflammasoma NLRP3**

KRATKA OZNAKA PEPTIDA	IME PEPTIDA	ZAPOREDJE	MODIFIKACIJE
P1	<b>POP2H1</b>	<b>WGG</b> MASSAELDFNLQALLEQLSQDE <b>K</b>	N-MYR
P2	<b>mASCCARDH</b>	<b>WGG</b> VDGVLDALHGSVLTEGQYQAVR <b>K</b>	N-MYR

	2H3		
P3	mASCPYDH2H3	WGGGDELKKFKMKLLTVQLREGYGRIPRG ALLQK	N-MYR
P4	mNlrp3PYDH2H3 3	WGGDVDLKKFKMHLEDYPPEKGCIPVPRGQ MEKADK	N-MYR



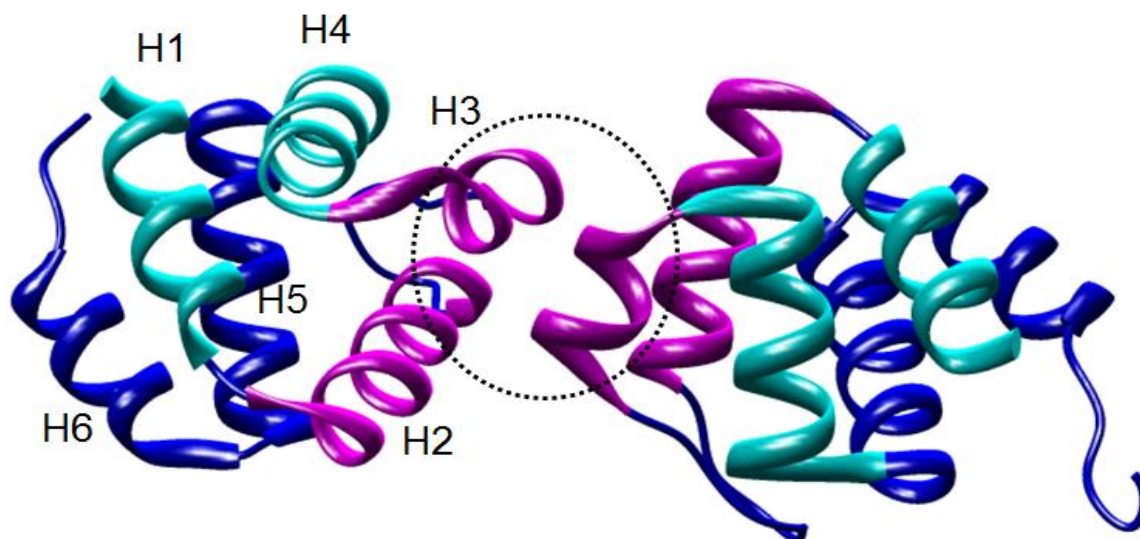
Slika 13: Shema interakcij pri sestavljanju inflammasoma NLRP3 in predvidena mesta delovanja izbranih peptidnih zaviralcev



#### 4.1.1 Izbor peptida iz domene PYD proteina NLRP3

Inflamasom NLRP3 je sestavljen iz treh delov (NLRP3, ASC in kaspaza 1) in nastanek inflamasoma lahko vodi v aktivacijo vnetnih kaspaz, kot je kaspaza 1, ki aktivira provnetne citokine s proteolitično cepitvijo. Inflamasom NLRP3 se sestavlja preko PYD/PYD interakcij med ASC in NLRP3 in CARD/CARD interakcij med ASC in prokaspazo 1 (slika 13). Pri načrtovanju peptidnih zaviralcev interakcije PYD/PYD smo se oprli na znane strukture domen PYD, ter študije, ki so spremljale interakcije med njimi.

Določena je bila tudi kristalna struktura domene PYD iz NLRP3 pri ločljivosti 1,7 Å (84). Domena PYD NLRP3 vsebuje šest vijačnic (H1 – H6), N- in C-konci polipeptidne verige pa ležijo na isti strani molekule (slika 14). Vijačnice so sestavljene iz ostankov 6–16, 21–31, 43–48, 51–62, 64–78 in 81–90 ter so oštevilčene od H1 do H6. Vijačni snop je tesno povezan s hidrofobnim jedrom, ki vsebuje Leu-10, Ala-11, Tyr-13 in Leu-14 iz H1; Phe-25 in Leu-29 iz H2; Leu-54, Ala-55 in Met-58 iz H4; Ala-67, Ile-74 in Phe-75 iz H5; ter Ala-87 iz H6. Drugi hidrofobni predel obsega Phe-32, Ile-39, Pro-40, Leu-41, Pro-42, Leu-57 in Phe-61 in sodeluje pri stabilizaciji H3 [85], podobno kot so zaznali pri NLRP7 PYD [86].



**Slika 14: Model strukture PYD NLRP3 [Izrisano s programom za modeliranje na osnovi kordinat ABCD iz podatkovne baze Protein Data Bank]. Posamezni monomer sestavlja šest  $\alpha$ -vijačnic (H1-H6). Obkrožena je interakcijska površina med obema monomeroma v dimeru.**

Struktura PYD NLRP3 zagotavlja začetni korak obrazložitvev inflamatomom posredovane aktivacije kaspaze 1. Drugi hidrofobni predel, ki omogoča tvorbo H3 in ga sidra na H2, je bil odkrit v strukturi PYD NLRP7, ne pa tudi v PYD NLRP1.

Dve molekuli PYD NLRP3 v asimetrični enoti tvorita simetrični dimer (slika 14) pretežno preko elektrostatskih interakcij. Glavne povezave so med Glu30 (na H2), Asp31 (na H2) in Arg43 (na H3) iz prve PYD NLRP3 z identičnimi molekulami na drugi molekuli. Čeprav smo zaznali oligomerizirano obliko PYD NLRP3, je večina PYD v fizioloških pogojih v monomerni obliki. Tako je mogoče, da dimer nima biološkega pomena in je le posledica kristalizacijskega postopka. Med različnimi strukturami PYD opazamo razlike predvsem v dolžini in strukturiranosti zanke med H2 in H3 ter orientaciji vijačnic v tem predelu, kar nakazuje, da bi bil ta predel lahko pomemben za specifičnost interakcij. Ta predel je tudi najbolj variabilen.

V kompleksu domen CARD iz APAF-1 (apoptotični proteazni aktivatorski dejavnik 1) in prokaspaze 9 igrajo pomembno vlogo predvsem elektrostatske interakcije. Hidrofobni segment, ki ga tvorijo Ile39, Pro40, Leu41 in Pro42 na zanki H2-H3 ter Leu57 in Phe61 na H4, je prisoten v PYD NLRP7, ASC in ASC2 in prav tako je ohranjen tudi v PYD NLRP3. Ob izpostavitvi na površini bi lahko imel tudi funkcionalni pomen pri sestavljanju inflamatosoma za aktivacijo kaspaze 1. Številni ostanki na površini so vidno ohranjeni med PYD NLRP3 iz drugih PYD domen, ki naj bi interagirali z ASC PYD. To vključuje Leu17, Leu22, Pro33, Pro34, His51, Val52, Ile59, Gly63, Ile78 in Tyr84. Poleg teh hidrofobnih ostankov imamo še deset površinsko nabitih ostankov, ki so ohranjeni med različnimi PYD. Pri PYD NLRP3 v interakcijah najverjetneje sodelujejo tako elektrostatske kot tudi hidrofobne interakcije.

Na osnovi znane strukture dimera PYD NLRP3 [85] in primerjav z drugimi proteini PYD smo za študije zaviranja inflamatosoma izbrali peptid iz predela H2-H3 domene PYD mišjega NLRP3 (peptid P4).

#### 4.1.2 Izbor peptida iz proteina POP2

Proteini, ki vsebujejo le pirinsko domeno (Pyrin-only proteins-POPs) se nahajajo le pri opicah starega sveta (ozkonosih opicah), človeku podobnih opicah in človeku. Zakaj primati potrebujejo POP, ni znano, čeprav humane avtoinflamatorne bolezni nakazujejo, da bi bili lahko bistvenega pomena pri fiziološkem uravnavanju vnetnih mediatorjev.

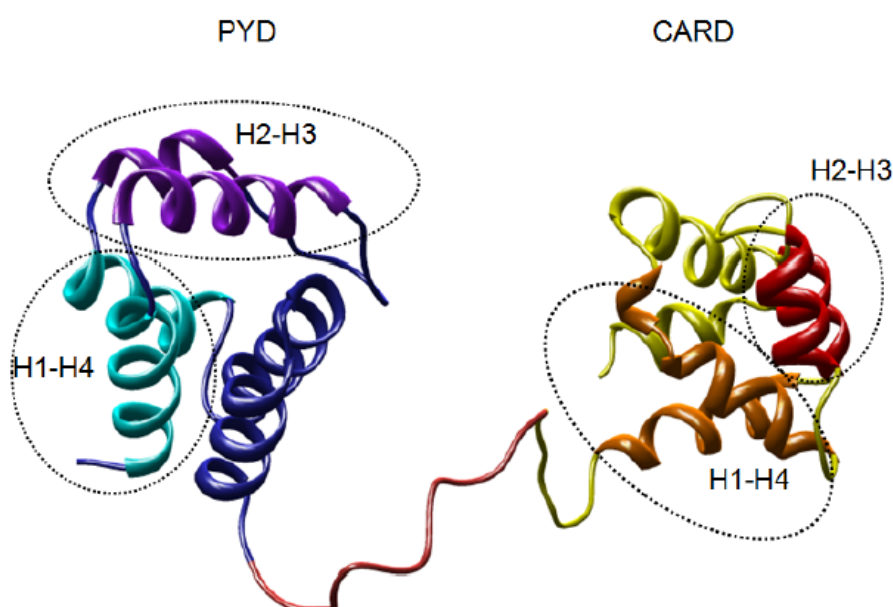
Biološka vloga POP2 ni dobro poznana. Atianand in sodelavci so pokazali, da POP2 regulira odgovore TNF $\alpha$  in IL-1 $\beta$  v človeških monocitnih celicah THP-1 [86]. POP2 se pojavlja v regulaciji obeh korakov med aktivacijo inflammasoma NLRP3. Z omejitvijo kopičenja znotrajceličnega pro-IL-1 $\beta$ , lahko POP2 učinkovito zmanjša obseg in trajanje odziva IL-1 $\beta$ . Trajanje sproščanja IL-1 $\beta$  je odvisno od razpoložljivosti pro-IL-1 $\beta$ . Funkcija POP2 je lahko bistvenega pomena pri omejevanju vnetnih posledic IL-1 $\beta$  [87]. S pomočjo delecijских mutant so pokazali, da je prva vijačnica (aminokislinski ostanki 1-19) potrebna in zadostna za inhibitorno delovanje na obe stopnji aktivacije inflammasoma, tako na prepisovalni del (NF- $\kappa$ B) kot tudi na aktivacijo inflammasoma NLRP3. Pokazali so, da so znotraj vijačnice 1 ključni kisli aminokislinski ostanki Glu6, Asp8 in Glu16, ki naj bi bili osrednjega pomena v interakcijah pirin/pirin, te pa so pomembne za inhibicijo inflammasoma, ne pa za inhibicijo prepisovalnega signala. POP2 torej deluje kot regulator vnetnih signalov in doseže svoji znani funkciji preko različnih mehanizmov [86].

Tako pirinska domena (PYD) kot tudi domena CARD spadata v družino zvitja domene smrti, za katere je značilen klobčič 6  $\alpha$ -vijačnic. NMR-študije pirinske domene (PYD) iz proteinov ASC, NLRP1 in POP1 kažejo, da so te domene zelo polarne, na njihovi površini pa se nahajajo grozdi nabitih aminokislinskih ostankov, ki posredujejo v interakcijah PYD/PYD preko elektrostatskih interakcij. Te interakcije so analogne interakcijam CARD/CARD med Apaf-1 in kaspazo 9 [88]. Ker ima ASC-PYD na dvostranski površini, ki je izpostavljena topilu, porazdelitveni naboj (negativnega na  $\alpha$ 1 in  $\alpha$ 4 in pozitivnega na  $\alpha$ 2 in  $\alpha$ 3) [89], predpostavljamo, da POP2 interagira s pozitivno stranjo EPSP na  $\alpha$ 2 in  $\alpha$ 3 ASC – PYD. Ali POP2 splošno zavira NLRP3 in druge inflammasome, ki vsebujejo pirin, je še vedno precej nejasno.

Na osnovi študije, v kateri so pokazali, da so za zaviralno delovanje POP2 ključni aminokislinski ostanki v vijačnici H1 [86], smo za nadaljnje delo izbrali peptid, ki obsega to vijačnico in ga poimenovali POP2H1 oziroma peptid P1.

#### 4.1.3 Izbor peptidov iz proteina ASC

Protein ASC deluje kot adaptor med receptorjem (npr. NLRP3) in prokaspazo 1. Sestavljen je iz dveh domen, ki sta med seboj povezani z daljšim povezovalnim zaporedjem (slika 15). S pirinsko domeno se veže na receptor, z domeno CARD pa veže prokaspazo 1 [90]. Pri pregledu modela strukture [91] smo predpostavili, da se na vsaki od domen nakazujeta predvsem dve interakcijski površini, in sicer H2-H3 ter H1-H4.



**Slika 15: Model strukture proteina ASC s potencialnimi interakcijskimi površinami [Izrisano s programom za modeliranje na osnovi kordinat ABCD iz podatkovne baze Protein Data Bank].**

Domena CARD je prisotna v velikem številu proteinov. Interakcije CARD-CARD igrajo pomembno vlogo v apoptozi in so odgovorne za z Apaf-1 posredovano aktivacijo prokaspaze 9 v apoptosomu. Proteini, ki vsebujejo CARD, posredujejo v od inflamasoma odvisni aktivaciji prokaspaze 1. V zadnjem času so poročali o novi vlogi proteinov, ki vsebujejo CARD in sicer v signalnih poteh, ki so povezane z odgovori imunskega sistema [90].

Pri izboru peptida iz domene CARD proteina ASC smo v ozir vzeli predvsem študijo Palacios-Rodriguez in sodelavcev, ki so *in vitro* ovrednotili vlogo polipeptidov, pridobljenih iz proteinov, ki vsebujejo CARD in sodelujejo v modulaciji interakcij CARD/CARD [91]. Izmed različnih proteinov s CARD so za študijo izbrali Apaf-1 in prokaspazo 9, ki imata dobro okarakterizirano signalno vlogo v mitohondrijsko posredovani poti apoptoze [92], NLRP1 in NOD-1 kot reprezentativna predstavnika družine proteinov NLR, katere predstavniki so tudi sestavni del inflammasoma [93]. Tri rekombinantne domene CARD (iz Apaf-1, prokaspaze 9, NLRP1) so zavirale od Apaf-1 odvisno aktivacijo prokaspaze 9 pri nizkih mikromolekularnih koncentracijah, a le CARD iz Apaf-1 je bil sposoben *in vitro* aktivirati prokaspazo 9 v odsotnosti proteina Apaf-1. Nasprotno pa je le CARD iz NLRP1 kazal zaviralno delovanje na aktivacijo prokaspaze 1, posredovane z inflammasomom. Ti rezultati nakazujejo, da lahko pride do zaviralnih učinkov med različnimi proteini, ki vsebujejo CARD. Sintezni peptidi iz CARD zavirajo interakcijo med prokaspazo 9 in Apaf-1. Aktivni peptidi niso pokazali inhibitornega delovanja samo v pogojih *in vitro*, ampak tudi v testu s celičnim lizatoma. Peptid iz skupine NLRP1-CARD je bil podobno aktiven v primeru zaviranja aktivnosti apoptosoma in inflammasoma. Peptidi iz NOD-1 CARD in ASC CARD so zavirali inflammasom, ne pa apoptosoma, kar je bilo še posebej zanimivo za naše študije.

Na osnovi strukture proteina ASC [91] in študije z domenskimi in peptidnimi inhibitorji interakcij CARD-CARD [88] ter potencialnih interakcijskih površin (slika 15) smo si kot potencialni peptid, ki bi lahko zaviral interakcijo med domeno CARD adaptorja ASC in domeno CARD prokaspaze 1 izbrali zaporedje, ki ustreza predelu H2-H3. Izbrali smo zaporedje iz mišjega ASC, zato smo peptid poimenovali mASCCARDH2H3 oziroma krajše peptid P2. Palacios-Rodriguez in sod. [87] so pri študiji uporabljali precej krajše peptide, vendar so npr. pokazali tudi določeno sinergistično delovanje. Zato in tudi zaradi boljše stabilnosti ter strukturiranosti smo pri študiji uporabili daljši peptid.

Medtem ko pričakujemo, da bo peptid P2 deloval na interakcijo med domeno CARD iz proteina ASC in domeno CARD prokaspaze 1, smo želeli s peptidi na osnovi proteina ASC delovati tudi na interakcijo med domeno PYD ASC in domeno PYD NLRP3. V tem delu smo vzeli v ozir predhodno opisani strukturi PYD iz NLRP3 [72], ASC [91] in študijo interakcij med različnimi domenami PYD [89]. V tej študiji so se osredotočili na

spremljanje vezave med POP1 in ASC in pokazali, da gre v tem primeru pretežno za elektrostatske interakcije, in sicer pride do vezave med pozitivno nabitim predelom POP1, ki obsega vijačnici H2 in H3, in negativno nabitim predelom PYD proteina ASC, ki obsega vijačnici H1 in H2. POP1 in PYD iz NLRP3 se razlikujeta po razporeditvi nabojev, poleg tega zamenjava nabitih ostankov na PYD ASC iz vezavnega mesta POP1 ni onemogočila vezave PYD NLRP3. Tako so sklepali, da se NLRP3 veže na predel H2-H3 proteina ASC. Ker smo želeli zmanjšati to interakcijo, smo načrtovali peptid, ki ustreza zaporedju H2-H3 iz proteina ASC (peptid P3).

## **4.2 Testiranje delovanja načrtovanih peptidov in znanih inhibitorjev inflamasma NLRP3 v celičnem modelu**

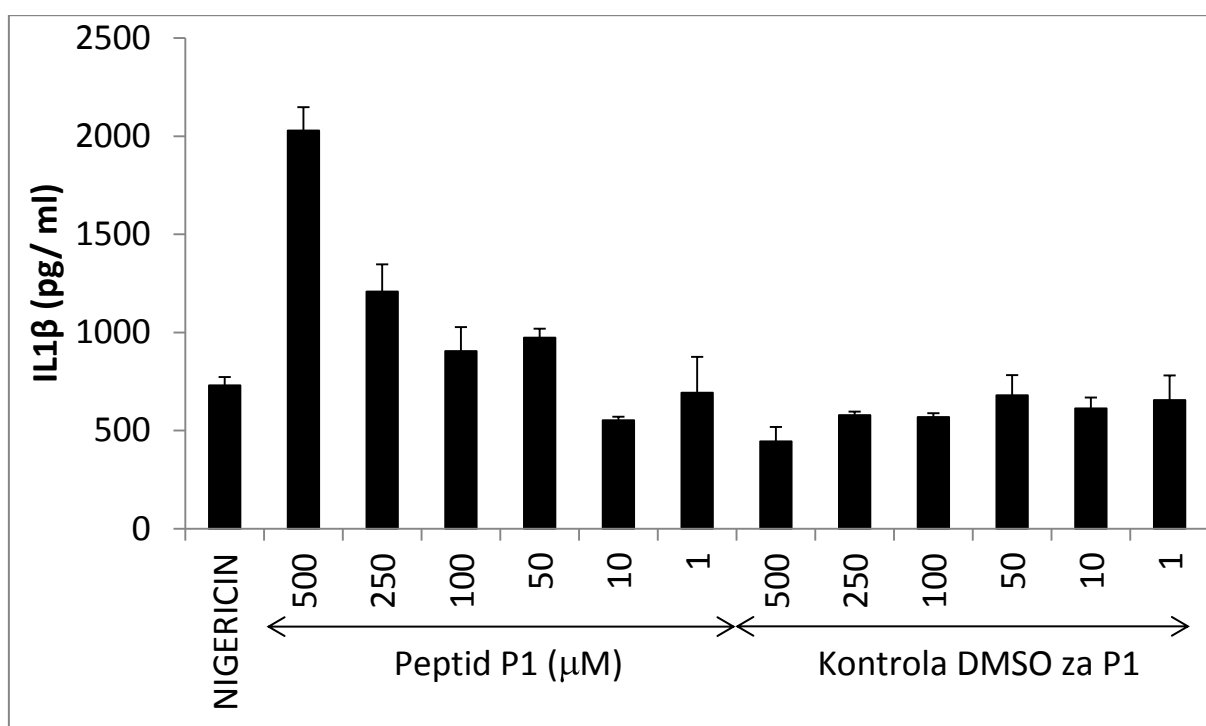
V magistrski nalogi smo delovanje peptidov preverili na celični liniji imortaliziranih mišjih makrofagov iz kostnega mozga. Prepisovalni signal smo sprožili s prekonočno inkubacijo z LPS, aktivatorjem TLR4. Gojišče z LPS smo odstranili in k celicam dodali gojišče s peptidi v ustreznih koncentracijah. Po krajši inkubaciji smo celice stimulirali z aktivatorji inflamasma NLRP3, tako topnimi npr. nigericin kot koloidnimi (alum). Po ustreznem času smo določili količino izločene zrele oblike IL-1 $\beta$ . Vsak poskus smo ponovili najmanj trikrat. Prikazujemo zgolj rezultate reprezentativnega eksperimenta. Peptidom smo na N-konec dodali miristoilno skupino, ki poveča prehod peptidov v celice [94]. Peptide smo raztopili v topilu DMSO, za katerega je znano, da v večji koncentraciji zavira tako aktivacijo NF- $\kappa$ B, kot tudi inflamasma NLRP3 [95]. Zato smo v primeru dveh peptidov vodili ustrezne negativne kontrole (z enako koncentracijo topila DMSO).

### **4.2.1 Delovanje peptida P1 na aktivacijo inflamasma NLRP3**

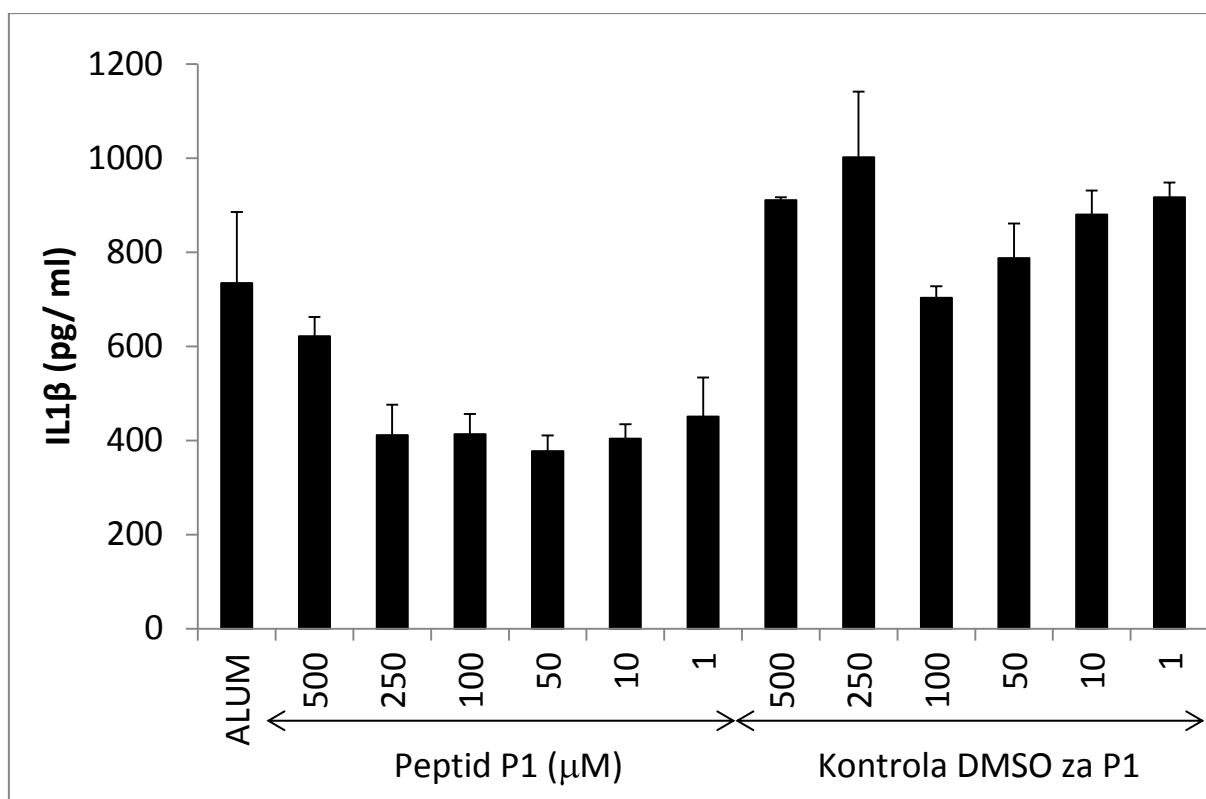
Peptid P1, ki izvira iz vijačnice H1 POP1, ni zaviral zorenja IL-1 $\beta$ , ki ga povzroča topni aktivator nigericin (slika 16). Opazimo lahko celo povečanje zorenja IL-1 $\beta$  pri višjih koncentracijah, medtem ko DMSO, ki je prisoten tudi v vzorcih P1, ni imel učinka. Kadar smo kot aktivator uporabili alum (slika 17), smo sicer zaznali znižanje koncentracije izločenega IL-1 $\beta$ , vendar slednje ni bilo koncentracijsko odvisno, tudi če smo uporabili koncentracije peptida, nižje od 1  $\mu$ M (ni prikazano).

Peptid P1 obsega zaporedje iz vijačnice H1 POP2, ki je odgovorno za inhibicijo inflammasoma [86]. V tej študiji sicer niso uporabili peptida kot takega, ampak so gen za H1 POP2 v celice HEK293 vnesli s transfekcijo. V tem primeru se inflammasom NLRP3 aktivira brez dodanih aktivatorjev, samo zaradi prekomernega izražanja komponent inflammasoma NLRP3. Mi smo uporabili mišje makrofage, ki so zagotovo bolj fiziološki sistem, vendar peptid P1 ni ustrezno deloval. Če bi šlo za človeške celice, bi peptid P1 lahko zaviral vezavo inhibitorja POP2 in na ta način pri višjih koncentracijah celo spodbujal aktivacijo inflammasoma.

Ker pa gre za mišje makrofage, peptid P1 ne more delovati z inhibicijo POP2, saj POP2 v mišjih celicah ni prisoten. Možno je tudi, da pri višjih koncentracijah peptid agregira in nato preko tega aktivira inflammasom NLRP3, neodvisno od dodanega aktivatorja (sliki 16 in 17).



Slika 16: Spremljanje zorenja IL-1 $\beta$  v prisotnosti peptida P1. Mišje makrofage smo preko noči izpostavili LPS. Gojišče smo zamenjali in dodali peptid P1 v ustrezni koncentraciji ter po 1 h inkubaciji dodali aktivator NIGERICIN. Prikazujemo reprezentativen eksperiment od 4 izvedenih. Vsako točko smo izvedli v treh paralelkah, prikazujemo standardni odklon.

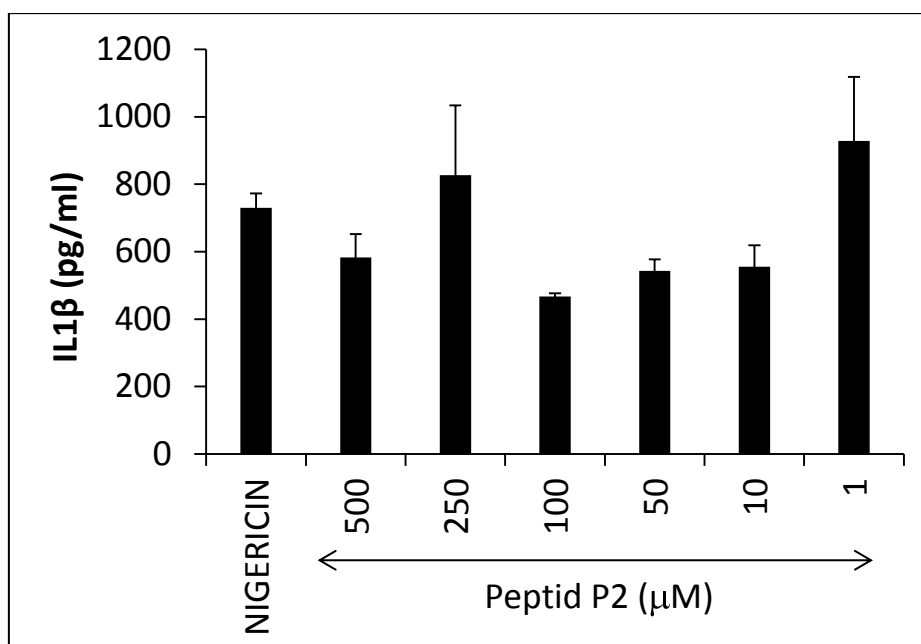


Slika 17: Spremljanje zorenja IL-1 $\beta$  v prisotnosti peptida P1. Mišje makrofage smo preko noči izpostavili LPS. Gojišče smo zamenjali in dodali peptid P1 v ustrezni koncentraciji ter po 1 h inkubaciji dodali aktivator ALUM. Prikazujemo reprezentativen eksperiment od 4 izvedenih. Vsako točko smo izvedli v treh paralelkah, prikazujemo standardni odklon.

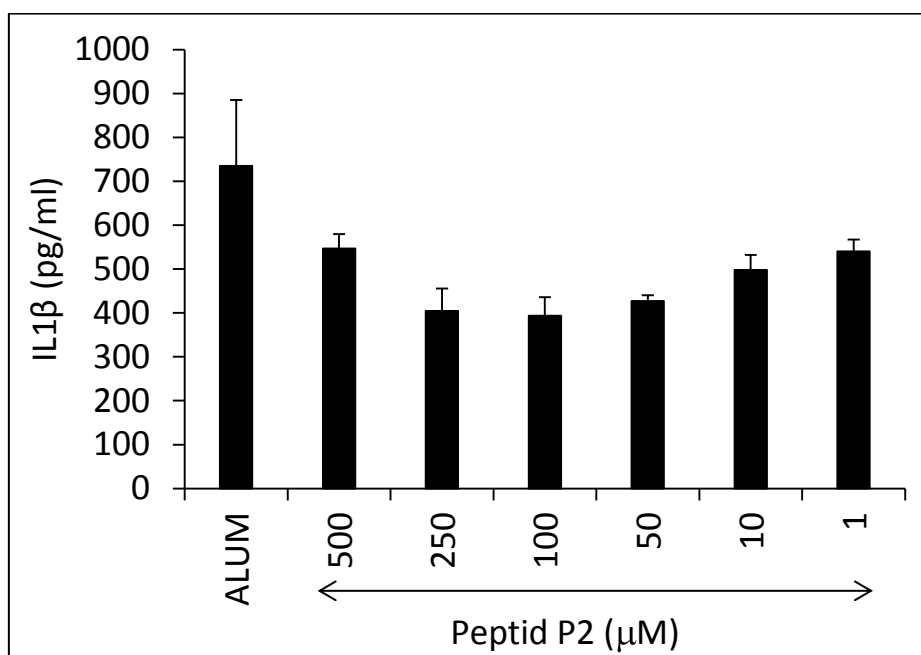
#### 4.2.2 Delovanje peptida P2 na aktivacijo inflamasma NLRP3

S peptidom P2 smo želeli zavreti interakcijo med domeno CARD ASC in domeno CARD prokaspaze 1. Peptid P2 izhaja iz področja vijačnic H2-H3 domene CARD proteina ASC, ki so ga identificirali kot potencialno interakcijsko področje med ASC in prokaspazo 1 [91]. Pri peptidu P2 opazimo manjšo zaviralno aktivnost, vendar tudi slednja nima močne koncentracijske odvisnosti. Pri nižjih koncentracijah sicer zmanjša zorenje IL-1 $\beta$  za do približno 30 %, vendar pa se ta efekt nato pri višjih koncentracijah zmanjša (sliki 18 in 19). Zanimivo je, da je krajši peptid iz tega področja (H2) inhibiral aktivacijo prokaspaze 1 v celičnih lizatih [88].





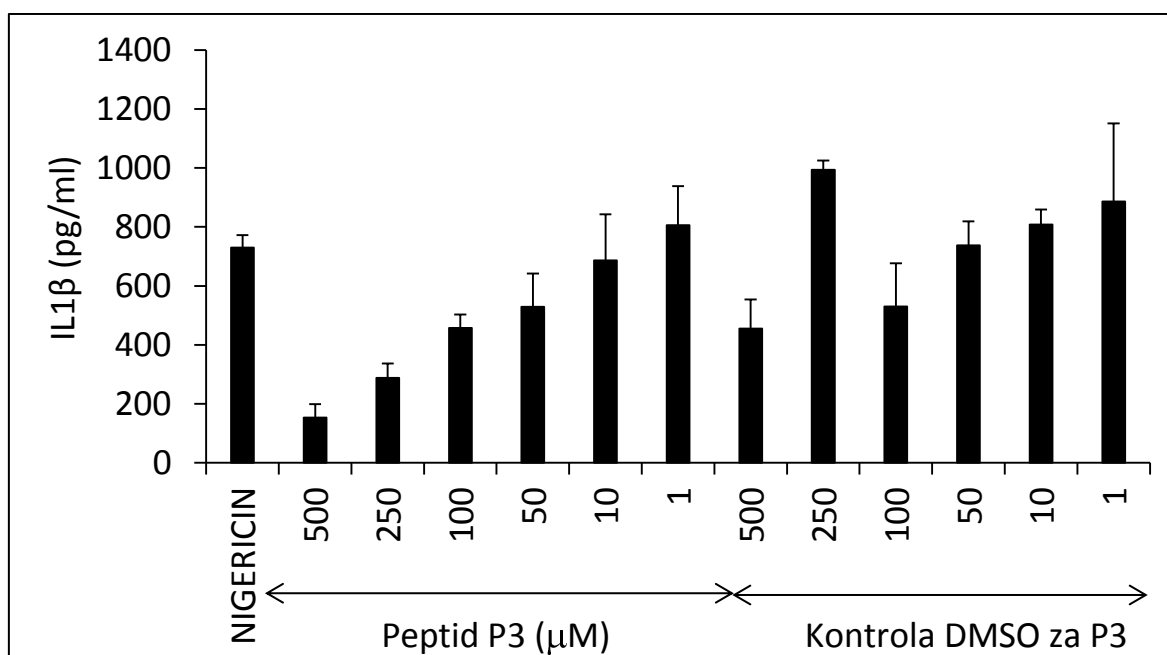
Slika 18: Spremljanje zorenja IL-1 $\beta$  v prisotnosti peptida P2. Mišje makrofage smo preko noči izpostavili LPS. Gojišče smo zamenjali in dodali peptid P2 v ustrezni koncentraciji ter po enourni nkubaciji dodali aktivator NIGERICIN. Prikazujemo reprezentativen eksperiment od 4 izvedenih. Vsako točko smo izvedli v treh paralelkah, prikazujemo standardni odklon.



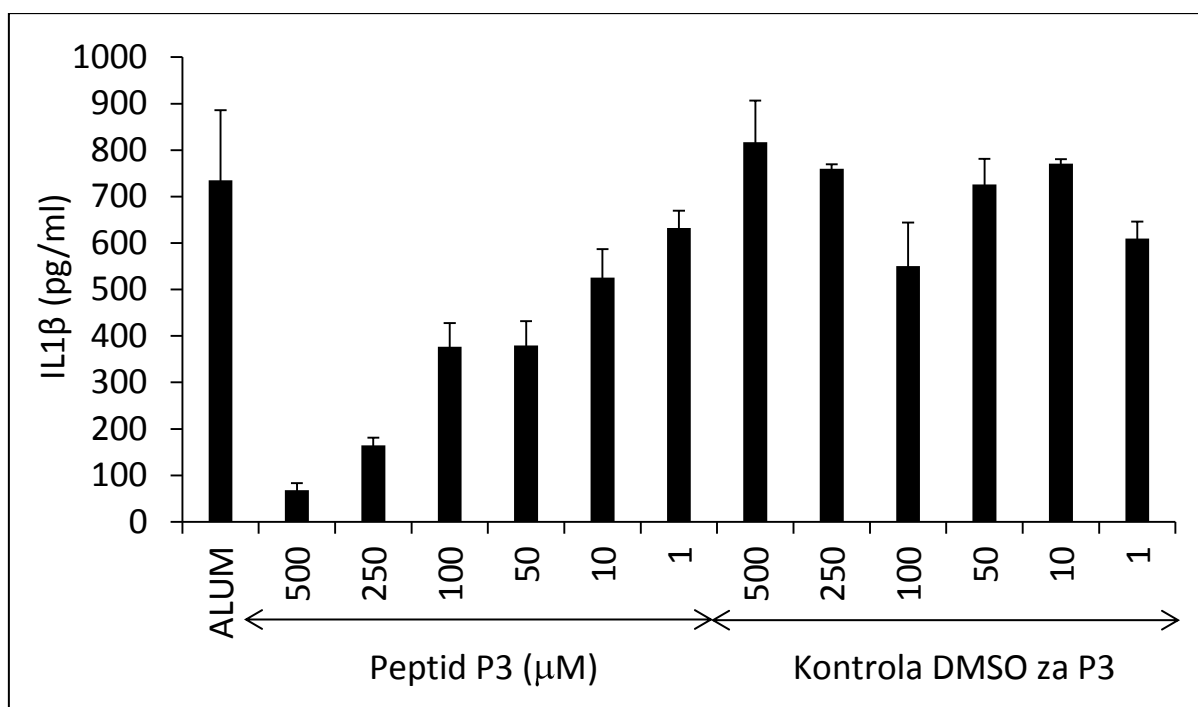
Slika 19: Spremljanje zorenja IL-1 $\beta$  v prisotnosti peptida P2. Mišje makrofage smo preko noči izpostavili LPS. Gojišče smo zamenjali in dodali peptid P2 v ustrezni koncentraciji ter po enourni inkubaciji dodali aktivator ALUM. Prikazujemo reprezentativen eksperiment od 4 izvedenih. Vsako točko smo izvedli v treh paralelkah, prikazujemo standardni odklon.

### 4.2.3 Delovanje peptida P3 na aktivacijo inflammasoma NLRP3

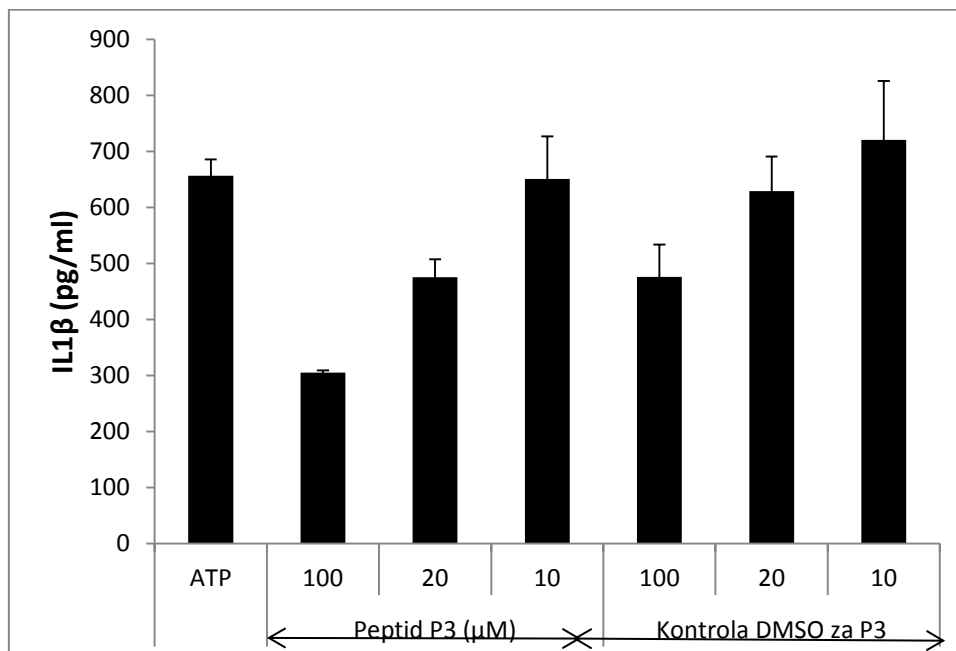
Peptid P3 izhaja iz zaporedja vijačnice H2-H3 domene PYD proteina ASC. Gre za predel, ki je pri pripadnikih poddružine PYD najbolj heterogen in naj bi določal specifičnost interakcij. Obsegal naj bi tudi vezavno mesto za PYD NLRP3 in sodeloval pri interakcijah s POP2. Peptid P3 je bil tudi izmed vseh štirih peptidov najslabše topen, zato smo vzporedno vodili kontrolo topila DMSO. Peptid P3 je koncentracijsko odvisno zaviral aktivacijo inflammasoma NLRP3, tako z nigericinom (slika 20), kot z adjuvansom alum (slika 21). Pri višjih koncentracijah smo sicer opazili zniževanje zorenja IL-1 $\beta$  tudi zaradi DMSO, vendar je bilo slednje precej manjše kot pri P3. S peptidom P3 smo izvedli tudi test inhibicije aktivatorjev ATP in imikvimoda, kjer smo prav tako opazili učinek (sliki 22 in 23).



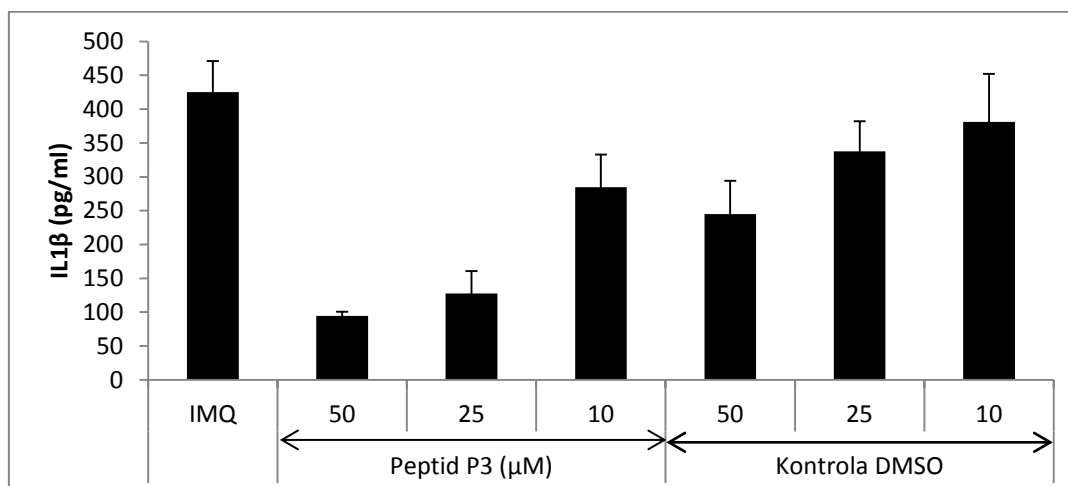
Slika 20: Spremljanje zorenja IL-1 $\beta$  v prisotnosti peptida P3. Mišje makrofage smo preko noči izpostavili LPS. Gojišče smo zamenjali in dodali peptid P3 v ustrezni koncentraciji ter po enourni inkubaciji dodali aktivator NIGERICIN. Prikazujemo reprezentativen eksperiment od 6 izvedenih. Vsako točko smo izvedli v treh paralelkah, prikazujemo standardni odklon.



Slika 21: Spremljanje zorenja IL-1 $\beta$  v prisotnosti peptida P1. Mišje makrofage smo preko noči izpostavili LPS. Gojišče smo zamenjali in dodali peptid P3 v ustrezni koncentraciji ter po enourni inkubaciji dodali aktivator ALUM. Prikazujemo reprezentativen eksperiment od 6 izvedenih. Vsako točko smo izvedli v treh paralelkah, prikazujemo standardni odklon.



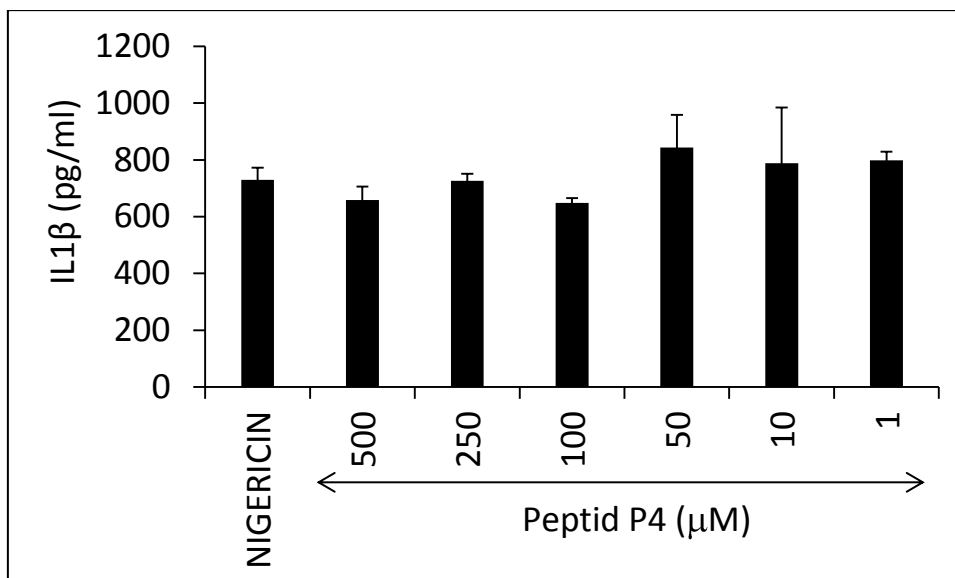
Slika 22: Spremljanje zorenja IL-1 $\beta$  v prisotnosti peptida P3. Mišje makrofage smo preko noči izpostavili LPS. Gojišče smo zamenjali in dodali peptid P3 v ustrezni koncentraciji ter po 1 enourni inkubaciji dodali aktivator ATP. Prikazujemo reprezentativen eksperiment od 6 izvedenih. Vsako točko smo izvedli v treh paralelkah, prikazujemo standardni odklon.



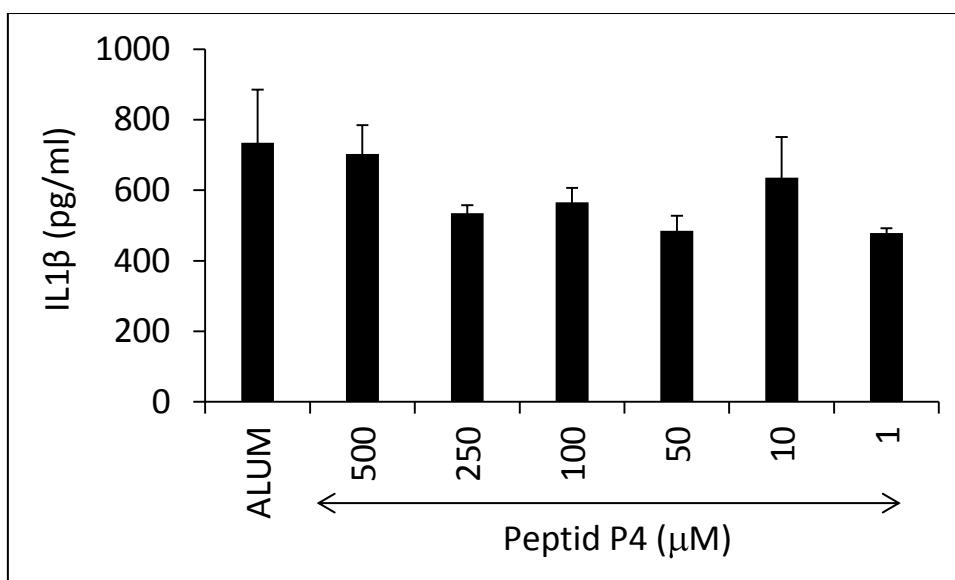
Slika 23: Spremljanje zorenja IL-1 $\beta$  v prisotnosti peptida P3. Mišje makrofage smo preko noči izpostavili LPS. Gojišče smo zamenjali in dodali peptid P3 v ustrezni koncentraciji ter po enourni inkubaciji dodali aktivator IMIKVIMOD. Prikazujemo reprezentativen eksperiment od 4 izvedenih. Vsako točko smo izvedli v treh paralelkah, prikazujemo standardni odklon.

#### 4.2.4 Delovanje peptida P4 na aktivacijo inflamasoma NLRP3

Peptid P4 izhaja iz zaporedja vijačnic H2-H3 PYD NLRP3. Slednjega smo izbrali na podlagi kristalne strukture dimera, ker gre za predel, ki je med različnimi domenami PYD najbolj variabilen in mu zato pripisujemo sodelovanje v specifičnih interakcijah. Peptid P4 ni bil aktiven, na aktivacijo inflamasoma NLRP3 ni imel vpliva (sliki 24 in 25). Morda vijačnici H2-H3 nista udeleženi v interakcije z ASC in gre v primeru dimera res za artefakt, ki nastane pri kristalizaciji. V vseh primerih neaktivnih peptidov bo potrebno preveriti, do kakšne mere peptidi vstopajo v celice. To bomo v nadaljnjem delu preverili tako, da bomo peptide na C-koncu, kjer se nahaja prost aminokislinski ostanek lizina kemijsko označili s fluorescenčnim peptidom in nato celice opazovali pod fluorescenčnim mikroskopom ter s pretočno citometrijo.



Slika 24: Spremljanje zorenja IL-1 $\beta$  v prisotnosti peptida P4. Mišje makrofage smo preko noči izpostavili LPS. Gojišče smo zamenjali in dodali peptid P4 v ustrezni koncentraciji ter po enourni inkubaciji dodali aktivator NIGERICIN. Prikazujemo reprezentativen eksperiment od 4 izvedenih. Vsako točko smo izvedli v treh paralelkah, prikazujemo standardni odklon.

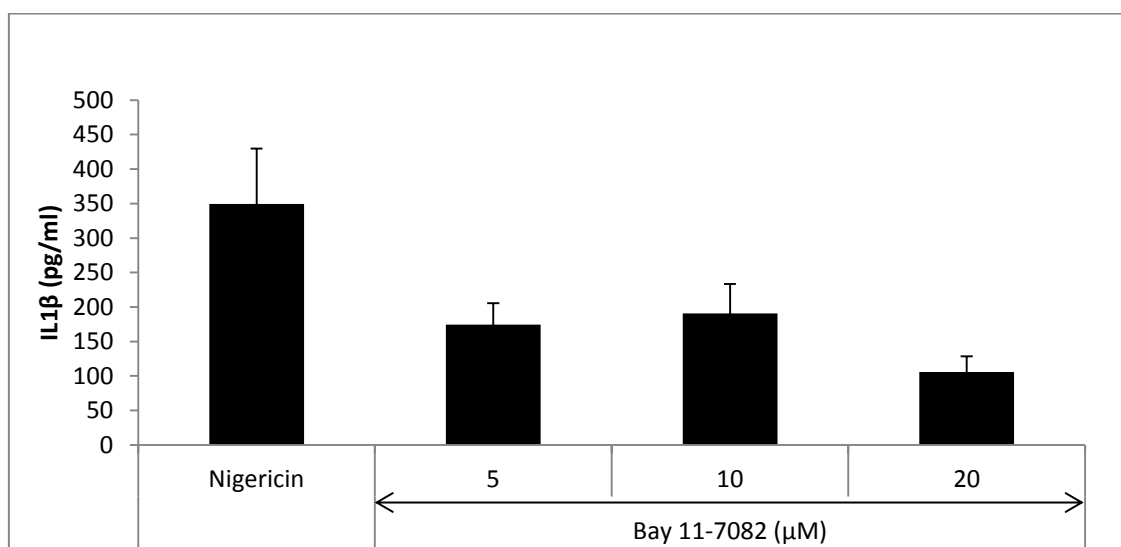


Slika 25: Spremljanje zorenja IL-1 $\beta$  v prisotnosti peptida P4. Mišje makrofage smo preko noči izpostavili LPS. Gojišče smo zamenjali in dodali peptid P4 v ustrezni koncentraciji ter po enourni inkubaciji dodali aktivator ALUM. Prikazujemo reprezentativen eksperiment od 4 izvedenih. Vsako točko smo izvedli v treh paralelkah, prikazujemo standardni odklon.

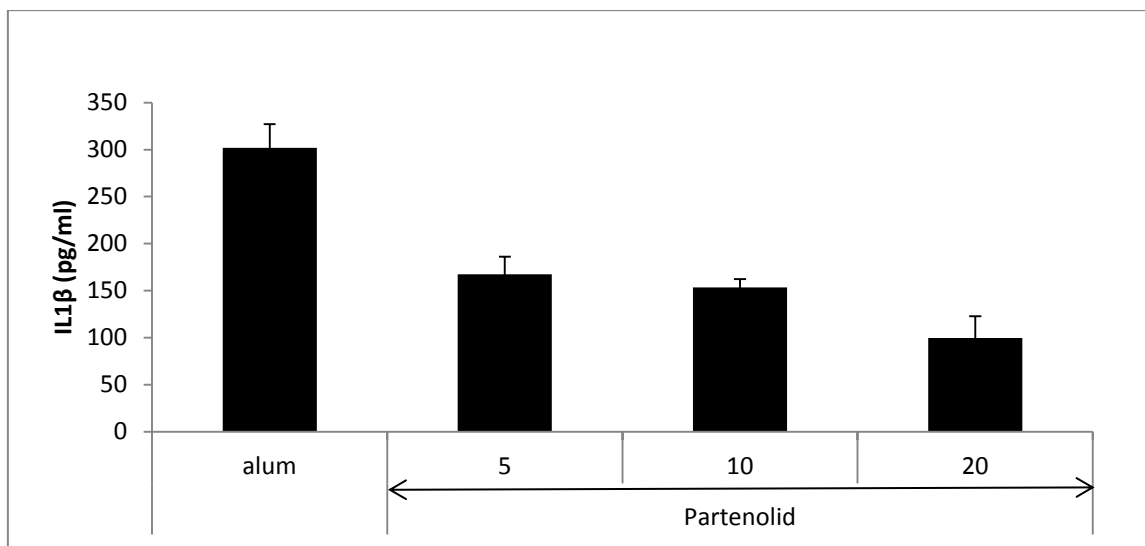
#### 4.2.5 Delovanje inhibitorjev Bay11-7082 in partenolid

Sistem, ki smo ga uporabili za preverjanje delovanja načrtovanih peptidnih zaviralcev, smo preverili tudi z znanimi zaviralci inflammasoma NLRP3. Peptidi delujejo zaviralno v območju mikromolarnih koncentracij, tako nas je zanimala tudi primerjava z znanimi inhibitorji, ki so spojine manjše molekulske mase.

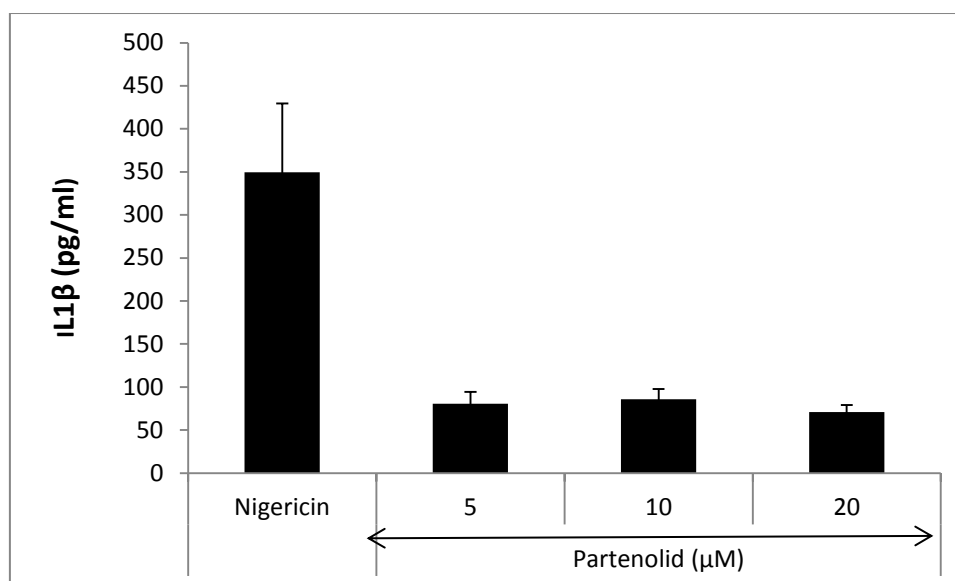
Predhodno smo celice tretirali z zaviralcema partenolidom in Bay 11 – 7082 v različnem koncentracijskem območju. Oba zaviralca sta pokazala stalen trend inhibicije, ki smo ga tako kot pri peptidnih zaviralcih opazili v mikromolarnem koncentracijskem območju.



**Slika 26: Spremljanje zorenja IL-1 $\beta$  v prisotnosti inhibitorja Bay 11-7082. Mišje makrofage smo preko noči izpostavili LPS. Gojišče smo zamenjali in dodali Bay 11-7082 v ustrezni koncentraciji ter po enourni inkubaciji dodali aktivator NIGERICIN. Prikazujemo reprezentativen eksperiment od 5 izvedenih. Vsako točko smo izvedli v treh paralelkah, prikazujemo standardni odklon.**



Slika 27: Spremljanje zorenja IL-1 $\beta$  v prisotnosti inhibitorja Partenolida. Mišje makrofage smo preko noči izpostavili LPS. Gojišče smo zamenjali in dodali Partenolid v ustrezni koncentraciji ter po enourni inkubaciji dodali aktivator ALUM. Prikazujemo reprezentativen eksperiment od 5 izvedenih. Vsako točko smo izvedli v treh paralelkah, prikazujemo standardni odklon.

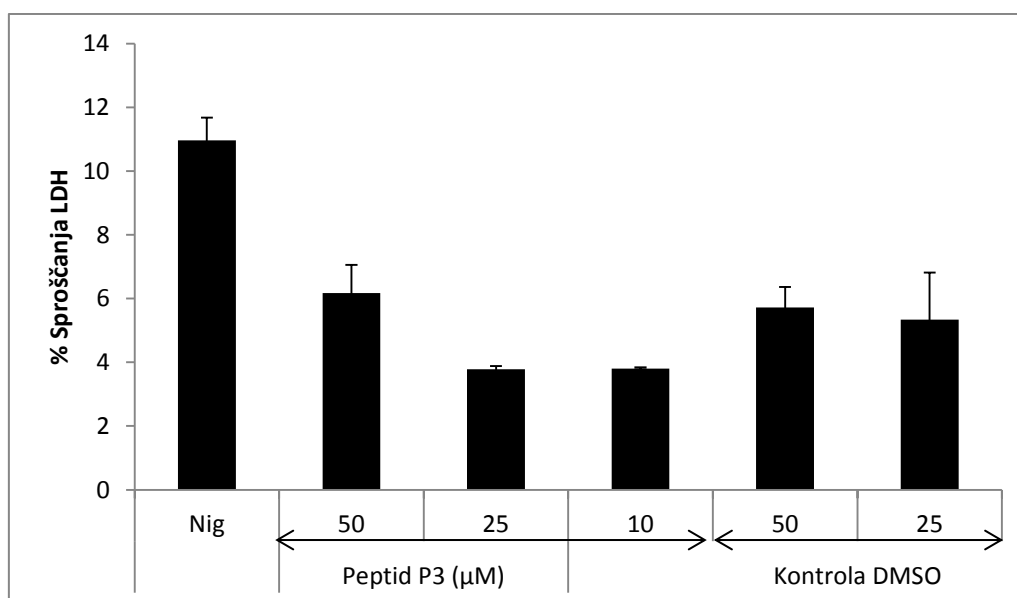


Slika 28: Spremljanje zorenja IL-1 $\beta$  v prisotnosti inhibitorja partenolida. Mišje makrofage smo preko noči izpostavili LPS. Gojišče smo zamenjali in dodali Partenolid v ustrezni koncentraciji ter po enourni inkubaciji dodali aktivator NIGERICIN. Prikazujemo reprezentativen eksperiment od 5 izvedenih. Vsako točko smo izvedli v treh paralelkah, prikazujemo standardni odklon.

### 4.3 Spremljanje živosti celic v prisotnosti aktivatorjev inflammasoma in peptidnih zaviralcev

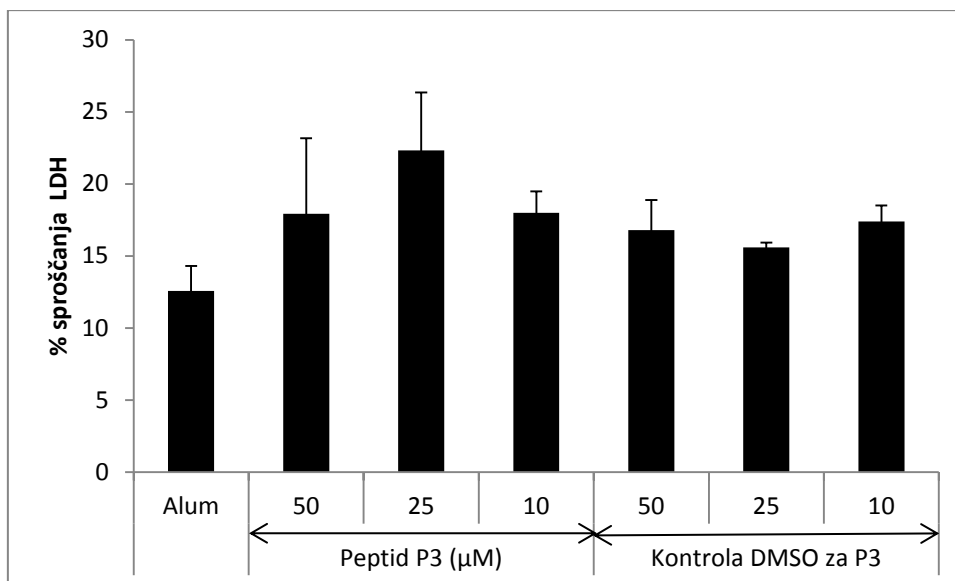
Zanimalo nas je, kako zaviralci vplivajo na preživelost celic po tretiranju z aktivatorji inflammasoma. Aktivacija inflammasoma namreč lahko vodi tudi v celično smrt, imenovano piroptoza. To je nekrotična celična smrt, zato jo lahko spremljamo z merjenjem aktivnosti izločene laktat-dehidrogenaze.

Zanimivo je, da v našem primeru nismo zaznali povečanega izločanja LDH ob dodatku aktivatorja inflammasoma, kot smo pričakovali pred izvajanjem testa (sliki 29 in 30), tako je bil tudi vpliv zaviralcev zanemarljiv, pomembno pa je, da smo pokazali, da peptidni zaviralci ne spodbujajo dodatno nekrotične celične smrti.



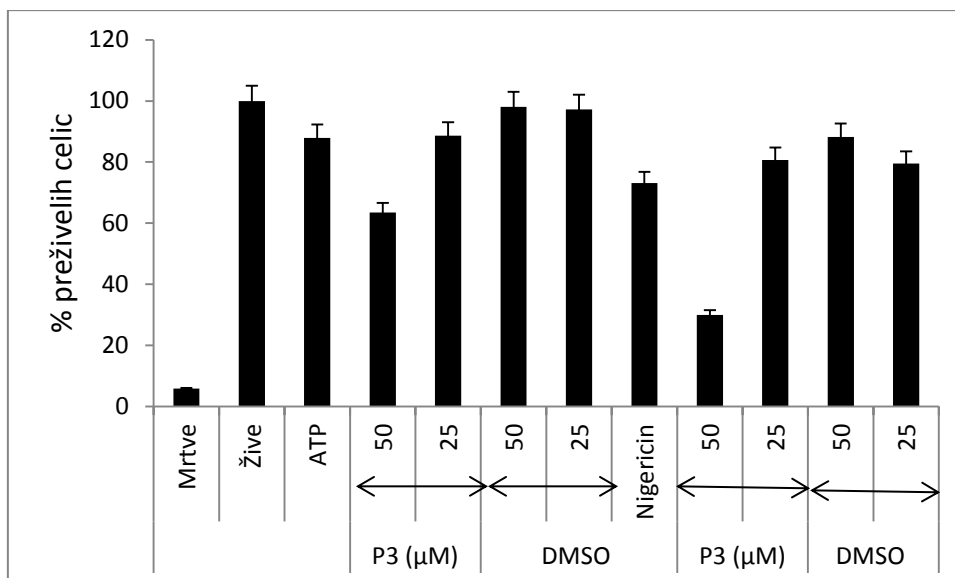
Slika 29: Spremljanje odstotka izločenega LDH (laktatdehidrogenaze). Mišje makrofage smo preko noči izpostavili LPS. Gojišče smo zamenjali in dodali peptid P3 v ustrezni koncentraciji ter po enourni inkubaciji dodali aktivator NIGERICIN. Zmešali smo 50 µL vzorca in 50 µL razopine za izvajanje LDH testa (NAD, PMD, INT) in pomerili končno točko absorbance pri 490 nm. Prikazujemo reprezentativen eksperiment od 4 izvedenih. Vsako točko smo izvedli v treh paralelkah, prikazujemo standardni odklon.



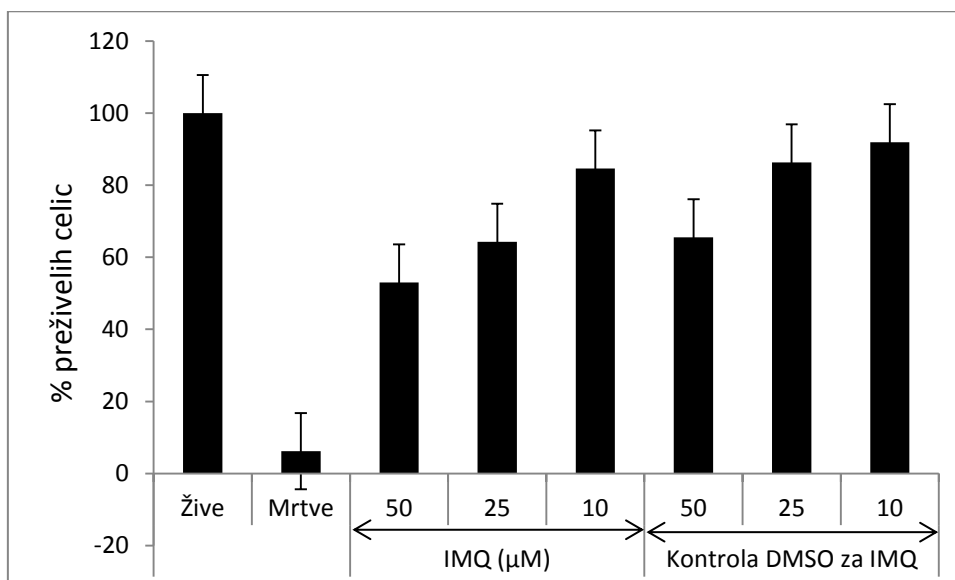


**Slika 30: Spremljanje odstotka izločenega LDH (laktatdehidrogenaze). Mišje makrofage smo preko noči izpostavili LPS. Gojišče smo zamenjali in dodali peptid P3 v ustrezni koncentraciji ter po enourni inkubaciji dodali aktivator ALUM. Zmešali smo 50  $\mu$ L vzorca in 50  $\mu$ L razopine za izvajanje LDH testa (NAD, PMD, INT) in pomerili končno točko absorbance pri 490 nm. Prikazujemo reprezentativen eksperiment od 4 izvedenih. Vsako točko smo izvedli v treh paralelkah, prikazujemo standardni odklon.**

Merili smo tudi metabolno aktivnost celic po tretiranju, iz česar smo lahko sklepali na preživelost celic. Pokazali smo zmanjšano metabolno aktivnost celic v primeru nekaterih aktivatorjev inflamasma v kombinaciji s peptidnim zaviralcem P3, vendar le pri višjih koncentracijah, medtem ko P3 zavira aktivacijo inflamasma NLRP3 že pri nižjih koncentracijah. Za spremljanje potencialne citotoksičnosti peptidnih zaviralcev pa bi bilo potrebno spremljati vpliv samih peptidnih zaviralcev na preživelost celic, kar bomo naredili v bodoče.



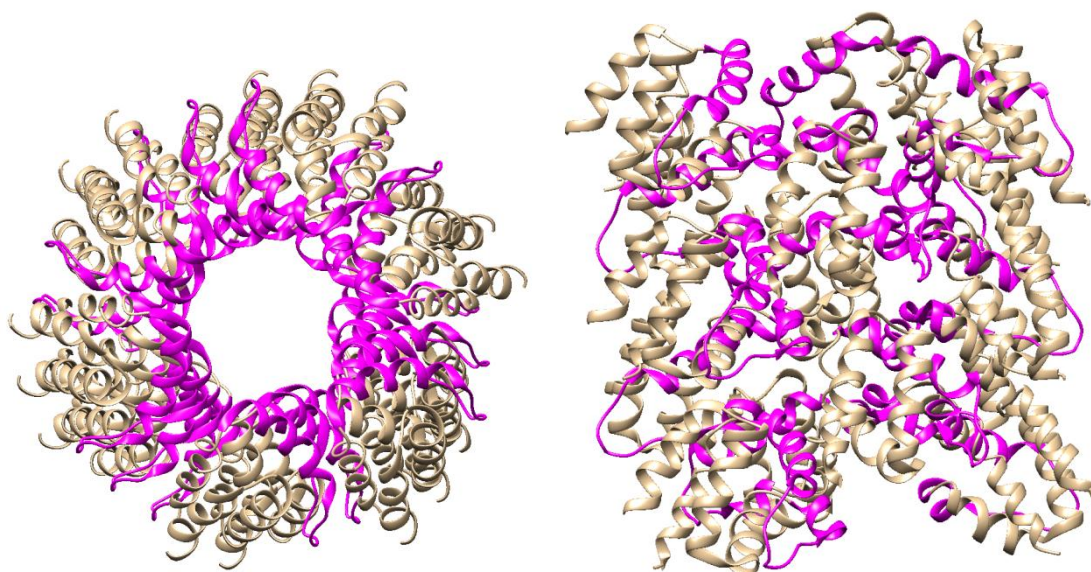
Slika 31: Spremljanje odstotka preživelih celic v XTT testu. Mišje makrofage smo preko noči izpostavili LPS. Gojišče smo zamenjali in dodali peptid P3 v ustrezni koncentraciji ter po enourni inkubaciji dodali aktivator NIGERICIN in ATP. Pred izvedbo XTT testa smo celicam zamenjali gojišče za 100 μL gojišča brez fenol rdečega in dodali 50 μL zmesi XTT in PMS. Končno točko absorbance smo pomerili pri 490 nm. Prikazujemo reprezentativen eksperiment od 4 izvedenih. Vsako točko smo izvedli v treh paralelkah, prikazujemo standardni odklon.



Slika 32: Spremljanje odstotka preživelih celic v XTT testu. Mišje makrofage smo preko noči izpostavili LPS. Gojišče smo zamenjali in dodali imikvimod v ustrezni koncentraciji ter po enourni inkubaciji dodali aktivator IMIKVIMOD (IMQ). Pred izvedbo XTT testa smo celicam zamenjali gojišče za 100 μL gojišča brez fenol rdečega in dodali 50 μL zmesi XTT in PMS. Končno točko absorbance smo pomerili pri 490 nm. Prikazujemo reprezentativen eksperiment od 4 izvedenih. Vsako točko smo izvedli v treh paralelkah, prikazujemo standardni odklon.

#### 4.4 Razprava o delovanju načrtovanega peptidnega zaviralca v luči strukture polimerov PYD ASC

Ko je bilo eksperimentalno delo za magistrsko delo že zaključeno, so Lu in sodelavci objavili študijo, v kateri so pokazali, da lahko protein ASC oligomerizira preko domen PYD (slika 33) [95]. Ugotovili so, da pri tej polimerizaciji sodelujejo trije tipi interakcij, pri čemer sodeluje segment H2-H3 v vseh treh tipih interakcij. Na sliki 33 je ta segment, iz katerega izhaja tudi peptid P3, v modelu strukture oligomera PYD domen iz proteina ASC, obarvan vijolično.



Slika 33: Strukturni model oligomera domen PYD iz ASC (PBD: 3J63). Segment H2-H3 (vijolično) je močno udeležen v tej oligomerizaciji. Levo je prikaza pogled od zgoraj, desno s strani.

Peptid P3 tako morda ne deluje samo na interakcijo med domenama PYD proteinov NLRP3 in ASC, ampak onemogoča oligomerizacijo domen PYD proteina ASC. V isti študiji so pokazali, da oligomer NLRP3 služi kot jedro za tvorbo polimera PYD iz ASC, pri čemer je za interakcijo med NLRP3 in ASC predel H2-H3 ključen. Peptid P3 verjetno torej deluje tako na stopnji preprečevanja interakcije med NLRP3 in ASC, kot tudi kasnejše oligomerizacije proteina ASC.

## 5 SKLEP

V magistrski nalogi smo želeli načrtovati nove peptidne zaviralce za zaviranje inflamasma NLRP3. V ta namen smo načrtovali peptide, ki bi utegnili delovati na interakcije med proteini v inflamasmu NLRP3. V postopku načrtovanja zaviralcev inflamasma NLRP3 peptidnega izvora, smo se opirali na že znane strukture proteinov, ki sodelujejo bodisi pri tvorbi inflamasma ali pa jo zavirajo. Glede na to, da smo v času načrtovanja peptidov poznali le strukture manjših proteinov oziroma posameznih domen, smo lahko le predpostavili, da bodo načrtovani peptidi delovali zaviralno na aktivacijo inflamasma NLRP3.

Odziv inflamasma NLRP3 lahko sprožijo različni aktivatorji. Nas je zanimalo, kako učinkujejo peptidi pri odzivu na različne aktivatorje, kar pa smo spremljali na celični liniji mišjih makrofagov. Zorenje vnetnega citokina IL-1 $\beta$  smo spremljali z encimsko imunskim testom, s tem pa preverili tudi delovanje uporabljenih aktivatorjev (ATP, nigericin, alum, imikvimod). Ker gre verjetno v primeru vseh aktivatorjev za enako sestavljanje inflamasma NLRP3, smo predvidevali, da bodo vsi načrtovani peptidi ne glede na uporabljen aktivator delovali enako učinkovito. Iz pridobljenih rezultatov smo ugotovili, da najbolje deluje peptid P3. Omenjeni peptid, ki izvira iz pirinske domene ASC in vpliva na interakcije med NLRP3 in ASC (in verjetno tudi med domenami PYD proteina ASC [95]), zavira zorenje IL-1 $\beta$  v odvisnosti od koncentracije pri različnih sprožilcih inflamasma NLRP3. Delovanje inflamasma NLRP3 zavira že pri nižjih koncentracijah, pri tem pa ne poveča citotoksičnosti dodanih aktivatorjev. V manjši meri deluje tudi peptid P2, ki sicer nima močne koncentracijske odvisnosti, medtem ko peptida P1 in P4 ne delujeta. V vseh primerih neaktivnih peptidov bo potrebno preveriti, do kakšne mere peptidi vstopajo v celice. Že znana zaviralca partenolid in Bay 11-7082 sta pokazala stalen trend zaviranja v mikromolarnem koncentracijskem območju, kar nam omogoča primerjavo z našimi peptidi, ki prav tako delujejo v podobnem koncentracijskem območju.

Spremljali smo preživelost celic v prisotnosti aktivatorjev inflamasma in peptida P3 in pokazali, da v nižjih koncentracijah, pri katerih že zavira aktivacijo inflamasma, ne deluje citotoksično. Citotoksičnost peptida zaznamo šele pri višjih koncentracijah.

Prav tako nas je zanimalo, kako zaviralci vplivajo na preživelost celic po tretiranju z aktivatorji inflammasoma, saj vemo, da lahko aktivacija inflammasoma vodi tudi v celično smrt. V našem primeru nismo zaznali piroptoze ob dodatku aktivatorja inflammasoma, prav tako je bil tudi vpliv zaviralcev zanemarljiv.

## 6 LITERATURA

1. Takeuchi, O., and Akira, S.: Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* (2010); 140: 805–820.
2. Schroder, K., and Tschopp, J.: The inflammasomes. *Cell* (2010); 140: 821–832.
3. Martinon, F., Mayor, A., and Tschopp, J.: The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* (2009); 27: 229–265.
4. Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J.: The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proILbeta. *Mol Cell* (2002); 10: 417–426
5. De Nardo, D., and Latz, E.: NLRP3 inflammasomes link inflammation and metabolic disease. *Trends Immunol* (2011); 32: 373–379
6. Gross, O., Thomas, C.J., Guarda, G., and Tschopp, J.: The inflammasome: an integrated view. *Immunol Rev* (2011); 243: 136–151.
7. Lamkanfi, M., and Dixit, V.M.: Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. *Immunol Rev* (2009); 227: 95–105
8. Burckstummer, T., Baumann, C., Bluml, S., Dixit, E., Durnberger, G., Jahn, H., Planyavsky, M., Bilban, M., Colinge, J., Bennett, K.L., et al.: An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol* (2009); 10: 266–272.
9. Zhao, Y., Yang, J., Shi, J., Gong, Y.N., Lu, Q., Xu, H., Liu, L., and Shao, F.: The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature* (2011); 477: 596–600
10. Gong, Y.N., and Shao, F.: Sensing bacterial infections by NAIP receptors in NLRC4 inflammasome activation. *Protein Cell* (2012); 3: 98–105
11. Georgy, I. V., Marty-Roix, R., Ghosh, S., Weng, D., Lien, E.: Inflammasomes and host defenses against bacterial infections. *Current Opinion in Microbiology* (2012); 16: 1-9.
12. Schroder, K., Zhou, R., Tschopp, J.: The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science*. (2010); 327(5963): 296-300
13. Sims, E. J.: IL1 and IL18 receptors, and their extended family. *Current Opinion in Immunology* (2002); 14(1): 117-122.
14. Gram, A.M., Frenkel, J., and Rensing, M.E.: Inflammasomes and viruses: cellular defence versus viral offence. *J Gen Virol* (2012); 93: 2063–2075.

15. Gross, O., Poeck, H., Bscheider, M., Dostert, C., Hanneschlager, N., Endres, S., Hartmann, G., Tardivel, A., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., et al: Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* (2009); 459: 433–436.
16. Mariathasan, S., Weiss, D.S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W.P., Weinrauch, Y., Monack, D.M., and Dixit, V.M.: Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* (2006); 440: 228–232.
17. Duewell, P., Kono, H., Rayner, K.J., Sirois, C.M., Vladimer, G., Bauernfeind, F.G., Abela, G.S., Franchi, L., Nunez, G., Schnurr, M., et al.: NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* (2010); 464: 1357–1361.
18. Wen, H., Gris, D., Lei, Y., Jha, S., Zhang, L., Huang, M.T., Brickey, W.J., and Ting, J.P.: Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol* (2011); 12: 408–415.
19. Martinon, F., and Tschopp, J.: Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* (2004); 117: 561–574.
20. Hoffman, H.M., Rosengren, S., Boyle, D.L., Cho, J.Y., Nayar, J., Mueller, J.L., Anderson, J.P., Wanderer, A.A., and Firestein, G.S.: Prevention of cold-associated acute inflammation in familial cold autoinfl ammatory syndrome by interleukin-1 receptor antagonist. *Lancet* (2004); 364: 1779–1785.
21. Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E., and Flavell, R.: Inflammasomes in health and disease. *Nature* (2012); 481: 278–286.
22. Zhou, R., Tardivel, A., Thorens, B., Choi, I., and Tschopp, J.: Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* (2010); 11: 136–140.
23. Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., and Tschopp, J.: Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* (2006); 440: 237–241.
24. Allen, I.C., Scull, M.A., Moore, C.B., Holl, E.K., McElvania-TeKippe, E., Taxman, D.J., Guthrie, E.H., Pickles, R.J., and Ting, J.P.: The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity* (2009); 30: 556–565.

25. Kruth, H.S., Skarlatos, S.I., Lilly, K., Chang, J., Ifrim, I.: Sequestration of acetylated LDL and cholesterol crystals by human monocyte-derived macrophages. *J Cell Biol.* (1995); 129(1): 133–145.
26. Boraschi, D., Villa, L., Volpini, G., Bossu, P., Censini, S., et al.: Differential activity of interleukin 1 alpha and interleukin 1 beta in the stimulation of the immune response in vivo. *Eur J Immunol.* (1990); 20(2): 317–321
27. Montaser M., Lalmanach, G., Mach, L.: CA-074, but not its methyl ester CA-074Me, is a selective inhibitor of cathepsin B within living cells. *Biol Chem* (2002); 383(7–8): 1305–1308.
28. Schoneveld, A.H., Hofer, I., Sluijter, J.P., Laman, J.D., de Kleijn, D.P., et al.: Atherosclerotic lesion development and toll like receptor 2 and 4 responsiveness Atherosclerosis. (2008); 197(1): 95–104.
29. Geng, Y.J., Libby, P.: Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme. *Am J Pathol.* (1995); 147(2): 251–266.
30. Rajamäki K., Lappalainen J., Öörni K., Välimäki E., Matikainen S., Kovanen P. T., Eklund K.K.: Cholesterol Crystals Activate the NLRP3 Inflammasome in Human Macrophages: A Novel Link between Cholesterol Metabolism and Inflammation. *PLoS One.* (2010); 5(7): e11765.
31. Donath, M.Y., Shoelson, S.E.: Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* (2011); 11: 98–107
32. Vandanmagsar, B., Youm, Y.H., Ravussin, A., et al.: The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med* (2011); 17: 179–188
33. Wen, H., Gris, D., Lei, Y., et al.: Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol* (2011); 12: 408–415
34. Dasu, M.R., Devaraj, S., Park, S., Jialal, I.: Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* (2010); 33: 861–868
35. Li, Z. et al.: *Hepatology* (2008); 47: 1495–1503.
36. Nakahira, K., Haspel, J.A., Rathinam, V.A., Lee, S.J., Dolinay, T., Lam, H.C., Englert, J.A., Rabinovitch, M., Cernadas, M., Kim, H.P., et al.: Autophagy proteins regulate



- innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol* (2011); 12: 222–230.
37. Dosert, C., Petrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B. T., Tschopp, J.: Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* (2008); 320: 674-677.
  38. Bauernfeind, F., Bartok, E., Rieger, A., Franchi, L., Nunez, G., and Hornung, V.: Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. *J Immunol* (2011); 187: 613–617.
  39. Zhong, Z., Zhai, Y., Liang, S., Mori, Y., Han, R., Sutterwala, F. S., Qiao, L.: TRPM2 links oxidative stress to NLRP3 inflammasome activation. *Nature communications* (2013); 4: 1611.
  40. Murakami, T.: Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (2012); 109: 11282-11287.
  41. Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E.O., Kono, H., Rock, K.L., Fitzgerald, K.A. and Latz, E.: Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* (2008); 9: 847-856.
  42. Freeman, D., Cedillos, R., Choyke, S., Lukic, Z., McGuire, K., Marvin, S., Burrage, A. M., Sudholt, S., Rana, A., O'Connor, C., Wiethoff, C. M., Campbell, E. M.: Alpha-synuclein induces lysosomal rupture and cathepsin dependent reactive oxygen species following endocytosis. *Plos one* (2013); 8(4):e62143. doi: 10.1371
  43. Hafner-Bratkovič, I., Benčina, M., Fitzgerald, K. A., Golenbock, D., Jerala, R.: NLRP3 inflammasome activation in macrophage cell lines by prion protein fibrils as the source of IL1 $\beta$  and neuronal toxicity. *Cellular and Molecular Life Sciences* (2012); 69 (24): 4215-28.
  44. Levine, B., Mizushima, N., Virgin, H.W.: Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* (2011); 469: pp. 323-335
  45. Zhou, R., Yazdi, A.S., Menu, P., Tschopp, J.: A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* (2011); 469: pp. 221-225
  46. Guarda, G., Braun, M., Staehli, F., Tardivel, A., Mattmann, C., Forster, I., Farlik, M., Decker, T., Pasquier, R.A., Romero, P.: Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity* (2011); 34: pp. 213-223
  47. Rathinam, V. A. K., Vanaja, S. K., Fitzgerald, K. A.: Regulation of inflammasome signaling. *Nature Immunology* (2012); 13: 333–342

48. Mayer-Barber, K.D., Andrade, B.B., Barber, D.L., Hieny, S., Feng, C.G., Caspar, P., Oland, S., Gordon, S., Sher, A.: Innate and adaptive interferons suppress IL1alpha and IL1beta production by distinct pulmonary myeloid subsets during Mycobacterium tuberculosis infection. *Immunity* (2011); 35: pp. 1023-1034
49. Guarda, G., Dostert, C., Staehli, F., Cabalzar, K., Castillo, R., Tardivel, A., Schneider, P., Tschopp, J.: T cells dampen innate immune responses through inhibition of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes. *Nature* (2009); 460: pp. 269-273
50. Bogdan, C., Rollinghoff, M., Diefenbach, A.: The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev* (2000); 173: pp. 17-26
51. Bogdan, C.: Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol* (2001); 2: 907-916
52. Niedbala, W., Alves-Filho, J.C., Fukada, S.Y., Vieira, S.M., Mitani, A., Sonogo, F., Mirchandani, A., Nascimento, D.C., Cunha, F.Q., Liew, F.Y.: Regulation of type 17 helper T-cell function by nitric oxide during inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011); 108: pp. 9220-9225
53. Mao, K., Chen, S., Chen, M., Ma, Y., Wang, Y., Huang, B., He, Z., Zeng, Y., Hu, Y., Sun, S.: Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock. *Cell Research* (2013); 23: pp. 201-212
54. Gregory, S.M., Davis, B.K., West, J.A., Taxman, D.J., Matsuzawa, S., Reed, J.C., Ting, J.P., Damania, B.: Discovery of a viral NLR homolog that inhibits the inflammasome. *Science*. (2011); 331(6015): 330-4
55. Komune, N., Ichinohe, T., Ito, M., Yanagi, Y.: Measles virus V protein inhibits NLRP3 inflammasome-mediated interleukin-1beta secretion. *J Virol.* (2011); 85(24): 13019-26
56. Juliana, C., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Datta, P., Solorzano, L., Yu, J.W., Meng, R., Quong, A.A., Latz, E., Scott, C.P., Alnemri, E.S.: Anti-inflammatory compounds parthenolide and Bay 11-7082 are direct inhibitors of the inflammasome. *J Biol Chem.* (2010); 285(13): 9792-802
57. Martinon, F., Mayor, A., and Tschopp, J.: The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* (2009); 27: 229-265
58. Heinrich, M., Robles, M., West, J. E., Ortiz de Montellano, B. R., Rodriguez, E.: Ethnopharmacology of Mexican asteraceae (Compositae). *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (1998); 38: 539-565

59. Hall, I. H., Starnes, C. O., Jr., Lee, K. H., Waddell, T. G.: Mode of action of sesquiterpene lactones as anti-inflammatory agents. *J Pharm Sci* (1980); 69: 537-543
60. <https://en.wikipedia.org/wiki/Parthenolide> (zadnje dostopanje: 31.8.2015)
61. Faustin, B., Lartigue, L., Bruey, J. M., Luciano, F., Sergienko, E., Bailly-Maitre, B., Volkmann, N., Hanein, D., Rouiller, I., Reed, J. C.: Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol Cell*. (2007); 25(5): 713-24
62. [https://www.reagentsdirect.com/media/catalog/product/cache/1/image/9df78eab33525d08d6e5fb8d27136e95/b/a/bay\\_11-7082.png](https://www.reagentsdirect.com/media/catalog/product/cache/1/image/9df78eab33525d08d6e5fb8d27136e95/b/a/bay_11-7082.png) (zadnje dostopanje: 31.8.2015)
63. Lamkanfi, M., Mueller, J. L., Vitari, A. C., Misaghi, S., Fedorova, A., Deshayes, K., Lee W. P., Hoffman, H. M., and Dixit, V. M.: Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *J Cell Biol*. (2009); 187(1): 61-70
64. <http://www.dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/archives/image.cfm?archiveid=17220&type=img&name=chem-structure1.jpg> (zadnje dostopanje: 31.8.2015)
65. Duncan, J. A., Bergstralh, D. T., Wang, Y., Willingham, S. B., Ye, Z., Zimmermann, A., and Ting, J. P.: Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2007); 104: 8041-8046.
66. Liu, S., Zhou, B., Yang, H., He, Y., Jiang, Z. X., Kumar, S., Wu, L., and Zhang, Z. Y.: Aryl vinyl sulfonates and sulfones as active site-directed and mechanism-based probes for protein tyrosine phosphatases. *J Am Chem Soc*. (2008); 130(26): 8251-60
67. Duncan, J. A., Gao, X., Huang, M. T., O'Connor, B. P., Thomas, C. E., Willingham, S. B., Bergstralh, D. T., Jarvis, G. A., Sparling, P. F., and Ting, J. P.: *Neisseria gonorrhoeae* activates the proteinase cathepsin B to mediate the signaling activities of the NLRP3 and ASC-containing inflammasome. *J Immunol* (2009); 182: 6460-6469
68. Joly, S., Ma, N., Sadler, J. J., Soll, D. R., Cassel, S. L., and Sutterwala, F. S.: Cutting edge: *Candida albicans* hyphae formation triggers activation of the Nlrp3 inflammasome. *Immunol* (2009); 183: 3578-3581
69. Chu, J., Thomas, L. M., Watkins, S. C., Franchi, L., Nunez, G., and Salter, R. D.: Cholesterol-dependent cytolysins induce rapid release of mature IL1beta from murine macrophages in a NLRP3 inflammasome and cathepsin B-dependent manner. *J Leukoc Biol*. (2009); 86(5): 1227-38.

70. Kerr, I. D., Lee, J. H., Farady, C. J., Marion, R., Rickert, M., Sajid, M., Pandey, K. C., Caffrey, C. R., Legac, J., Hansell, E., McKerrow, J. H., Craik, C. S., Rosenthal, P. J., and Brinen, L. S.: Vinyl sulfones as antiparasitic agents and a structural basis for drug design. *J Biol Chem.* (2009); 284(38): 25697-703
71. Kalliolias, G.D., Liossis, S.N.: The future of the IL1 receptor antagonist anakinra: from rheumatoid arthritis to adult-onset Still's disease and systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Expert Opin Investig Drugs* (2008); 17 (3): 349–59.
72. <http://en.wikipedia.org/wiki/Anakinra> (zadnje dostopanje: 31.8.2015)
73. Stahl, N., Radin, A., Mellis, S.. Riloncept – CAPS and beyond. *Ann N Y Acad Sci* (2009); 1182: 124–34
74. Geyer, M., Müller-Ladner, U.: Actual status of anti-interleukin-1 therapies in rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol* (2010); 22: 246–51
75. Dubois E. A., Rissmann R., Cohen A. F.: Riloncept and canakinumab. *British Journal of Clinical Pharmacology* (Impact Factor: 3.69). (2011); 71(5):639-41.
76. [http://en.wikipedia.org/wiki/3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine#/media/File:3,3%27,5,5%27-tetramethyl--1,1%27-biphenyl--4,4%27-diamine\\_oxidation.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine#/media/File:3,3%27,5,5%27-tetramethyl--1,1%27-biphenyl--4,4%27-diamine_oxidation.svg) (zadnje dostopanje: 31.8.2015)
77. <http://zdravlje.eu/2001/12/29/imunoenzimski-test-elisa> (zadnje dostopanje: 31.8.2015)
78. <http://www.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/cell-viability> (zadnje dostopanje: 31.8.2015)
79. Pečar Fonovič, U. et al., 2. izd. Vaje iz farmacevtske biokemije. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko biologijo, 2011
80. <http://www.dojindo.com/store/p/834-LDH-Assay-Kit-WST-non-homogeneous-assay.html> (zadnje dostopanje: 31.8.2015)
81. <http://media.cellsignal.com/pdf/9095.pdf> (zadnje dostopanje: 31.8.2015)
82. <http://www.applichem.com/en/literature/applications/no-12-cell-proliferation-assay-xtt/> (zadnje dostopanje: 31.8.2015)
83. Farazi, T. A.: "The Biology and Enzymology of Protein N-Myristoylation". *Journal of Biological Chemistry* (2001); 276 (43): 39501–39504
84. Bae, J. Y., Park, H. H.: Crystal structure of NALP3 protein pyrin domain (PYD) and its implications in inflammasome assembly. *J. Biol. Chem.* (2011); 286: 39528–39536

85. Atianand, M.K., Fuchs, T., Harton, J.A.: Recent evolution of the NF- $\kappa$ B and inflammasome regulating protein POP2 in primates. *BMC Evol Biol.* (2011); 11:56. doi: 10.1186/1471-2148-11-56.
86. de Alba E.: Structure and interdomain dynamics of apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC). *J Biol Chem.* (2009); 284(47): 32932-41
87. Johnston, J. B., Barrett J. W., Nazarian S. H., Goodwin M., Ricciuto D., Wang G., McFadden G.: A poxvirus-encoded pyrin domain protein interacts with ASC-1 to inhibit host inflammatory and apoptotic responses to infection. *Immunity* (2005); 23: 587-598.
88. Palacios-Rodríguez, Y., García-Laínez, G., Sancho, M., Gortat, A., Orzáez, M., Pérez-Payá, E.: Polypeptide modulators of caspase recruitment domain (CARD)-CARD-mediated protein-protein interactions. *J Biol Chem.* (2011); 286(52): 44457-66
89. Srimathi, T., Robbins, S. L., Dubas, R. L., Chang, H., Cheng, H., Roder, H., and Park, Y. C.: Mapping of POP1-binding site on pyrin domain of ASC. *J. Biol. Chem* (2008); 283: 15390–15398
90. Ippagunta, S. K., Malireddi, R. K., Shaw, P. J., Neale, G. A., Walle, L. V., Green, D. R., Fukui, Y., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T. D.: The inflammasome adaptor ASC regulates the function of adaptive immune cells by controlling Dock2-mediated Rac activation and actin polymerization. *Nat. Immunol.* (2011); 12: 1010–1016
91. Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X., and Akey, C. W.: Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol. Cel* (2002); 19: 423–432
92. Ting, J. P., Willingham, S. B., and Bergstralh, D. T.: NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* (2008); 8: 372–379
93. Ahn H, Kim J., Jeung E.B., Lee, G.S.: Dimethyl sulfoxide inhibits NLRP3 inflammasome activation. *Immunobiology.* (2014) ;(4): 315-22.
94. Fekonja, O., Avbelj, M., Jerala, R.: Suppression of TLR signaling by targeting TIR domain-containing proteins. *Curr Protein Pept Sci.* (2012); (8): 776-88
95. Lu, A., Magupalli, V.G., Ruan, J., Yin, Q., Atianand, M.K., Vos, M.R., Schröder, G.F., Fitzgerald, K.A., Wu, H., Egelman, E.H.: Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. *Cell.* (2014); 156(6): 1193-206