

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EVA KOREN

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EVA KOREN

**BIOKEMIJSKO VREDNOTENJE NOVIH ANTAGONISTOV
RECEPTORJA TLR4**

BIOCHEMICAL EVALUATION OF NOVEL TLR4 ANTAGONISTS

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Urbana Švajgerja, mag. farm. in somentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm. HTS interne banke spojin so predhodno pripravili na Katedri za Farmaceutsko kemijo Fakultete za farmacijo.

Mentorju doc. dr. Urbanu Švajgerju, mag. farm. se iskreno zahvaljujem za strokovno pomoč in usmerjanje pri nastajanju magistrske naloge. Za pomoč pri nastajanju naloge se zahvaljujem tudi somentorju prof. dr. Stanislavu Gobcu, mag. farm. in doc. dr. Mateju Sovi, mag. farm.

Petri Kojc se zahvaljujem za pomoč pri lektoriranju.

Ostalim bližnjim se zahvaljujem za podporo skozi vsa leta šolanja.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Urbana Švajgerja, mag. farm. in somentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm.

Eva Koren

Ljubljana, 2015

KAZALO VSEBINE

SEZNAM OKRAJŠAV	IV
POVZETEK	VII
ABSTRACT	VIII
1. UVOD	1
1.1. IMUNSKI SISTEM	1
1.1.1 Prirojeni imunski odziv	1
1.1.2 Pridobljeni imunski odziv.....	2
1.2 TOLL-U PODOBNI RECEPTORJI.....	4
1.2.1 Struktura molekul TLR.....	5
1.2.2 Splošna signalizacijska pot TLR	5
1.3 TOLL-U PODOBNI RECEPTOR 4 (TLR4).....	6
1.3.1 Aktivacija TLR4.....	7
1.3.2 Signalizacija TLR4	8
1.4 UPORABA AGONISTOV IN ANTAGONISTOV TLR V TERAPIJI BOLEZNI9	
2. NAČRT DELA.....	12
3. MATERIALI.....	13
3.1 BIOLOŠKI MATERIAL	13
3.2 SPOJINE ZA TESTIRANJE	13
3.3 REAGENTI IN TOPILA	13
3.4 PRIBOR.....	13
3.5 NAPRAVE.....	14
4. METODE	15
4.1 TOPNOST SPOJIN	15
4.2 DELO S CELIČNO LINIJO HEK293 HEK-Blue™ hTLR4.....	17
4.2.1 Priprava medija za gojenje celic.....	18
4.2.2 Odmrzovanje celic	18
4.2.3 Vzdrževanje celične kulture	19
4.2.4 Štetje celic.....	20
4.3 TEST CITOTOKSIČNOSTI	22
4.4 TEST AGONISTIČNE AKTIVNOSTI SPOJIN NA TLR4	24

4.5	TEST ANTAGONISTIČNE AKTIVNOSTI SPOJIN NA TLR4	26
5.	REZULTATI IN RAZPRAVA	27
5.1	TOPNOST TESTIRANIH SPOJIN	33
5.2	CITOTOKSIČNOST TESTIRANIH SPOJIN.....	36
5.3	TEST ANTAGONISTIČNE IN AGONISTIČNE AKTIVNOSTI SPOJIN	39
5.3.1	Test antagonistične aktivnosti spojin.....	41
5.3.2	Test agonistične aktivnosti spojin	44
6.	SKLEP.....	50
7.	LITERATURA.....	52

KAZALO SLIK

Slika 1:	Shematski prikaz signalizacijskih poti TLR.....	6
Slika 2:	Dimerizirani kompleks LPS-MD-2-TLR4.	7
Slika 3:	Lipid A (levo) in eritoran (desno).	11
Slika 4:	Mreža, odtisnjena na Bürker-Türkovo komoro.	21
Slika 5:	Redukcija reagenta MTS do vodotopnega formazana.....	23
Slika 6:	Grafični prikaz izmerjenih absorbanc v testu citotoksičnosti za 1. set spojin.....	36
Slika 7:	Grafični prikaz izmerjenih absorbanc v testu citotoksičnosti za 2. set spojin.....	37
Slika 8:	Lipid A (levo) in lipid IVa (desno).....	40
Slika 9:	Grafični prikaz izmerjenih absorbanc v testu antagonizma za 1. set spojin.....	41
Slika 10:	Grafični prikaz izmerjenih absorbanc v testu antagonizma pri koncentracijah C _{max} , C _{max} /2 in C _{max} /5, za 1. set spojin.	42
Slika 11:	Grafični prikaz izmerjenih absorbanc v testu antagonizma za 2. set spojin.....	44
Slika 12:	Grafični prikaz izmerjenih absorbanc v testu agonizma za 1. set spojin.....	45
Slika 13:	Grafični prikaz izmerjenih absorbanc v testu agonizma za 2. set spojin.....	46
Slika 14:	Grafični prikaz izmerjenih absorbanc v testu agonizma z dodatkom LPS, pri koncentracijah C _{max} in C _{max} /5, za 2. set spojin.....	47
Slika 15:	Strukturi spojin SAM-3 (34) - levo in SAM-4 (35) - desno.....	48
Slika 16:	Struktura spojine 3 [23].	48
Slika 17:	Strukture spojin: z leve proti desni - 7C2 (12), 7G1 (16), 7E4 (11), 7H1 (33)...	49

KAZALO ENAČB

Enačba 1: Enačba za izračun volumna DMSO, ki ga moramo dodati spojini v trdnem stanju, da dobimo njeno raztopino s koncentracijo 10 mmol/l.....	15
Enačba 2: Enačba za izračun števila celic, ki smo jih prešteli v Bürker – Türkovi števni komori v določenem volumnu celične suspenzije.....	22
Enačba 3: Enačba za izračun volumna celične suspenzije, ki ga moramo dodati v vsako vdolbinico mikrotitrne plošče, da v njih dobimo želeno število celic.	24
Enačbi 4 in 5: Enačbi vezave liganda na receptor. <i>R = receptor; L = ligand; RL = kompleks receptor-ligand; K_d = ravnotežnostna konstanta oziroma konstanta disociacije</i>	39

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Prikaz molskih mas, natehtanih mas in izračunanih volumnov DMSO, ki smo jih morali dodati, da smo dobili raztopine spojin s koncentracijo 10 mmol/l.	16
Preglednica II: Prikaz kemijskih struktur testiranih spojin, njihovih molekularnih mas in konstant disociacij.	27
Preglednica III: Rezultati ugotavljanja topnosti spojin.	33
Preglednica IV: Prikaz deležev preživelih celic, inkubiranih v mediju s testiranimi spojinami, glede na netretirane celice.....	37

SEZNAM OKRAJŠAV

AP-1	Aktivatorski protein 1, transkripcijski dejavnik (<i>angl.</i> Activator Protein 1)
APCs	Antigene predstavitvene celice (<i>angl.</i> Antigen-Presenting Cells)
CD	Označevalec celične pripadnosti (<i>angl.</i> Cluster of Differentiation)
DAMP	Z nevarnostjo povezan molekularski vzorec (<i>angl.</i> Danger Associated Molecular Pattern)
DMEM	Medij za gojenje celičnih kultur (<i>angl.</i> Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMSO	Dimetilsulfoksid, brezbarvno polarno topilo
DPBS	Pufirski sistem v fiziološkem pH območju (<i>angl.</i> Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)
ER	Endoplazemski retikulum
FBS	Serum govejih zarodkov (<i>angl.</i> Fetal Bovine Serum)
HEK293	Ledvične celice človeškega zarodka (<i>angl.</i> Human Embryonic Kidney cells)
IC50	Polovična maksimalna inhibitorna koncentracija (<i>angl.</i> Half maximal Inhibitory Concentration)
IKK	Kinaza I κ B
IFN	Interferon
IL	Interlevkin
IRAK	Kinaza, ki je del signalne poti receptorja TLR4 (<i>angl.</i> IL-1 Receptor-Associated Kinase)
IRF	Protein, ki uravnava transkripcijo interferonov (<i>angl.</i> Interferon Regulatory Factor)
Kd	Konstanta disociacije

Kinaza MAP	Kinaza, ki je del signalne poti receptorja TLR4 (<i>angl.</i> Mitogen-Activated Protein Kinase)
LBP	LPS-vezavni protein (<i>angl.</i> LPS-Binding Protein)
LPS	Lipopolisaharid
LRR	Proteinski strukturni vzorec, ki v svojem ponavljajočem zaporedju aminokislin vsebuje veliko levcinskih ostankov (<i>angl.</i> Leucine Rich Repeat)
MAL	Adaptorski protein (<i>angl.</i> MyD88-Adaptor-Like)
MD-2	Koreceptorski protein, ki sodeluje pri aktivaciji receptorja TLR4 (<i>angl.</i> Myeloid Differentiation protein 2)
MHC	Poglavitni kompleks tkivne skladnosti (<i>angl.</i> Major Histocompatibility Complex)
MyD88	Adaptorski protein v signalni kaskadi receptorjev TLR (<i>angl.</i> Myeloid Differentiating primary response gene 88)
NF-κB	Transkripcijski ali jedrni dejavnik κ B (<i>angl.</i> Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
PAMP	Za patogene značilni molekularski vzorci (<i>angl.</i> Pathogen Associated Molecular Patterns)
PBMC	Mononuklearne celice iz periferne krvi (<i>angl.</i> Peripheral Blood Mononuclear Cells)
PRR	Receptorji za prepoznavo vzorcev (<i>angl.</i> Pattern Recognition Receptors)
RCF	Relativna centrifugalna sila (<i>angl.</i> Relative Centrifugal Force)
SEAP	Izločena placentarna alkalna fosfataza (<i>angl.</i> Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase)
SMILES	Vrsta zapisa molekulske 2D strukture v poenostavljeno linearno vrstico (<i>angl.</i> Simplified Molecular Input Line Entry System)

SPR	Površinska plazmonska resonanca (<i>angl.</i> Surface Plasmon Resonance)
STAT	Družina transkripcijskih dejavnikov za interferone, ki so del signalne poti receptorja TLR4 (<i>angl.</i> Signal Transducer and Activator of Transcription)
TAB	Protein, ki je del signalne poti receptorja TLR4 (<i>angl.</i> TAK1 Binding protein)
TAK	Kinaza, ki je del signalne poti receptorja TLR4 (<i>angl.</i> TGF- β (Tumor Growth Factor β) Activated Kinase)
Tc	Citotoksični limfocit T ali celica T ubijalka (<i>angl.</i> Cytotoxic T Cell)
TCR	T-celični receptor (<i>angl.</i> T-Cell Receptor)
TDS	Specifikacijska ali podatkovna listina (<i>angl.</i> Technical Data Sheet)
Th	Celica T pomagalka (<i>angl.</i> T Helper Cell)
TIR	Domena TLR, ki ima enako homologijo kot domene receptorjev iz družine IL-1R (<i>angl.</i> Toll/Interleukin-1 Receptor)
TIRAP	Adaptorski protein (<i>angl.</i> TIR-Associated Protein)
TLR	Toll-u podobni receptor (<i>angl.</i> Toll-Like Receptor)
TNF	Tumorje nekrotizirajoči dejavnik (<i>angl.</i> Tumor Necrosis Factor)
TRAF	Protein, ki sodeluje v signalni poti receptorja TLR4 (<i>angl.</i> TNF Receptor-Associated Factor 6)
TRIF	Adaptorski protein v signalni kaskadi receptorjev TLR (<i>angl.</i> TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN- β)
TRAM	Adaptorski protein v signalni kaskadi receptorjev TLR4 (<i>angl.</i> TRIF-related Adaptor Molecule)

POVZETEK

Toll-u podobni receptorji 4 (TLR4) vplivajo na aktivacijo prirojenega imunskega odziva v človeškem telesu. Želeli smo odkriti nove učinkovine, ki bi na ta receptor delovale antagonistično in tako zmanjšale prekomerni odziv imunskega sistema. Z njimi bi lahko zdravili bolezni, za katere še ne poznamo zdravil, kot sta na primer nevropatska bolečina in sepsa.

Na Katedri za Farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo smo v sodelovanju s Kemijskim inštitutom izvedli reševanje interne banke spojin z metodo površinske plazmonske resonance (SPR). Pri tem smo našli spojine, ki izkazujejo afiniteto do TLR4. Za testiranje učinkovanja na receptor smo izbrali 35 najbolj obetavnih in med temi 18 uspešno določili vrednosti konstante disociacije (K_d).

Najprej smo ugotovili topnost spojin. Ugotoviti smo morali maksimalno koncentracijo, pri kateri je posamezna spojina topna v dimetilsulfoksidu (DMSO) in celičnem mediju. Štiri netopne spojine smo izločili iz nadaljnjega testiranja. V naslednjem koraku smo na celicah celične linije HEK-Blue™ hTLR4 preverjali njihovo delovanje. Pri ugotavljanju citotoksičnosti, kjer smo ugotavljali občutljivost celic celične linije HEK293 za naše spojine, smo celice 24 ur inkubirali s spojinami z maksimalno koncentracijo. Nato smo z mikroskopom opazovali njihovo morfologijo in s testom MTS ocenili živost. Izkazalo se je, da je le nekaj spojin značilno toksičnih.

S pomočjo poročevalskega testa smo testirali agonistično in antagonistično delovanje ligandov. Pri tem smo uporabili celično linijo HEK293, transificirano z genom za TLR4, ki je dodatno povezan s poročevalskim genom za alkalno fosfatazo (Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase - SEAP), pri čemer je signalizacija TLR4 inducirala prepis SEAP. Količino alkalne fosfataze SEAP smo ugotovili s kolorimetrično metodo s čitalcem za plošče ELISA, pri valovni dolžini 620 nm. Ugotovili smo, da večina spojin deluje šibko agonistično ali šibko antagonistično. Trem spojinam, ki so delovale najbolj antagonistično, smo skušali izmeriti tudi IC_{50} , vendar se je izkazalo, da vse nekoliko zavirajo rast celične linije HEK 293 in zato niso primerne za nadaljnje raziskave v tem modelu.

Ključne besede: receptor TLR4, celična linija HEK293, poročevalski test, agonizem/antagonizem, kolorimetrična metoda

ABSTRACT

Toll-like receptors 4 (TLR4) play a key role in the activation of the innate immune system in the body. The discovery of new compounds which would act antagonistically to the receptor and could control the excessive reaction of the immune system was the goal of the tests. This way, diseases, for which there are still no cure, such as neuropathic pain and sepsis, could be treated in future.

The Department of Pharmaceutical Chemistry in collaboration with the Institute of Chemistry, performed a screening of the in-house library of compounds, with the SPR method approach. New compounds, which exhibit affinity for the Toll-like receptor 4, were discovered. 35 of the most promising were selected and their effects tested on the receptor. Kd (dissociation constant) was determined for 18 of them.

In the master's thesis, we first analyzed the solubility of the compounds. It was necessary to determine the maximum concentration at which the compound is soluble in DMSO solvent and the cell medium. Four insoluble compounds were excluded from further testing. The next step was to check the function of the compounds on cell line HEK-Blue™ hTLR4, produced by InvivoGen company. To determine cytotoxicity, cells were incubated for 24 hours with the maximum concentration of the compounds. Then the cells morphology was observed under a microscope and their vitality was assessed with MTS assay. High toxicity was noticed only in few compounds.

Ligands were tested for their agonism/antagonism on TLR4 by using 'reporter assay' test. HEK293 cell line is transfected with gene for TLR4. TLR4 is further connected to a reporter gene SEAP (Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase). This way, any potential TLR4 signaling results in transcription of SEAP. SEAP was determined by a colorimetric method, with ELISA plates reader at 620 nm wavelength. We discovered, that most of the compounds have a weak agonistic or antagonistic effect. Measuring the IC₅₀ values of three compounds which showed the highest antagonist activity was also attempted. However, it turned out that these compounds inhibit the growth of HEK293 cell line and therefore do not represent a suitable starting point for further studies in this experimental model.

Keywords: TLR4 receptor, HEK293 cell line, reporter assay, agonism/antagonism, colorimetric method

1. UVOD

1.1. IMUNSKI SISTEM

Organizmi so skozi evolucijo razvili imunski sistem. Njegova naloga je prepoznati vse, kar je telesu tujega oziroma kar predstavlja nevarnost in nas pred tem braniti. To vključuje tako patogene bakterije, glive in viruse kot transplantirana tkiva in organe. Včasih pa imunski sistem napade tudi lastna tkiva, ki jih zmotno prepozna kot tuja. Imunski odziv delimo na prirojeni in pridobljeni. Prvi je sicer zelo hiter, a nespecifičen, zato vedno ne zadostuje za uničenje vsiljivcev. Njegova pomembna naloga je zbiranje informacij o patogenih, da jih lahko nato uniči kasnejši, vendar antigensko specifičen in intenziven pridobljeni imunski odziv.

Celice imunskega sistema izvirajo iz pluripotentne matične celice, hemocitoblasta, iz katere v kostnem mozgu nastanejo multipotentne matične celice dveh tipov, mieloidne in limfoidne vrste. Iz matičnih celic mieloidne vrste nastanejo vse krvne celice razen limfocitov. To so eritrociti, trombociti in levkociti (nevtrofilci, bazofilci, eozinofilci in monociti), ki večinoma sodelujejo v prirojenem imunskem odzivu. Iz matičnih celic limfoidne vrste nastanejo naravne celice ubijalke, ki sicer igrajo pomembno vlogo v nespecifičnem imunskem odzivu, ter limfociti B in T, ki so glavni vršilci pridobljenega imunskega odziva [1].

1.1.1 Prirojeni imunski odziv

Prirojeni imunski odziv se navadno sproži s prihodom kratkoživih nevtrofilcev na mesto, kjer so se pojavili patogeni. Za njimi tja prispejo monociti in makrofagi (aktivirani monociti), ki tako kot nevtrofilci uničujejo bakterije s fagocitozo. Fagocitne celice sproščajo tudi vnetne mediatorje, imenovane citokini (na primer TNF- α , IL-1), ki še dodatno vzpodbujajo vnetne procese. Tumorske celice in celice, okužene z virusi, uničujejo zlasti naravne celice ubijalke, ki v njih inducirajo apoptozo, programirano celično smrt. Eozinofilci igrajo pomembno vlogo pri alergijah in uničevanju parazitov, bazofilci in mastociti pa sproščajo vnetni mediator histamin. Še ne dozorele dendritične

celice v tkivih vzorčijo antigene, ki jih po aktivaciji prenesejo v limfatična tkiva, kjer dokončno dozori in jih predstavijo celicam T. Za prirojeni imunski odziv je pomemben tudi sistem komplementa. Sestavljajo ga beljakovine krvne plazme, ki se aktivirajo z vezavo ene od teh na kompleks antigen-protitelo po klasični poti aktivacije. Omenjena beljakovina se tako aktivira in spremeni v proteazo, ki cepi naslednjo beljakovino, jo aktivira in tako nadaljuje kaskadno reakcijo, vse dokler se verižno ne aktivirajo vse komponente. Komplement lahko aktivirata tudi vezava ene od beljakovin na površino mikrobnega antigena, kar imenujemo alternativna pot aktivacije, ali pa vezava manozo vezočega lektina – lektinska pot aktivacije. Aktivirane beljakovine komplementa okrepijo vnetje, kemotakso in sprožijo lizo bakterij. Aktivacijo prirojenega imunskega sistema stimulirajo tudi značilne molekule, prisotne v patogenih. Vzorec tovrstnih molekul ni značilen le za posamezni patogen, ampak za celo vrsto. Tak vzorec imenujemo PAMP (za patogene značilni molekulski vzorec; Pathogen Associated Molecular Pattern – PAMP). Primer PAMP je na primer molekula lipopolisaharida (LPS), sestavina zunanje celične stene po Gramu negativnih bakterij. Celice imunskega sistema uporabljajo receptorje PRR (Pattern Recognition Receptors) za prepoznavo PAMP. Pomembni med njimi so predvsem Toll-u podobni receptorji (TLR) [1, 2].

1.1.2 Pridobljeni imunski odziv

Pridobljeni imunski odziv se sproži po približno 96 urah in je antigensko specifičen. Fagocitoza razkroji bakterije na fragmente (antigene). Antigene predstavljajoče celice (APC), h katerim spadajo makrofagi in dendritične celice, posredujejo informacijo o antigenih celicam pridobljenega imunskega odziva, ki jih aktivirajo tako, da se borijo proti specifičnemu patogenu [1, 2]. V procesu nastane tudi spominski imunski odziv. Spominski limfociti ostanejo v telesu še več let po preboleli okužbi. Aktivirajo se ob ponovnem stiku z istimi antigeni in hitro ter učinkovito odstranijo tujek [3]. Pridobljeno imunost delimo na humoralno in celično.

Humoralna imunost vključuje tvorbo protiteles, ki jih izločajo plazmatke (aktivirani limfociti B). Plazmatke tvorijo protitelesa, ki imajo enako vezavno mesto za antigen kot antigeni receptorji na limfocitih B, iz katerih so nastale. Specifična protitelesa se vežejo na tridimenzionalno konformacijo antigena, ki ga imenujemo epitop. Posamezni antigen

ima lahko več različnih epitopov, vsako protitelo pa je specifično le za en epitop. Protitelo antigen po vezavi nanj onesposobi, ga označi za fagocitozo ali aktivira komplement [3].

Celična imunost vključuje aktivacijo in diferenciacijo limfocitov T. Najučinkoviteje deluje proti znotrajceličnim patogenom, kot so virusi. Limfocite T delimo na CD8 limfocite Tc (citotoksične limfocite T, celice T ubijalke) in CD4 celice T pomagalke (Th - T helper cells) [1, 2].

Celice Th vzpodbujajo in usmerjajo pridobljeno imunost. Izražajo celični receptor T (TCR) in koreceptor CD4 (Cluster of Differentiation 4). Antigene predstavljajoče celice (makrofagi, dendritične celice in celice B) so edine, ki izražajo molekule poglavitnega kompleksa tkivne skladnosti razreda II (MHC II; Major Histocompatibility Complex II). Molekule MHC so transmembranski proteini, na katere se vežejo antigeni v obliki peptidov in se v kompleksu z njimi pozneje predstavijo limfocitom T na celični površini APC. Obstajata dva razreda molekul MHC, in sicer I in II. Molekule MHC razreda II najpogosteje vežejo peptidne antigene iz zunajceličnega prostora (bakterije). Po fagocitozi se v endoplazemskem retikulumu (ER) peptidi iz endocitotskih veziklov vežejo na proteine MHC II. Kompleks se nato premakne na celično površino. Celica Th se s TCR veže na molekulo MHC II z vezanim antigenskim peptidom. Ta interakcija ji da stabilne imunske sinapse med ustreznim klonom limfocita T in APC. Če celica Th po vezavi z APC prepozna tuji peptid v kompleksu MHC II, se aktivira in prične izločati citokine. Celice Th1 sproščajo zlasti protivnetna IL-2 in IFN- γ , celice Th2 pa protivnetne IL-4, IL-5 in IL-10. Citokini vplivajo na vnetje in regulirajo aktivnost in nastajanje limfocitov B, Tc in Th [1, 3].

Limfociti Tc so efektorji pridobljene celične imunosti. Na površini izražajo TCR in koreceptor CD8 (Cluster of Differentiation 8), ki imata enako vlogo kot tista pri celicah Th, le da CD8 zagotavlja interakcijo Tc z molekulami MHC razreda I. Molekule MHC I so nasprotno od MHC II izražene na površini vseh celic z jedrom in večinoma vežejo virusne in tumorske fragmente proteinov iz citosola. Prepozna antigena preko TCR na limfocitih Tc aktivira sintezo receptorjev za IL-2. Če je IL-2 v okolici celic Tc dovolj, se ta veže na receptorje, Tc pa se začnejo deliti in napadati tarčne celice ter sproščati citotoksične proteine. Med bolj znanimi so perforini, ki penetrirajo v membrano in v njej tvorijo luknjice, ter grancimi, ki inducirajo apoptozo. Skupaj uničujejo okužene in maligno spremenjene celice [1, 3].

1.2 TOLL-U PODOBNI RECEPTORJI

Sredi devetdesetih let 20. stoletja so pri človeku odkrili protein, strukturno podoben proteinu Toll, ki so ga sicer najprej našli v vinski mušici (*Drosophila*) in ga poimenovali Toll-u podobni receptor 1 (TLR1). Signalizacija preko TLR v vinski mušici sproži izločanje protimikrobnih peptidov, ki jo ščitijo pred glivičnimi okužbami. Leta 1997 so pri sesalcih odkrili molekulo TLR4. Danes je pri človeku poznanih 10 Toll-u podobnih receptorjev [4].

Toll-u podobni receptorji igrajo pomembno vlogo tako v prirojenem kot v pridobljenem imunskem odzivu. Najdemo jih na različnih imunskih celicah in v njih, zlasti pri makrofagih, dendritičnih celicah, limfocitih B, določenih vrstah limfocitov T in nekaterih neimunskih celicah, kot so na primer fibroblasti in epiteljske celice [5]. So transmembranski proteini, ki glede na vrsto nase vežejo specifične komponente patogenih mikroorganizmov. Večina ligandov TLR so PAMP [5]. Vezava TLR z ligandom sproži v celici kaskado signalizacijskih poti, ki vodi v prepisovanje in izločanje vnetnih citokinov, zlasti TNF- α in IFN tipa I. Ti poskrbijo za hiter imunski odziv tako, da sprožijo procese vnetja, dodatno izražanje kemotaktnih molekul ter diferenciacijo in aktivacijo limfocitov T [1, 4]. Aktivacija večine TLR vodi v diferenciacijo Th1, ne pa Th2 [5]. Molekule TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 in TLR6 so na celični površini in prepoznavajo strukturne komponente bakterij in gliv. Molekule TLR3, TLR7, TLR8, in TLR9 so prisotne skoraj izključno na znotrajceličnih membranah endosomov ali fagosomov in prepoznavajo virusne komponente in njihove nukleinske kisline [5, 6]. Glede na strukturo jih delimo na šest poddružin: TLR1/2/6/10, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7/8/9 in TLR11/12/13/21/22/23 [7, 8]. Pri ljudeh najdemo TLR 1-10. Poznamo strukture receptorjev za TLR1, TLR2, TLR3, TLR4 in TLR6 [9]. Obstajajo tri skupine ligandov za TLR, in sicer proteini, nukleinske kisline in ligandi z lipidno osnovo.

Lipidni ligandi: Molekula TLR4 prepozna LPS po Gramu negativnih bakterij, TLR2 pa s pomočjo receptorja CD36 komponente po Gramu pozitivnih bakterij. V heterodimerni obliki TLR1 in TLR2 prepoznavata triacilirane, TLR2 in TLR6 pa diacilirane lipopeptide.

Proteinski ligandi: Molekula TLR5 prepozna bakterijski flagelin.

Nukleinske kisline kot ligandi: Molekula TLR3 prepozna dvojnovijačno virusno RNA, TLR7 in TLR8 enovijačno virusno RNA, TLR9 pa tako bakterijsko kot virusno DNA [6]. Liganda za TLR10 do sedaj še niso odkrili [5].

1.2.1 Struktura molekul TLR

Molekule TLR so integralni membranski receptorji tipa I. Na *N*-koncu imajo domeno za prepoznavanje patogenih strukturnih molekul oziroma ligandov, za njo enojno transmembransko vijačnico, na *C*-koncu pa še domeno za citoplazemsko signaliziranje [9, 5].

Vsi receptorji TLR imajo kljub veliko različnim ligandom podobno strukturo zunajceličnih vezavnih mest zanje. Domeno na *N*-koncu sestavljajo glikoproteini iz 550-800 aminokislinskih ostankov. To področje je izraženo bodisi zunaj celice ali v endosomu, odvisno od tega, ali je TLR prisoten na celični ali endosomski membrani. Za zunajcelično domeno je značilno ponavljanje vzorcev, v katerih se velikokrat ponovi aminokislina levcin, zato jih imenujemo tudi LRR (Leucine Rich Repeat). Navadno jo sestavlja 19-25 struktur LRR, ki so prostorsko razporejene v obliki podkve. Interakcije med ligandi in zunajceličnimi domenami se razlikujejo glede na vrsto TLR.

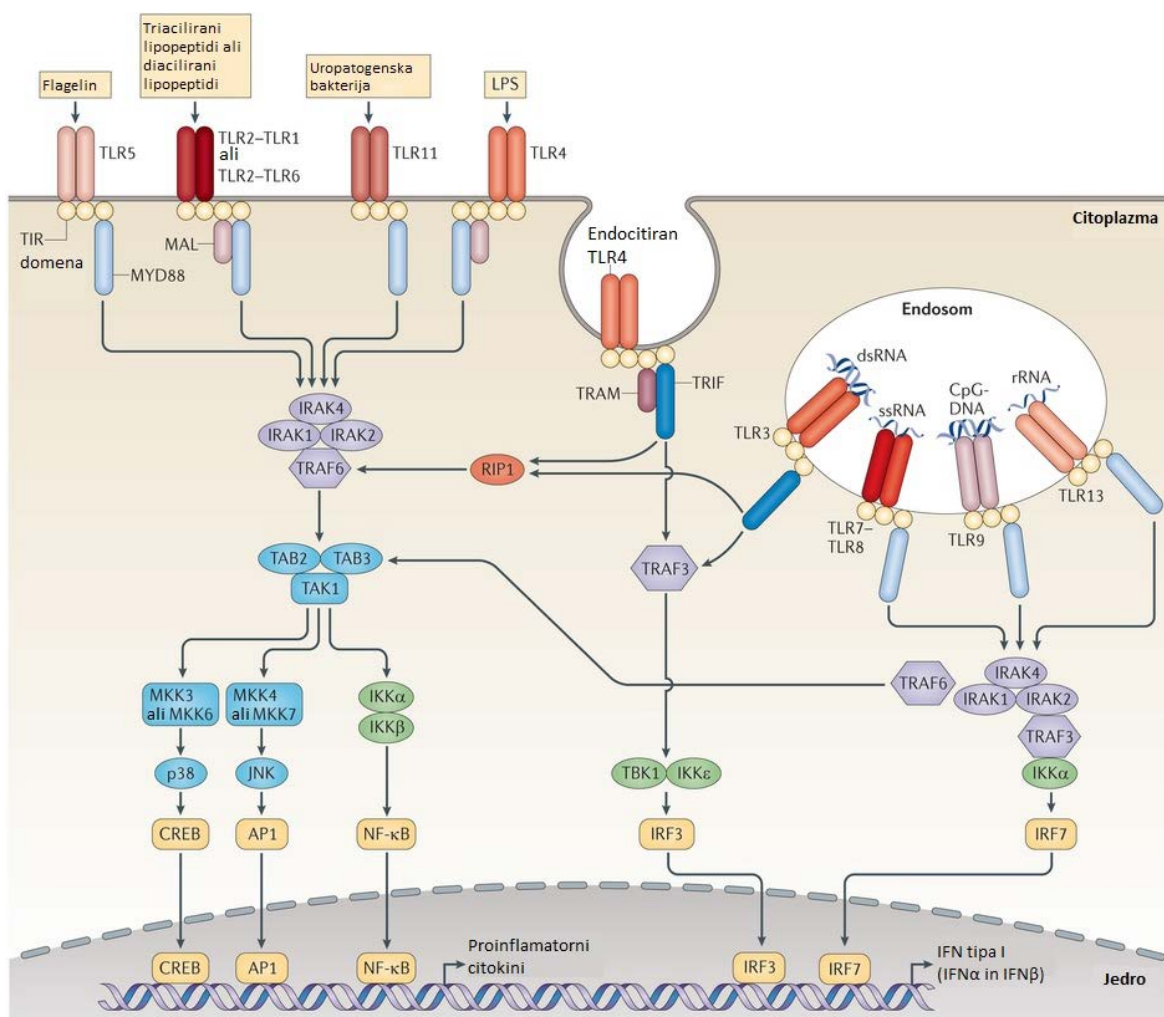
Transmembransko področje je zgrajeno iz približno 20 nenabitih, večinoma hidrofobnih aminokislinskih ostankov.

Signalno področje imenujemo domena Toll/interleukin-1 receptor (IL-1R) (TIR), saj ima enako homologijo kot domene družine receptorjev za IL-1 (IL-1R) [9].

1.2.2 Splošna signalizacijska pot TLR

Čeprav so interakcije med TLR in ligandi odvisne od vrste receptorja, pa za vse do sedaj odkrite družine TLR velja, da se po vezavi liganda dve zunajcelični domeni spremenita v obliko črke 'M' in stisneta ligand medse, pri čemer se tvori dimerni kompleks. Dimerizacija zunajceličnih domen sproži konformacijsko spremembo in dimerizacijo transmembranskih in citoplazemskih domen TIR. To nato prepoznajo adaptorske molekule domene TIR in sprožijo signalno kaskado. Štirje najpomembnejši adaptorski proteini so MyD88 (Myeloid Differentiating primary response gene 88), MAL/TIRAP (MyD88-Adaptor-Like/TIR-Associated Protein), TRIF (TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN- β) in TRAM (TRIF-related Adaptor Molecule) [5, 9]. Receptorji TLR delujejo preko več različnih signalnih poti, po katerih se aktivirajo AP-1 (aktivatorski protein 1; Activator Protein 1), IRF (Interferon Regulatory Factor) in NF- κ B (transkripcijski ali jedrni dejavnik κ B; Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). Molekule IRF-5, AP-

1 in NF- κ B povzročijo izločanje provnetnih citokinov, NF- κ B, IRF-3 in IRF-7 pa inducirajo gene za provnetne citokine in IFN tipa I (Slika 1) [5, 10].



Slika 1: Shematski prikaz signalizacijskih poti TLR.

1.3 TOLL-U PODOBNI RECEPTOR 4 (TLR4)

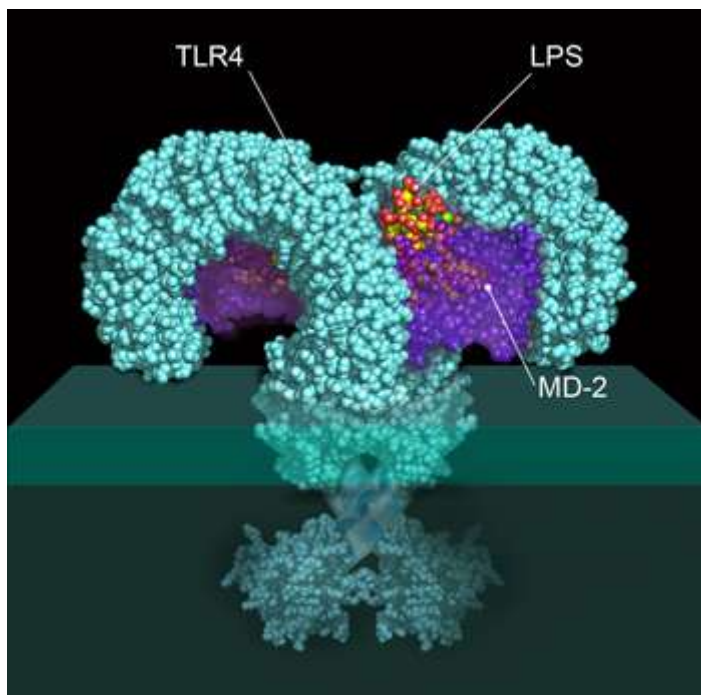
Molekula TLR4 prepoznava lipopolisaharid (LPS), bakterijski endotoksin, ki je glavna komponenta zunanje membrane po Gramu negativnih bakterij in je najbolj raziskani PRR [9]. Lipopolisaharid bakterije *Escherichia coli* je sestavljen iz treh delov, in sicer lipida A, jedra in O-antigena [12]. Lipid A, biološko aktivni del molekule, je zgrajen iz β -1,6-D-glukozaminskega disaharida, ki je aciliran s šestimi verigami maščobnih kislin, nanj pa sta vezana še dva fosfata [12]. Receptor TLR4 selektivno prepoznava tudi lipooligosaharide

(LOS) in raznovrstne strukturne komponente virusov, gliv in mikoplazem. Njegovo aktivacijo lahko povzročijo tudi notranji dejavniki, tako imenovani z nevarnostjo povezani molekularski vzorci (DAMP – danger associated molecular patterns). Ti se sproščajo pri poškodbah in vnetjih in delujejo tipično agonistično [13]. Izraženi so zlasti na monocitih, makrofagih, dendritičnih celicah, mastocitih in črevesnem epiteliju [6].

1.3.1 Aktivacija TLR4

LPS-vezavni protein LBP (LPS-binding protein) je protein akutne faze, ki najprej prenese posamezno molekulo LPS na molekulo CD14, od tu pa se pripne na MD-2 (Myeloid Differentiation protein 2). Nato sledi dimerizacija receptorja in nastanek simetričnega dimerne kompleksa LPS–MD-2–TLR4, ki ima obliko črke 'M' (Slika 2) [13, 14].

Pet od skupno šestih lipidnih verig lipida A v molekuli LPS je zasidranih v hidrofobni žep molekule MD-2. Šesta veriga pa interreagira s fenilalanini druge molekule TLR4 v kompleksu. Dva fosfata iz lipida A prav tako interreagirata z verigama TLR4 [6].



Slika 2: Dimerizirani kompleks LPS-MD-2-TLR4.

1.3.2 Signalizacija TLR4

Po dimerizaciji TLR4 potuje znotrajcelični signal po dveh različnih signalizacijskih poteh. Prva je odvisna, druga pa neodvisna od MyD88, ki temelji na efektorskih molekulah TRIF in TRAM. Proizvodnja pro-vnetnih citokinov preko MyD88 je značilna za vse TLR, razen za TLR3 [13].

Od MyD88 odvisna pot vodi pri TLR4 v priklic adaptorjev MyD88 in MAL (imenujemo ga tudi TIRAP) iz citoplazme, ki se vežeta na receptorske domene TIR. Adaptorska molekula MyD88 se nato poveže v kompleks s kinazo IRAK-4 (IL-1 receptor-Associated Kinase). Ta fosforilira kinazo IRAK-1, s katero tvori kompleks in jo tako aktivira. Kinaza IRAK-1 je povezana z dejavnikom TRAF6 (TNF Receptor-Associated Factor 6), s katerim po aktivaciji disociirata z receptorja. Molekula TRAF6 interreagira s kinazo TAK1 (TGF- β (Tumor Growth Factor β) Activated Kinase 1) in proteinoma TAB1 (TAK1 binding protein 1) in TAB2, nato pa se jim v kompleksu pridružita še ligazi Ubc13 in Uev1A, kar povzroči aktivacijo TAK1. Proces se nato lahko nadaljuje po dveh različnih signalizacijskih poteh. Po prvi poti aktivirana kinaza TAK1 fosforilira kompleks IKK (I κ B kinazni kompleks), sestavljen iz IKK α , IKK β in NEMO/IKK γ . Razpad tega kompleksa sprosti transkripcijski dejavnik NF- κ B iz kompleksa z molekulo I κ B- α . Jedrni transkripcijski dejavnik NF- κ B potuje v jedro in sproži transkripcijo genov za pro-vnetne citokine, kot sta TNF- α in IL-6. Po drugi poti aktivirana kinaza TAK1 fosforilira kinaze MAP, na primer JNK, ki aktivirajo transkripcijski dejavnik AP-1, ki prav tako povzroči transkripcijo genov za pro-vnetne citokine v celičnem jedru [12, 15].

Od MyD88 neodvisna signalna pot vodi v priklic adaptorskih molekul TRIF in TRAM iz endosomov, kar najprej povzroči aktivacijo TRAF3, nato pa še aktivacijo kompleksa TBK1/IKK ϵ . Ta fosforilira in aktivira transkripcijski dejavnik IRF-3, ki inducira nastanek IFN- β , ta pa aktivira molekulo STAT 1 (Signal Transducer and Activator of Transcription 1), kar vodi v indukcijo genov, ki kodirajo interferone tipa I (IFN I) [6, 15].

1.4 UPORABA AGONISTOV IN ANTAGONISTOV TLR V TERAPIJI BOLEZNI

Receptorji TLR so dobra terapevtska tarča pri boleznih, pri katerih je imunski sistem premalo ali preveč aktiven. Blokiranje TLR bi lahko ustavilo kronično vnetje in zdravilo bolezni, kot so artritis, multipla skleroza in kronično vnetje črevesa. Z agonisti TLR pa bi lahko pospešili prirojeni imunski odziv, zato bi jih lahko uporabljali kot cepiva proti nalezljivim boleznim in pri terapiji raka.

V Sloveniji je že več let na tržišču imikvimod, ki deluje kot agonist na TLR7. Povzroči izločanje pro-vnetnega citokina IFN α , ki deluje protivirusno in protitumorno. Inducira tudi proizvodnjo IL-6 in TNF- α . Uporabljamo ga za zdravljenje genitalnih bradavic, keratoz in karcinomov bazalnih celic [6, 16].

Uporaba agonistov in antagonistov TLR4 v terapiji

Odkrili so že veliko rastlinskih izvlečkov, ki zavirajo aktivnost TLR4 in jih uporabljajo v tradicionalni kitajski in ajurvedski medicini, na primer iz zelenega čaja, golostebelnega sladkega korena, ingverja, pa tudi posamezne izolirane spojine s tovrstno aktivnostjo, kot sta cimetni aldehid in kurkumin. Opioidi, na primer morfin, pa preko TLR4 aktivirajo procese nevrogenega vnetja. Prednosti naravnih modulatorjev TLR4 pred amfifilnimi sintezniimi in naravnimi analogi lipida A so boljša topnost, boljša biološka uporabnost in manjša toksičnost [13].

Agonisti TLR4

Agonisti TLR4 bi lahko služili kot sredstvo za krepitev imunogenosti tumorskih celic in uspešnosti kemoterapije pri zdravljenju raka. Umirajoče tumorske celice morajo namreč, da se dendritične celice lahko ustrezno aktivirajo in učinkovito predstavijo njihove antigene citotoksičnim limfocitom T, imunskemu sistemu poslati ustrežni signal. Ta signal lahko posreduje tudi TLR4.

Tako majhne spremembe v strukturi lipida A kot njegovi analogi in mimetiki, lahko delujejo agonistično ali antagonistično na TLR4. Molekula OM-174, ki deluje kot agonist TLR4, je vodotopni, difosforilirani in triacetilirani derivat lipida A iz *E. Coli*. S testiranjem na miših so dokazali, da OM-174 zavira rast tumorjev, povečuje proizvodnjo IFN γ in podaljšuje njihovo življenje. Trenutno je v prvi fazi kliničnega preskušanja (OM Pharma). V tretji fazi kliničnega preskušanja je trenutno Pollinex Quattro, cepivo, ki vzpodbuja

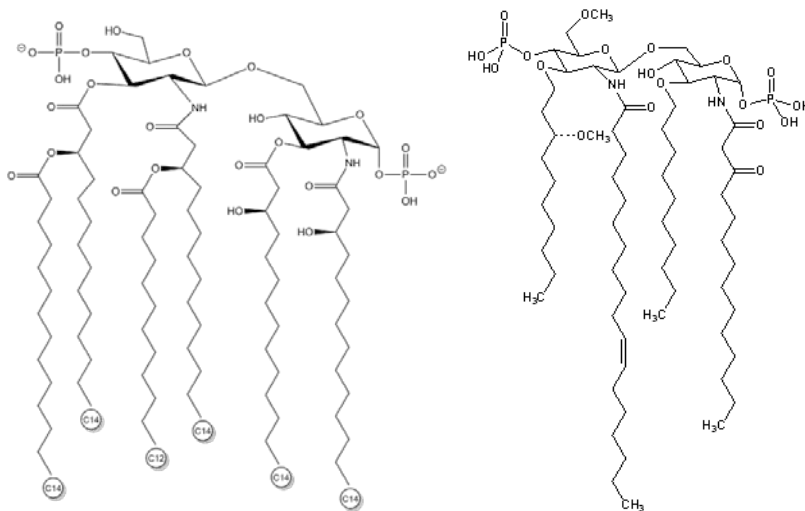
TLR4 in je namenjeno zmanjšanju pojavljanja sezonskih alergij. Kot sestavina cepiva proti hepatitisu B in človeškemu papiloma virusu pa je v Evropi že odobren derivat LPS, monofosforilirani lipid A (MPLA). Je manj toksičen od LPS in specifično aktivira signalno pot TRAM/TRIF TLR4, kar vodi v indukcijo IFN β in regulacijo izražanja kostimulacijskih molekul CD80/86, kar ima ključni terapevtski učinek [6].

Antagonisti TLR4

Antagoniste TLR4 bi lahko uporabljali za zdravljenje bolezni, pri katerih je imunski sistem prekomerno aktiviran, na primer sepse, sistemskega lupusa eritematozusa (SLE) in revmatoidnega artritisa. Inhibicija izločanja citokina TNF se je že izkazala kot učinkovita terapija pri revmatoidnem artritisu [17]. Pomembna tarča antagonistov TLR4 je vezavno mesto na MD-2, kamor se sicer veže lipid A (Slika 3) [18]. Ugotovili so, da mora verige maščobnih kislin derivatov lipida A za uspešno stimulacijo TLR4 sestavljati vsaj 8 ogljikovih atomov, njihovo optimalno število pa je 10. Analogi s krajšimi verigami namreč niso aktivni. Tudi manj acilirani in fosforilirani analogi lipida A imajo slabše agonistične lastnosti, so pa manj toksični [12].

Eden izmed antagonistov na TLR4, ki so ga najbolj raziskali, je eritoran (Slika 3), analog lipida A, ki ga sestavljajo štiri verige maščobnih kislin različnih dolžin in lastnosti [6, 13, 19]. Temelj antagonističnega delovanja eritorana je njegova sposobnost umestitve v hidrofobni žep MD-2, pri čemer heterodimer TLR4-MD-2 ne more nastati [13]. Klinična preskušanja so zaradi pomanjkanja učinkov pri pacientih s sepsa zaključili že v tretji fazi [12].

Lipid IVa je intermediat v sintezi lipida A in pri ljudeh deluje antagonistično na TLR4, in sicer tako, da z molekulo LPS tekmuje za vezavo na MD-2 [6].



Slika 3: Lipid A (levo) in eritoran (desno).

Tudi TAK 242 je znani inhibitor z majhno molekulsko maso, ki pa je strukturno povsem različen od lipida A. Kovalentno se veže na Cys747 v znotrajcelični domeni in tako selektivno inhibira signal TLR4. Klinična preskušanja zdravljenja sepse so prekinili v tretji fazi, saj pri ljudeh ni deloval dovolj učinkovito [12].

Ibudilast (AV411) klinično preskušajo za zdravljenje kronične bolečine in odtegnitvenega sindroma pri odvisnostih, saj naj bi preprečil procese nevrogenega vnetja [6].

V razvoju so tudi različna protitelesa proti TLR4 in peptidne molekule, ki preprečujejo dimerizacijo receptorja tako, da se vežejo na LPS, MD-2 ali TLR4 [6, 12, 13].

Napredek v iskanju novih antagonistov je omogočila tudi novoodkrita kristalna struktura kompleksa TLR4-MD-2, s pomočjo katere so ugotovili, da so interakcijske sile med MD-2 in receptorjem podolgovate in ozko usmerjene, velikosti 40Å x 20Å [20, 21]. Najpomembnejše tovrstne interakcije so vodikove vezi med Ser-183 in Asp-209 na TLR4 in Arg-106 na MD-2 [22]. Površina je dobra tarča za potencialne antagoniste, odkrite s pomočjo rešetanja na osnovi strukture in liganda. Ustrezne molekule bi lahko onemogočile interakcije med TLR4 in MD-2 in tako v idealnem scenariju preprečile signalno kaskado ter sproženje imunskega odziva [23].

2. NAČRT DELA

1. Topnost testnih spojin

Po virtualnem rešetanju na osnovi liganda in prvem testiranju z metodo SPR smo iz interne banke spojin izbrali 35 takšnih, ki so izkazovale afiniteto do Toll-u podobnega receptorja 4 (TLR4). Naša prva naloga bo ugotoviti njihovo topnost. Skladno z njihovo molsko maso jih bomo najprej raztopili v dimetilsulfoksidu (DMSO) tako, da bodo njihove koncentracije 10 mmol/l. Raztopljenim spojinam bomo nato ugotovili topnost v mediju za gojenje celic. Najprej jih bomo raztopili v mediju pri koncentraciji 100 $\mu\text{mol/l}$. Tiste, ki se pri tej koncentraciji ne bodo raztopile, pa bomo poskusili raztopiti pri nižjih koncentracijah, in sicer pri 50 $\mu\text{mol/l}$ in 25 $\mu\text{mol/l}$.

2. Citotoksičnost testnih spojin

S testom MTS za celično linijo HEK 293 bomo preverjali toksičnost spojin, ki jim bomo v prvem koraku uspešno ugotovili topnost. Pogoj za zanesljivost dobljenih rezultatov o delovanju spojin sta nemotena rast in živost celic, zato bomo pred nadaljnjim testiranjem izločili vse citotoksične spojine.

3. Testiranje agonističnega in antagonističnega delovanja izbranih spojin

Izbrane spojine bomo testirali na celični liniji HEK-Blue™ hTLR4, proizvajalca InvivoGen. V celicah te celične linije je transificiran gen za TLR4, ki je povezan s poročevalskim genom za alkalno fosfatazo (SEAP). Kako spojine delujejo na celično linijo, bomo ugotavljali glede na količino sproščene SEAP, ki jo bomo ugotovili z merjenjem absorbance. Spojine bomo testirali pri koncentracijah 100 $\mu\text{mol/l}$, 50 $\mu\text{mol/l}$ ali 25 $\mu\text{mol/l}$, odvisno od njihove maksimalne topnosti. Spojinam, ki se bodo v testu najbolje izkazale, bomo poskusili ugotoviti tudi IC_{50} .

3. MATERIALI

3.1 BIOLOŠKI MATERIAL

- Celice HEK-Blue™ hTLR4 (InvivoGen, San Diego, ZDA)

3.2 SPOJINE ZA TESTIRANJE

- Spojine, ki smo jih izbrali za testiranje

3.3 REAGENTI IN TOPILA

- DMSO, $\geq 99.9\%$ (Sigma Aldrich, St. Louis, ZDA)
- DPBS - brez Ca^{2+} , brez Mg^{2+} (Gibco®, Life Technologies, Grand Island, New York, ZDA)
- DMEM (PAA, Linz, Avstrija)
- FBS (PAA, Linz, Avstrija)
- Normocin™ (InvivoGen, San Diego, ZDA)
- Pripravljeni medij za gojenje celic (DMEM + 10 % FBS + Normocin™)
- Etanol, 70-odstotni (V/V) (Ecolab, St. Paul, Minnesota, ZDA)
- TrypLE Express (InvivoGen, San Diego, ZDA)
- Tripansko modriilo, 0,4-odstotna raztopina za mikroskopiranje (Sigma Aldrich, St. Louis, ZDA)
- Reagent MTS (CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent, Promega, Madison, ZDA)
- Kolorimetrični encimski test QUANTI-Blue™ (InvivoGen, San Diego, ZDA)
- Reagent LPS (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, ZDA)

3.4 PRIBOR

- Gojilne plastične posode s površino 75 cm^2 in s filtrom v pokrovčku (Nunc, Roskilde, Danska)
- Mikrotitrške plošče z ravnim dnom z 48 vdolbinicami (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA)
- Mikrotitrške plošče z ravnim dnom s 96 vdolbinicami (Nunc, Roskilde, Danska)

- Serološke pipete 5 ml, 10 ml in 50 ml (Greiner CELLSTAR®, Sigma Aldrich, St. Louis, ZDA)
- Sterilne centrifugirke 15 ml in 50 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)
- Sterilne kapalke 2,5 ml (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Avstrija)
- Polavtomatske pipete 0,5-10 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl (BRAND® Transferpette®, Wertheim, Nemčija) in nastavki (Eppendorf ® epT.I.P.S., Hamburg, Nemčija)
- Epruvetke PCR 0,65 ml (Corning® Costar®, New York, ZDA) in 1,5 ml (Eppendorf ®, Hamburg, Nemčija)
- Bürker-Türkova števna komora (BRAND®, BlauBrand®, Wertheim, Nemčija)
- Objektna stekelca (Neubauer, Lancing, VB)
- Rokavice za enkratno uporabo (Simps'S, Trzin, Slovenija)

3.5 NAPRAVE

- Brezprašna sterilna komora (Iskra PIO, MC 15-3, Šentjernej, Slovenija)
- Stresalnik Vibromix 10 Vortex (Domel, Železniki, Slovenija)
- Hladilnik in zamrzovalnik -20 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- Mikroskop (Nikon Eclipse Ti-S)
- Inkubator *Hera Cell 150* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA)
- Centrifuga Thermo Electron Jouan CR4i (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA)
- Mikrocentrifuga Minispin® (Eppendorf ®, Hamburg, Nemčija)
- Čitalec ELISA (Epoch, BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, ZDA)

4. METODE

4.1 TOPNOST SPOJIN

Delovanje spojin na TLR4 smo ugotavljali tako, da smo jih določeni čas inkubirali skupaj s celicami HEK293. Točne rezultate lahko dobimo le, če so spojine v mediju popolnoma topne. Zato smo, da bi dosegli njihovo maksimalno koncentracijo v mediju, morali najprej določiti najvišje koncentracije, pri katerih so bile spojine topne v DMSO.

Dimetilsulfoksid (DMSO) je pogosto uporabljano topilo brez barve in vonja, ki raztaplja polarne in nepolarne spojine, meša pa se z veliko drugimi topili, vključno z vodo. Sklepamo lahko, da se spojine, ki v DMSO niso topne, tudi v mediju ne bodo raztopile. DMSO je primerno topilo tudi zaradi nizke toksičnosti. Do končne vsebnosti 0,5 % - 1 % glede na volumen medija njegova prisotnost v raztopini ne ovira testiranja. Zelo pomembno je namreč, da topilo, ki ga uporabimo, ne vpliva na rast celične linije HEK293 [24].

Spojine, ki smo jih dobili v trdnem agregatnem stanju, smo skladno z njihovo natehtano maso in molsko maso raztopili v DMSO tako, da je bila njihova začetna koncentracija 10 mmol/l. To je optimalna koncentracija, s katero lahko nato v mediju dosežemo koncentracijo 100 μ mol/l. Za vsa nadaljnja testiranja smo uporabljali spojine, ki smo jih predhodno alikvotirali z DMSO.

$$V(DMSO) = \frac{n}{c} = \frac{m_{spojine}}{M_{spojine} \times c} = \frac{m_{spojine}}{M_{spojine} \times 0,010 \frac{mol}{l}}$$

Enačba 1: Enačba za izračun volumna DMSO, ki ga moramo dodati spojini v trdnem stanju, da dobimo njeno raztopino s koncentracijo 10 mmol/l.

V Preglednici I so predstavljene spojine, ki smo jih dobili v trdnem agregatnem stanju in jim dodali preračunane volumne DMSO.

Preglednica I: Prikaz molskih mas, natehtanih mas in izračunanih volumnov DMSO, ki smo jih morali dodati, da smo dobili raztopine spojin s koncentracijo 10 mmol/l.

Spojina	Molekulska masa spojine M (g/mol)	Natehta m (mg)	Volumen DMSO (µl)
10F4 (1)	649,57	0,63 mg (1) 2,69 mg (2)	97,0 (1) 414 (2)
10A4 (2)	609,52	3,55 mg	582
10C1 (3)	519,42	0,99 mg	191
10E10 (4)	586,89	6,19 mg	1055
10E11 (5)	510,99	2,80 mg	548
10A11 (15)	631,03	3,90 mg	618

V naslednjem koraku smo preverjali, če so spojine topne v mediju pri koncentraciji 100 µmol/l. Vsako od njih smo s pufrom DPBS redčili do 100-krat nižje koncentracije tako, da smo prenesli v epruvetko 250 µl pufru DPBS, nato pa s hitrimi iztisi in izsesavanji s pipeto primešali 2,5 µl 10 mmol/l raztopine spojine v DMSO. Vsebino v epruvetki smo nato hitro premešali na stresalniku Vibromix. Tako smo preprečili morebitno obarjanje. Raztopino smo nato prenesli v vdolbinico plošče z 48 vdolbinicami z ravnim dnom in s svetlobnim mikroskopom pri 100-kratni povečavi preverili, če so se v vdolbinici morda pojavili kristali kakršnekoli oblike.

Ugotovili smo, da se veliko spojin pri koncentraciji 100 µmol/l v mediju ni raztopilo, zato smo v naslednjih korakih njihovo topnost optimizirali. Vse netopne spojine smo z DMSO iz osnovne koncentracije 10 mmol/l razredčili do koncentracije 5 mmol/l. To smo storili tako, da smo s pipeto posrkali vso količino raztopine s koncentracijo 10 mmol/l in natančno izmerili njen volumen, nato pa dodali enak volumen DMSO. Spojine, ki se tudi pri koncentraciji 50 µmol/l niso raztopile v pufru, smo ponovno redčili z DMSO, tokrat do

osnovne koncentracije 2,5 mmol/l. Ker dve spojini v DPBS nista bili topni niti pri koncentraciji 25 μ mol/l, smo ju zavrgli. Koncentracije, nižje od 25 μ mol/l v mediju namreč ne zadostujejo za pripravo delovne raztopine z ustrežno maksimalno testno koncentracijo.

4.2 DELO S CELIČNO LINIJO HEK293 HEK-Blue™ hTLR4

Celice HEK293 (ledvične celice človeškega zarodka) so zaradi hitre rasti in možnosti preproste transfekcije genov pogosto uporabljana celična linija v bioloških raziskavah.

Nizozemski znanstvenik Alex Van der Eb jo je zasnoval leta 1970. Vir celic je bil zdrav splavljeni človeški zarodek. Frank Graham je nato celično linijo preobrazil z DNA adenovirusom tipa 5, z metodo transfekcije s kalcijevim fosfatom. Celice so poimenovali HEK293, ker je bil to Grahamov 293. eksperiment [25, 26].

Te celice so zelo občutljive na vplive iz okolja, zato moramo z njimi ravnati previdno. Lahko se namreč zgodi, da z mehanskimi dražljaji nevede sprožimo aktivacijo transificiranega receptorja TLR4 in zato dobimo nepravilne rezultate. Tako se moramo izogibati na primer sunkovitim trkom celic ob stene vsebnikov, neposrednemu drezanju vanje s pipeto in podobno. Delati moramo v aseptičnih pogojih, saj lahko v nasprotnem primeru pride do okužbe z različnimi mikroorganizmi iz okolice. Celice bi lahko zaradi tega pomrle ali nehale rasti. Eden izmed znakov okužbe je tudi rast celic nenavadnih oblik, zato celične kulture med gojenjem redno opazujemo z mikroskopom.

V sterilni laboratorij smo lahko vstopili le iz predprostora, v katerem smo si najprej dobro umili roke, se preoblekli v ustrezna oblačila (kirurška halja) in preobuli v obutev, ki je bila namenjena uporabi v laboratoriju. V laboratoriju smo si nadeli rokavice in poskrbeli za redno razkuževanje rok in vsega, kar smo prenesli v sterilno komoro. Brezprašna sterilna komora je omejen prostor, v katerem piha laminarni tok filtriranega zraka, ki preprečuje vstopanje delcev iz zunanje okolice¹. S celicami smemo delati samo tam, zunaj pa morajo biti vsebniki s celicami in reagenti trdno zaprti. Pri delu moramo biti pazljivi in zagotoviti, da ne pride do zunanje ali notranje kontaminacije. Zato nismo delali nenadnih gibov in smo pazili, česa smo se dotikali z rokami in s konicami pipet.

¹ Vir: Slovenski medicinski slovar

4.2.1 Priprava medija za gojenje celic

Medij in dodatke, namenjene gojenju celične linije HEK-Blue™ hTLR4, določi proizvajalec. Podatki o tem so navedeni v specifikacijskem listu [27].

Za gojenje celične linije HEK293 uporabljamo medij DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), ki vsebuje glukozo v koncentraciji 4,5 g/l, aminokisliline, soli in vitamine, potrebne za rast in vzdrževanje celic. Hranimo ga v hladilniku, pri temperaturi do 8 °C. Zaželeno je, da ga pred uporabo segrejemo na sobno temperaturo, saj tako ob stiku s celicami ne povzroči temperaturnega šoka [28].

Serum govejih zarodkov FBS (Fetal Bovine Serum) je najpogostejši dodatek medijem za celične kulture. Vsebuje rastne hormone, proteine in druga hranila. Običajno ga dodajamo v deležu 10 % glede na volumen medija. Tako smo 500 ml medija DMEM dodali 50 ml FBS [29].

Potrebovali smo še ustrezni antibiotik, ki ne vpliva na celice, zato smo uporabili Normocin™. Tako smo preprečili morebitni razrast motečih mikoplazem, gliv in bakterij, ki bi se zaradi ugodnih razmer lahko pojavile v mediju in vplivale na plazmide za MD-2/CD14 in alkalno fosfatazo (SEAP), vgrajene v HEK293. Končna koncentracija normocina v mediju je bila 100 µg/ml [30].

4.2.2 Odmrzovanje celic

Celice lahko dlje časa hranimo zamrznjene v tekočem dušiku. Proizvajalec celice pošlje zamrznjene v vialah ($3-7 \times 10^6$ celic/vialo). Tako omogoči preprost transport in njihovo dolgo življenjsko dobo. Pred uporabo smo celice odmrznili. Kriovialo s celicami smo najprej hitro segreli v topli vodi s temperaturo 37 °C, dokler se vsebina ni odlepila od roba. Če bi segrevali predolgo, bi celice zaradi prevelikega temperaturnega šoka lahko pomrle. Vialo smo nato poškopili s 70-odstotnim (V/V) etanolom, da smo preprečili kontaminacijo. Iz krioviale smo v sterilni komori celice prenesli v centrifugirko z volumnom 50 ml, ki smo jo postavili na ledeno kopel (zmes vode in ledu). V centrifugirko smo počasi, s premori, po kapljicah dodajali hladni pripravljeni medij do skupnega volumna 10 ml, pri čemer je bilo v viali približno 2 ml celične suspenzije. Nato smo dodali 10 ml pufru DPBS s fiziološkim pH območjem. Ta pufer vsebuje ogljikohidrate, ki omogočajo osnovno delovanje celičnega metabolizma. Uporabljamo ga za odlepljanje celic

od podlage, njihov transport, redčenje, pripravo reagentov in drugo [31]. Celice smo nato skladno z navodili v priloženem specifikacijskem listu centrifugirali 5 min pri 200 g (1000 obratov v minuti), da bi preprečili mehanske poškodbe. Med centrifugiranjem so se celice posedle na dno, nastala je celična usedlina. Krioprotektant in mrtve celice so ostale nad njo v supernatantu, ki smo ga na koncu odlili in celice resuspendirali v približno 1 ml DPBS. To smo storili s hitrim iztiskanjem in vsesavanjem s pipeto. Pri tem smo morali paziti, da celic nismo iztisnili neposredno v dno, saj bi se tako lahko mehansko poškodovale. V plastično gojilno posodo s površino 75 cm² in s filtrom na pokrovčku smo nato odpipetirali 12 ml medija, dodali resuspendirane celice in inkubirali v inkubatorju *HERA cell 150* pri 37 °C in 5 % CO₂ v zraku [27].

4.2.3 Vzdrževanje celične kulture

Po približno enem tednu, pri čemer je čas gojenja v splošnem odvisen od začetnega števila celic, smo z invertnim svetlobnim mikroskopom opazovali rast celic in njihovo morfologijo na dnu gojilne posode. Z opazovanjem morfologije celic smo dobili informacije o njihovi živosti. Če so bile sploščene oblike in povezane med seboj, so bile žive in primerne za testiranje ali nadaljnje gojenje. Kadar pa so bile okrogle in posamične, pa je najverjetneje prišlo do celične apoptoze in neuspešne rasti. Žive celice smo inkubirali do približno 80-odstotne preraščenosti gojilne površine (konfluentnosti). Konfluenta pomeni celično preraščanje dna gojilne posode v enojnem sloju. Paziti smo morali, da celice niso prerastle celotne površine gojilne posode, zato jih nismo gojili predolgo.

V specifikacijskem listu proizvajalca je navedeno, da naj bo število celic od 1 x 10⁵ do 3 x 10⁵ celic/ml in ne več kot 1 x 10⁶ celic/ml [27].

Če je celic preveč, tudi hitreje porabljajo hranilne snovi v mediju. Medij, ki je bolj rumen kot rožnat, nakazuje hitrejšo porabo hranilnih snovi in ga moramo zamenjati. To sicer storimo približno dvakrat ali trikrat tedensko. Celic naj ne bi presajali več kot 20-krat, saj se po določenem času lahko začnejo genotipsko spreminjati, kar opazimo kot zmanjšano oziroma spremenjeno odzivnost. Genetska nestabilnost je sicer značilna za vse gensko transficirane celice [27].

Celice smo presajali tako, da smo iz gojilne posode najprej odvzeli medij, nato pa jih trikrat sprali s po približno 5 ml pufra DPBS. S Ca²⁺ in Mg²⁺ ioni tvorijo celice kelatne

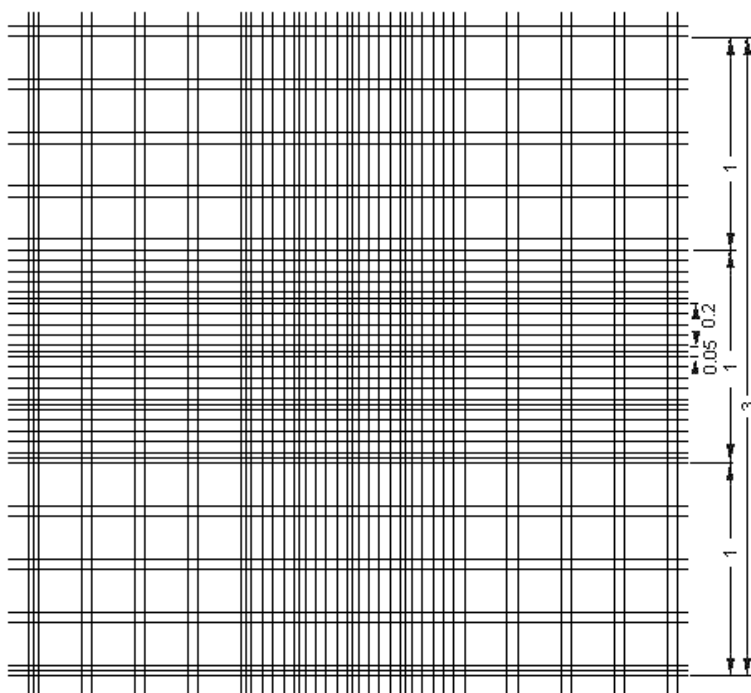
komplekse, ki jim omogočajo pritrnitev na podlago. Ker DPBS kalcija in magnezija ne vsebuje, smo z njim lahko spirali celice, tako omogočili njihovo odlepljanje in preprečili tvorjenje skupkov, hkrati pa odstranili tudi morebitne odmrle celice in preostanek medija. Nato smo dodali približno 12 ml pufru DPBS in počakali, da so se celice odlepili od površine. Odlepljene so bile videti kot beli kosmi v tekočini. Lahko bi dodali tudi 1-2 ml tripsina (rekombinantni encimi), ki močno razdira vezi med celicami in podlago, vendar smo se njegovi uporabi raje izognili, saj bi lahko spremenil njihovo odzivnost. Odlepljanje smo pospešili mehansko, s previdnim potresavanjem gojilne posode. Ko so se vse celice odlepili, smo suspenzijo s pipeto zbrali v centrifugirki z volumnom 50 ml in centrifugirali 4 minute pri 300 g. Supernatant smo odlili, celično usedlino pa resuspendirali v DPBS do skupnega volumna 1 ml. Celice so bile tako pripravljene za štetje in testiranje. Del celične suspenzije pa smo skupaj z 12 ml celičnega medija prenesli v gojilno posodo in jih inkubirali pri 37 °C in 5 % CO₂, dokler nismo ponovno dobili dovolj celic, ki smo jih lahko znova uporabili.

4.2.4 Štetje celic

Delovanje spojin smo testirali na celicah v mikrotitrskih ploščah s 96 vdolbinicami. Ker je število celic, ki naj jih posamezna vdolbinica vsebuje, vnaprej predpisano, smo morali celice v suspenziji predhodno prešteti. To smo storili s pomočjo Bürker-Türkove števne komore.

Najprej smo s pipeto dobro premešali celično suspenzijo in tripansko modrilo v vdolbinici mikrotitrskih plošč. Pri delu s celicami HEK293 smo ju uporabili v razmerju, v katerem ju najpogosteje uporabljamo, to je 180 : 20, kar pomeni 180 µl tripanskega modrila in 20 µl celične suspenzije. Če pa vemo, da je v suspenziji celic malo, dodamo manj tripanskega modrila, na primer 80 µl ali 20 µl. Del pripravljene suspenzije s tripanskim modrilom nato s pipeto iztisnemo pod krovno stekelce, ki ga predhodno položimo na Bürker-Türkovo komoro. Bürker-Türkova števna komora je ploščica iz optičnega stekla, v površino katere sta vgravirani dve mreži, ena zgoraj in druga spodaj. Za vsako štetje potrebujemo eno mrežo, ki je sestavljena iz devetih velikih kvadratov s stranico dolgo 1 mm (Slika 4) [32]. Vsak kvadrat je dodatno razdeljen na 16 manjših kvadratkov s stranico dolgo 0,2 mm. Ti

kvadratki so na sredini plošče v vzorcu križa razdeljeni še na 16 dodatnih kvadratkov s stranico dolgo 0,05 mm. Globina mreže pod krovnim stekelcem je 0,1 mm.



Slika 4: Mreža, odtisnjena na Bürker-Türkovo komoro.

Komoro s celicami smo opazovali s svetlobnim mikroskopom pri 100-kratni povečavi. Tripansko modriilo vstopi v citoplazmo mrtvih celic in jih obarva temno modro. V žive celice barvilo ne more prodreti, zato so svetle in prosojne ter jih lahko enostavno prepoznamo. Štetni smo začeli skrajno levo, v kvadratu s stranico dolgo 0,2 mm, ki je nad osrednjim, dodatno razdeljenim kvadratom (9. kvadrataek od spodaj navzgor). Da kakšne celice ne bi pomotoma prešteli dvakrat, smo uporabili pravilo, kjer preštejemo vse celice v kvadratu, vključno s tistimi, ki se dotikajo zgornje in leve stranice, tistih, ki se dotikajo spodnje in desne, pa ne. Pri štetju smo se premikali linearno z leve proti desni. Ko smo prišli do skrajnega desnega kvadratka, smo prešteli en kvadrataek nad njim, nato pa smo se pomikali navzdol, dokler nismo prišli pod kvadrataek, ki je dodatno razdeljen (4. kvadrataek od spodaj navzgor). Nato smo s štetjem nadaljevali vodoravno v vrsti z desne proti levi, do zadnjega, 25. kvadratka. Ko smo s štetjem zaključili, smo krovno stekelce zavrgli in števno komoro previdno očistili z vodo in 70-odstotnim (V/V) etanolom. Skupno število celic smo izračunali z enačbo:

$$\frac{\text{število prešteti celic}}{10} \times V(\text{osnovne celične suspenzije v ml}) = X \times 10^6 \text{ celic}$$

Enačba 2: Enačba za izračun števila celic, ki smo jih prešteli v Bürker – Türkovi števeni komori v določenem volumnu celične suspenzije.

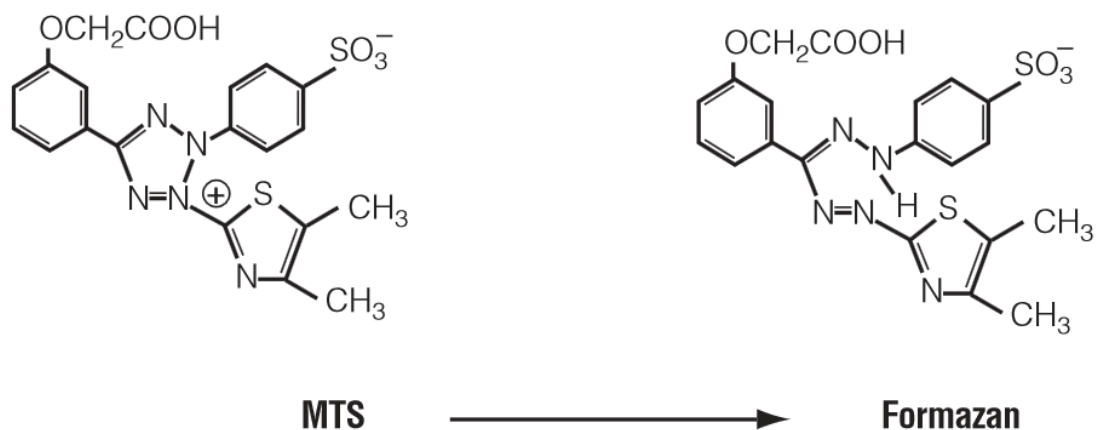
To enačbo uporabimo, ko je razmerje tripansko modrilo : celična suspenzija = 180 : 20.

Ko je razmerje tripansko modrilo : celična suspenzija = 80 : 20, količnik 10 zamenjamo z 20. Ko pa je razmerje tripansko modrilo : celična suspenzija = 20 : 20, uporabimo količnik 50.

4.3 TEST CITOTOKSIČNOSTI

Preden smo se lotili testiranja agonističnega in antagonističnega delovanja spojin, smo morali oceniti kompatibilnost celic HEK293 z njimi. Če spojine delujejo zaviralno na rast celične kulture, ali če celice zaradi njihove toksičnosti pomrejo, njihovega delovanja ne moremo realno ovrednotiti. Da dosežemo čim bolj točne rezultate, moramo torej paziti, da spojine ne vplivajo na rast in preživetje celične kulture.

Test citotoksičnosti z reagentom MTS sodi med kolorimetrične metode. Reagent MTS vsebuje tetrazolijevo spojino [3-(4,5-dimetil-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol, ki je ion dvojček; MTS] in elektron-donorski reagent PES (fenazinijev etosulfat). Slednji ima okrepljeno kemično stabilnost in z reagentom MTS tvori stabilno raztopino. Žive, metabolno aktivne celice z mitohondrijskimi dehidrogenazami reagent MTS pretvorijo v vodotopni formazan (Slika 5) [33]. Količina formazana, ki jo določimo z merjenjem absorbanca, pa je sorazmerna številu živih celic. Reagent lahko hranimo dlje časa pri temperaturi -20 °C. Med uporabo ga moramo zaščititi pred svetlobo [33].



Slika 5: Redukcija reagenta MTS do vodotopnega formazana.

Najprej smo pripravili vse potrebno za inkubiranje spojin s celicami. Celice HEK293 smo iz gojilne posode zbrali v centrifugirko, centrifugirali pri 300 g 3 minute, celično usedlino pa resuspendirali v DPBS in celice prešteli s pomočjo Bürker-Türkove komore. Na mikrotitrski plošči s 96 vdolbinicami smo s pisalom označili vdolbinice s testiranimi spojinami, negativno kontrolo in tiste, ki so vsebovale samo medij (ozadje). Negativna kontrola so bile netretirane celice, ki jim nismo dodali spojin in so služile za primerjavo z odzivom tretiranih celic.

Da dobimo čim bolj zanesljive rezultate, moramo spojine testirati v vsaj dveh paralelah. Za vsako paralelo smo v epruvetki pripravili 5 μ l raztopine spojine v DMSO in ji dodali 500 μ l medija. Vsebnost spojine v končni raztopini mora biti 1 %, zato smo prvotno raztopino vsake spojine redčili do 100-krat nižje koncentracije. Končno raztopino smo dobro premešali na stresalniku in jo v volumnu po 200 μ l odpipetirali v posamezno vdolbinico. Ker je HEK293 hitro rastoča celična kultura, je dobro, da je za testiranje citotoksičnosti spojin v vsaki vdolbinici mikrotitrške plošče približno 40.000 celic [27].

Volumen celične suspenzije, ki smo ga dodali v vsako vdolbinico, smo izračunali z enačbo:

$$V \text{ celic (ml)} = \frac{\text{število celic v eni vdolbinici (40.000)}}{\text{število celic v 1 ml celične suspenzije (preštejemo v Bürker-Türkovi komori)}}$$

Enačba 3: Enačba za izračun volumna celične suspenzije, ki ga moramo dodati v vsako vdolbinico mikrotitrne plošče, da v njej dobimo želeno število celic.

Ker je za točnost rezultatov pomembno, da je število celic v vsaki vdolbinici čim bolj enako, smo med dodajanjem suspenzije epruveto s celicami sproti večkrat premešali. Tako se celice niso posedle na dno in so bile enakomerno razporejene v suspenziji.

Celice smo nato 24 ur inkubirali pri 37 °C in 5 % CO₂ v zraku. Nato smo najprej z mikroskopom opazovali morfologijo tretiranih celic in jih primerjali z netretiranimi. O živosti celic nam je veliko povedala že barva medija. Bolj kot je bil rumenkast, manj hranilnih snovi, ki jih celice potrebujejo za rast in preživetje, je ostalo v njem. Rdečkast, nespremenjen medij pa je kazal na njihovo neživost. V vsako vdolbinico smo nato odpipetirali po 10 µl reagenta MTS in mikrotitrne plošče znova inkubirali. Po približno dveh do treh urah smo opazili oranžno rjavo obarvanje medija in s čitalcem za plošče ELISA izmerili absorbanco pri valovni dolžini 490 nm.

4.4 TEST AGONISTIČNE AKTIVNOSTI SPOJIN NA TLR4

Celice HEK-Blue™ hTLR4 so pridobili s transfekcijo človeških genov za receptor TLR4, ter za ko-receptorja MD-2 in CD14. Kot reporterski gen so uporabili gen za placentarno alkalno fosfatazo SEAP. Gen SEAP nadzoruje promotor IL-12 p40, ki je vezan na NF-κB in na AP-1 preko petih vezavnih mest. Ligand TLR4 z vezavo na receptor aktivira NF-κB in AP-1, kar sproži transkripcijo in proizvodnjo SEAP [27].

Količino SEAP v supernatantu celične kulture ugotovimo s pomočjo reagenta QUANTI-Blue™. Ta se v prisotnosti alkalne fosfataze po cepitvi fosfatne vezi spremeni iz roza v vijolično/modro. Intenzivnost modrega odtenka odraža aktivnost SEAP. Količino SEAP

lahko tako ocenimo že s prostim očesom, natančno pa jo določimo spektrofotometrijsko pri 620-655 nm. Reagent smo predhodno pripravili tako, da smo vsebino ene epruvetke raztopili v 100 ml deionizirane vode, nastalo raztopino pa filtrirali skozi membrano z velikostjo por 0,2 μm [34].

S testom smo skušali ugotoviti, ali katera od spojin deluje agonistično v primerjavi z LPS, ki je znani agonist na receptorjih TLR4. Lipopolisaharid (LPS) je glavna komponenta zunanje membrane po Gramu negativnih bakterij. Najdemo ga na površini celice, kjer ga lahko prepoznajo receptorji TLR4 in sprožijo imunski odziv. Membranski LPS ščitijo bakterijo pred žolčnimi solmi in lipofilnimi antibiotiki. Že dolgo so znani kot glavni povzročitelji sepse pri ljudeh in sprožitelji močnega vnetnega imunskega odziva v celicah sesalcev. Ključni pomen za njegovo endotoksično delovanje ima lipid A, ki je del strukture LPS [35].

Pri ugotavljanju agonistične ali antagonistične aktivnosti smo celice najprej dobro sprali z DPBS brez Ca^{2+} in Mg^{2+} ionov in tako omogočili njihovo odlepljanje od rastne podlage. Centrifugirali smo jih pri blagih pogojih, to je 3 minute pri 300 g in z njimi rokovali čim bolj previdno, da se zaradi mehanskega šoka ne bi aktiviral gen za prepis SEAP. Po večkratnem testiranju agonistične in antagonistične aktivnosti spojin smo ugotovili, da je zanesljivost rezultatov največja, če celice predhodno inkubiramo in pustimo rasti 24 ur. Ker je čas inkubacije v tem primeru daljši, smo jih v vsako vdolbinico mikrotitrskе plošče s 96 vdolbinicami dali nekoliko manj, in sicer po 22.000 v 100 μl medija. Ko smo testirali tri paralele, smo po 24 urah v epruvetkah pripravili 400 μl medija in 8 μl raztopine posamezne spojine. Ko smo testirali samo dve paraleli, pa je zadoščalo 250 μl medija in 5 μl raztopine posamezne spojine. V vsako vdolbinico s celicami smo nato dodali po 100 μl raztopine spojin iz epruvetk. Skupni volumen v eni vdolbinici je bil tako 200 μl . Po dveh urah inkubacije celic s spojinami smo v ustrezne vdolbinice dodali po 1 μl raztopine agonista LPS s koncentracijo 0,4 ng/ μl , tako da smo v mediju dosegli končno koncentracijo 2 ng/ml. Za testiranje agonistične aktivnosti smo LPS dodali v tri vdolbinice, ki so nam služile kot pozitivna kontrola. Negativno kontrolo so predstavljale netretirane celice v mediju. Po končani 24-urni inkubaciji pri 37 °C in 5 % CO_2 v zraku smo pripravili novo mikrotitrsko ploščo. V vsako vdolbinico smo odpipetirali po 180 μl reagenta QUANTI-Blue™ in 20 μl supernatanta iz prejšnje mikrotitrskе plošče, v kateri smo inkubirali celice. Hitrost spreminjanja barve je v splošnem odvisna od števila inkubiranih

celic, čas, po katerem spremembo opazimo, pa je 15-60 minut. Med čakanjem na spremembo barve smo morali mikrotitrsko ploščo inkubirati pri 37 °C [35]. Absorbanco smo izmerili spektrofotometrično pri valovni dolžini 620 nm s čitalcem za plošče ELISA.

4.5 TEST ANTAGONISTIČNE AKTIVNOSTI SPOJIN NA TLR4

Test antagonistične aktivnosti smo izvajali enako kot test agonistične aktivnosti, le da smo pri testiranju slednje dodali LPS v koncentraciji 2 ng/ml tudi v vsako vdolbinico s spojinami, in sicer 2-6 ur po dodatku spojin. Tako smo omogočili, da spojine predhodno zasedejo vezavna mesta na TLR4, preden jih zasede LPS. Skušali smo ugotoviti, ali se katera spojina veže na isto vezavno mesto kot LPS oziroma zavira njegovo delovanje. Tokrat so pozitivno kontrolo predstavljale netretirane celice, tiste, ki smo jim dodali samo LPS brez ostalih spojin, pa negativno.

Test smo izvajali po naslednjem postopku:

1. centrifugiranje celic HEK293 3 min pri 300 g in ugotavljanje njihove številske koncentracije;
2. pipetiranje preračunanega volumna celične suspenzije in medija v vdolbinice mikrotitrsko plošče s 96 vdolbinicami;
3. 24-urna inkubacija pri 37 °C in 5 % CO₂ v zraku;
4. priprava raztopin spojin v mediju in njihovo dodajanje v vdolbinice s celicami;
5. 2- do 6-urna inkubacija pri 37 °C in 5 % CO₂ v zraku;
6. dodajanje raztopine LPS do končne koncentracije 2 ng/ml na vdolbinico;
7. 24-urna inkubacija pri 37 °C in 5 % CO₂ v zraku;
8. izvedba encimskega kolorimetričnega testa QUANTI-Blue™: v vdolbinice smo odpipetirali po 180 µl reagenta QUANTI-Blue™ in po 20 µl vsakega od supernatantov celičnih kultur;
9. merjenje absorbance pri 620 nm po 15-60 min.

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

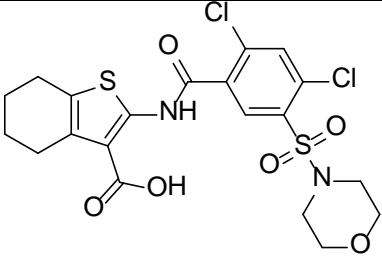
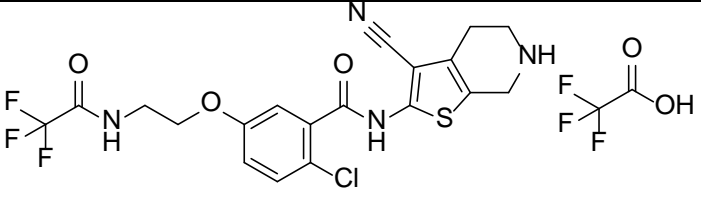
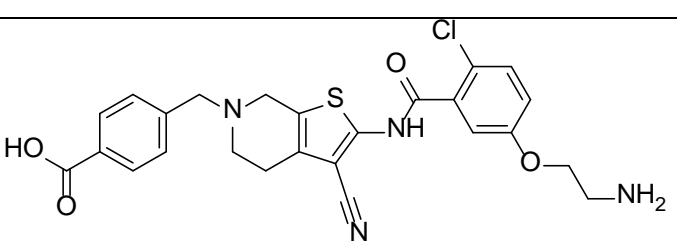
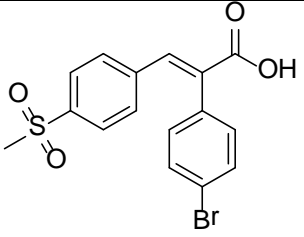
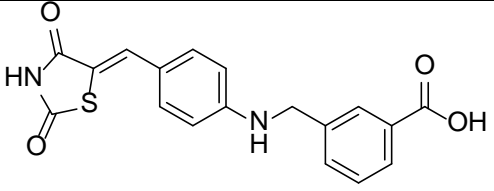
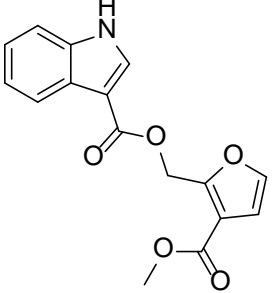
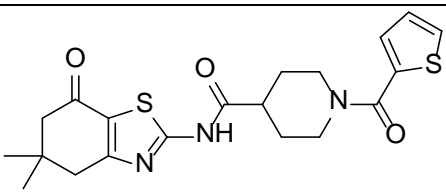
V Preglednici II so prikazane kemijske strukture 35 spojin, izbranih z metodo virtualnega rešetanja, ki so pri testiranju z metodo SPR izkazovale afiniteto do TLR4 ali pa so analogi že znanih antagonistov TLR4². Spojinam z najmočnejšo afiniteto smo lahko določili tudi konstante disociacije (Kd). Na površini senzorskega čipa Series S Sensor chip CM5 (GE Healthcare) smo imobilizirali TLR4, spojine pa smo testirali pri dveh različnih koncentracijah, in sicer pri 20 $\mu\text{mol/l}$ in 200 $\mu\text{mol/l}$.

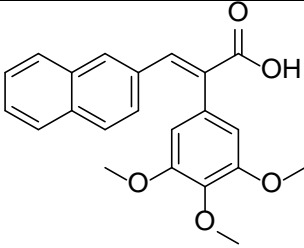
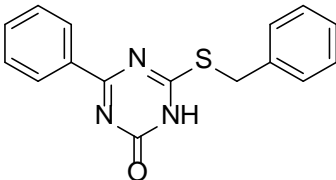
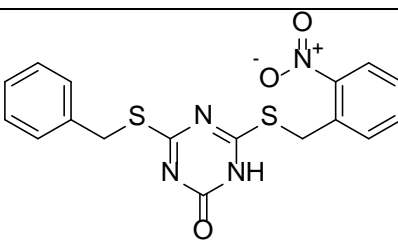
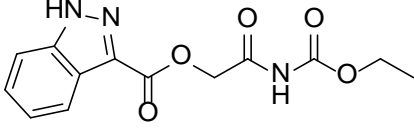
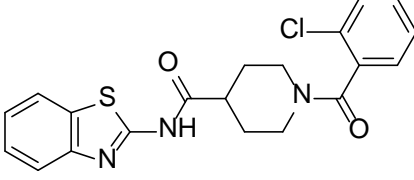
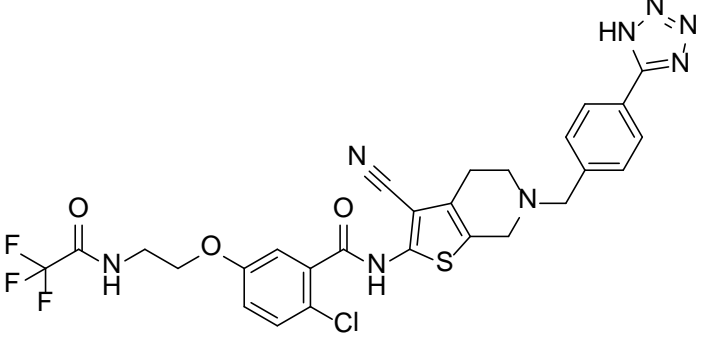
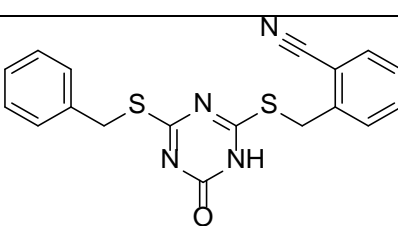
Spojine smo poimenovali glede na njihovo šifro skladiščenja (storage ID), v preglednici pa smo jih dodatno označili z zaporedno številko, jim pripisali vrednosti Kd, ki smo jih ugotovili (spojine iz 1. seta), in molekulsko maso (MM). Strukture smo izrisali s pomočjo programa ChemBioDraw iz danih kod SMILES.

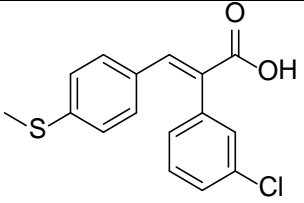
Preglednica II: Prikaz kemijskih struktur testiranih spojin, njihovih molekulskih mas in konstant disociacij.

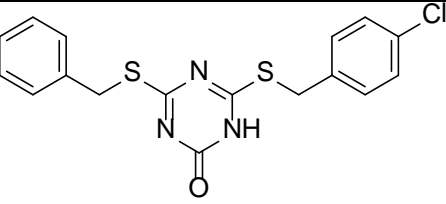
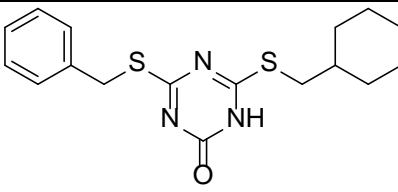
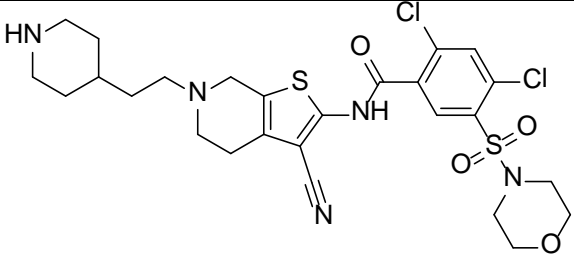
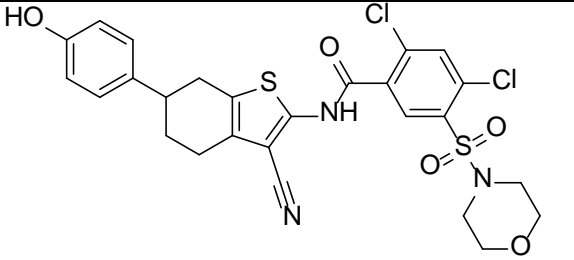
1. set spojin			
Šifra skladiščenja (zaporedna št.)	Struktura	MM (molekulska masa)	Kd
10F4 (1)		649,57	4
10A4 (2)		609,52	6,8

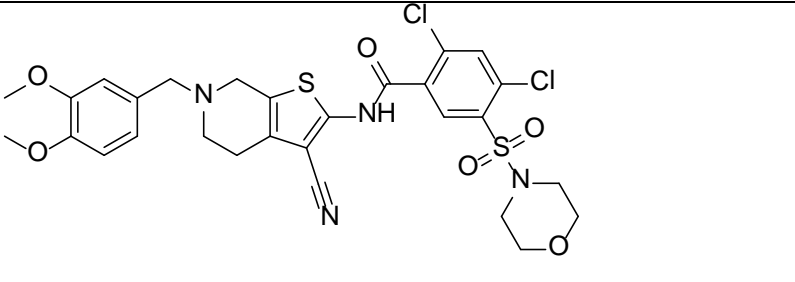
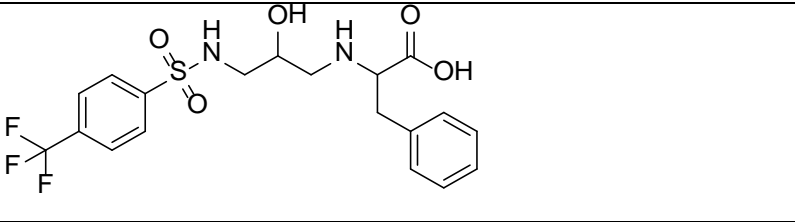


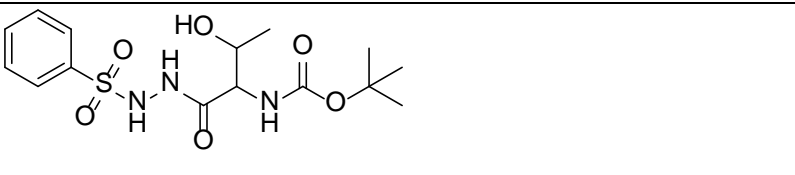
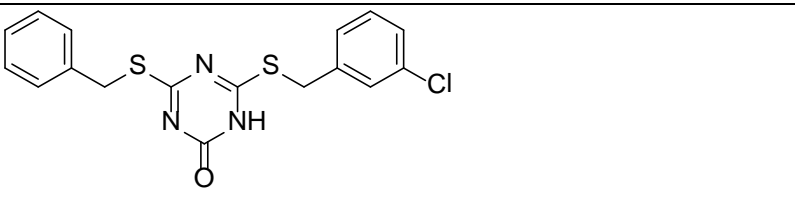
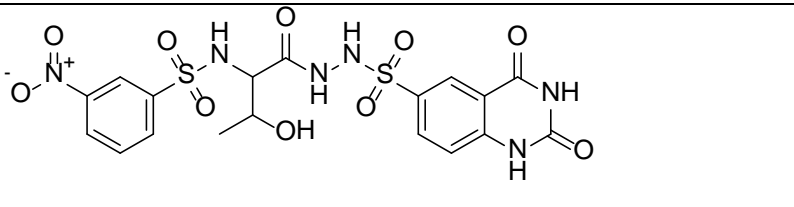
² Spojini SAM-3 (34) in SAM-4 (35) sta bili sintetizirani v okviru diplomske naloge Maje Gregorič in smo ju vključili v testiranje, ker sta analoga že znanega antagonista na TLR4 in sicer spojine 3, objavljene v članku [23].

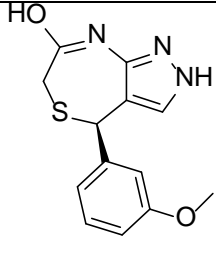
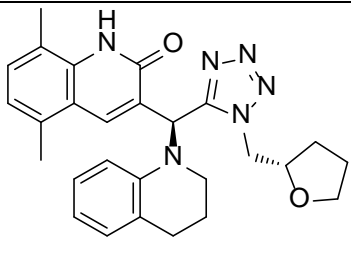
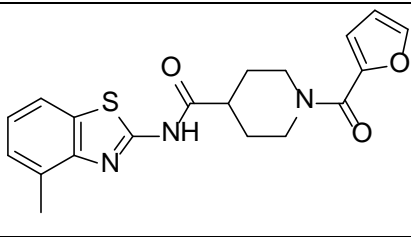
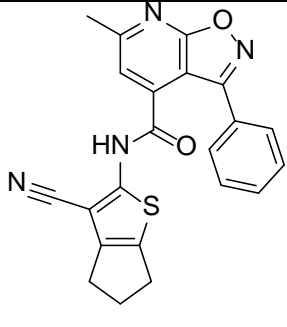
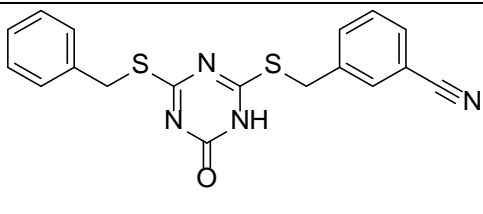
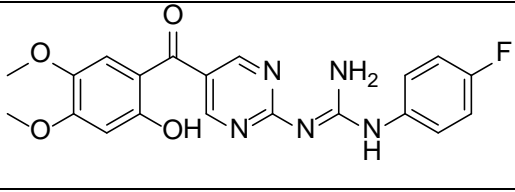
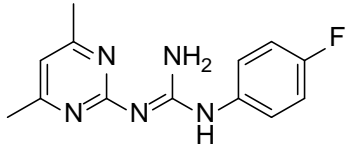
10C1 (3)		519,42	13
10E10 (4)		586,89	16
10E11 (5)		510,99	18
1F10 (6)		381,24	29,7
14E7 (7)		354,38	32
1A7 (8)		299,28	53
4H10 (9)		417,54	63

1A10 (10)		364,39	171,2
7E4 (11)		295,36	196,3
7C2 (12)		386,45	202,7
1H6 (13)		291,26	205,2
4G8 (14)		399,89	206,1
10A11 (15)		631,03	225
7G1 (16)		366,46	246

1C10 (17)		304,79	253,3
---------------------	---	--------	-------

2. set spojin			
Šifra skladiščenja (zaporedna št.)	Struktura	MM (molekulska masa)	
7H2 (18)		375,90	
7G3 (19)		347,50	
10C3 (20)		612,59	
10E6 (21)		592,51	

<p>10G4 (22)</p>		<p>651,58</p>
<p>11H5 (23)</p>		<p>446,44</p>
<p>1F8 (24)</p>		<p>270,29</p>
<p>1G8 (25)</p>		<p>297,39</p>
<p>9F6 (26)</p>		<p>373,42</p>
<p>7G2 (27)</p>		<p>375,90</p>
<p>9G7 (28)</p>		<p>542,50</p>

<p>1A9 (29)</p>		<p>275,33</p>
<p>1B1 (30)</p>		<p>470,57</p>
<p>4D10 (31)</p>		<p>369,44</p>
<p>4F4 (32)</p>		<p>400,45</p>
<p>7H1 (33)</p>		<p>366,46</p>
<p>SAM-3 (34)</p>		<p>411,39</p>
<p>SAM-4 (35)</p>		<p>259,28</p>

5.1 TOPNOST TESTIRANIH SPOJIN

V Preglednici III so prikazani rezultati testiranja topnosti spojin.

Preglednica III: Rezultati ugotavljanja topnosti spojin.

Spojina	Končna koncentracija spojine v 100-odstotnem DMSO (mmol/l)	C_{max} spojine v mediju (μmol/l)	Spojina je bila v mediju v 100x nižji koncentraciji (C_{max}) popolnoma topna.
10F4 (1)	2,5	25	Da
10A4 (2)	2,5	25	Da/Ne
10C1 (3)	10	100	Da
10E10 (4)	10	100	Da
10E11 (5)	2,5	25	Ne
1F10 (6)	10	100	Da/Ne
14E7 (7)	10	100	Da
1A7 (8)	5	50	Da
4H10 (9)	5	50	Da
1A10 (10)	10	100	Da
7E4 (11)	10	100	Da
7C2	10	100	Da

(12)			
1H6 (13)	2,5	25	Ne
4G8 (14)	5	50	Da
10A11 (15)	10	100	Da
7G1 (16)	10	100	Da
1C10 (17)	10	100	Da
7H2 (18)	10	100	Da
7G3 (19)	10	100	Da
10C3 (20)	10	100	Da
10E6 (21)	10	100	Da
10G4 (22)	2,5	25	Da
11H5 (23)	10	100	Da
1F8 (24)	2,5	25	Da
1G8 (25)	10	100	Da
9F6 (26)	10	100	Da
7G2 (27)	10	100	Da
9G7	10	100	Da

(28)			
1A9 (29)	10	100	Da
1B1 (30)	2,5	25	Ne
4D10 (31)	10	100	Da
4F4 (32)	10	100	Da
7H1 (33)	10	100	Da
SAM-3 (34)	1,562	15,62	Da/Ne
SAM-4 (35)	25	250	Da

Spojine 1F10 (**6**) je med postopkom zmanjkalo, zato optimizacije njene topnosti nismo mogli zaključiti, kar smo v preglednici označili z rumeno barvo. Rdeče so v preglednici obarvane tiste spojine, ki se tudi po večkratnem redčenju niso popolnoma raztopile. Iz nadaljnjega testiranja smo tako izključili spojine 10E11 (**5**), 1F10 (**6**), 1H6 (**13**) in 1B1 (**30**).

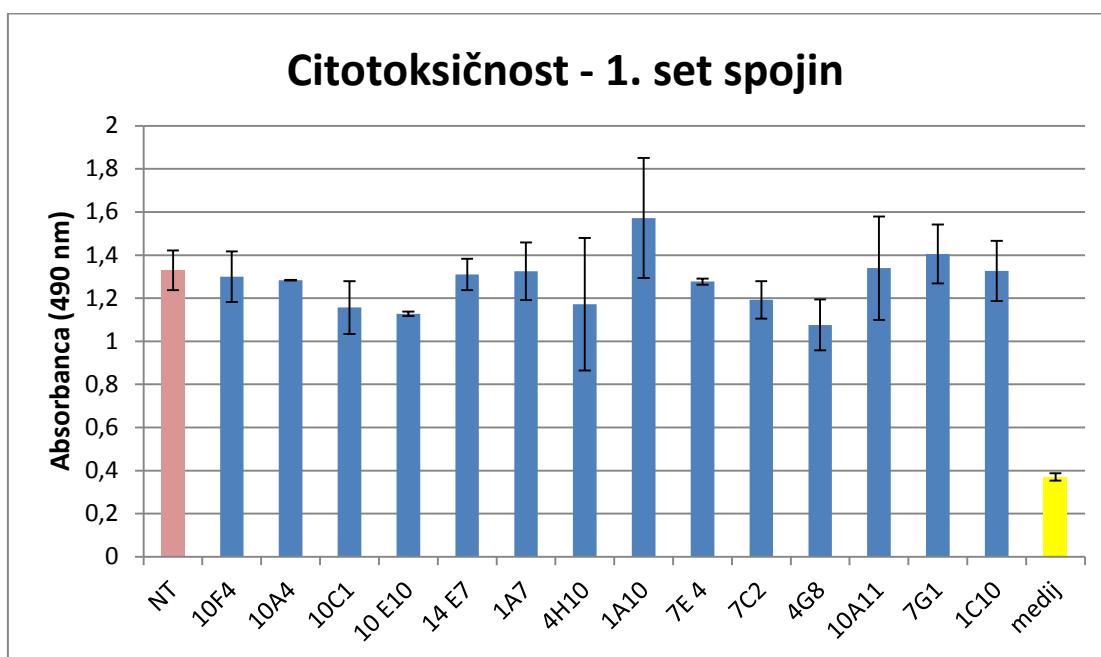
Če pogledamo strukture testnih spojin, opazimo, da vse vsebujejo aromatske in/ali alkilne obroče, nekatere tudi halogene elemente. Te funkcionalne skupine povečujejo njihovo lipofilnost in zmanjšujejo topnost v hidrofilnem celičnem mediju. Kljub temu pa so rezultati ugotavljanja njihove topnosti precej dobri, saj je bila večina spojin topnih v mediju že pri koncentraciji 100 $\mu\text{mol/l}$ in nam zato ni bilo treba zmanjševati njihove osnovne koncentracije v DMSO (10 mmol/l). K boljši topnosti spojin so najverjetneje pripomogle funkcionalne skupine, ki vsebujejo atome kisika in dušika, to so alkoholne, karboksilne, aminske in amidne skupine, teh pa je bilo v strukturah naših spojin precej.

5.2 CITOTOKSIČNOST TESTIRANIH SPOJIN

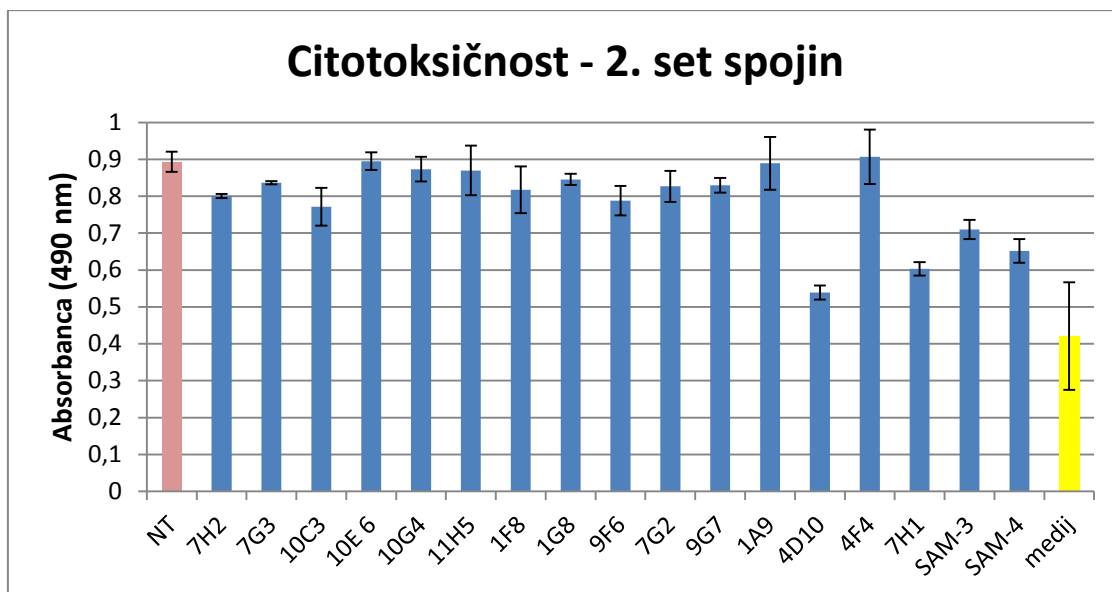
Rezultate testiranja citotoksičnosti spojin na celični liniji HEK-Blue™ hTLR4 smo prikazali v obliki stolpičnih diagramov (Slika 6). Za vsako spojino smo vnesli povprečje izmerjenih absorbanc več paralel ter standardno deviacijo. Rožnata barva prikazuje absorbanco v mikrokulturah netretiranih celic, modra absorbance v mikrokulturah s posameznimi spojinami, rumena pa absorbanco medija brez celic (ozadje).

Izračunali smo tudi odstotke preživelih celic, inkubiranih s spojinami, glede na živost netretiranih celic. Rezultate smo zbrali v Preglednici IV.

Testirali smo najvišje koncentracije spojin, pri katerih so bile te še popolnoma topne v mediju, kar smo ugotovili s testom topnosti.



Slika 6: Grafični prikaz izmerjenih absorbanc v testu citotoksičnosti za 1. set spojin.



Slika 7: Grafični prikaz izmerjenih absorbanc v testu citotoksičnosti za 2. set spojin.

Preglednica IV: Prikaz deležev preživelih celic, inkubiranih v mediju s testiranimi spojinami, glede na netretirane celice.

1. set spojin		2. set spojin	
Spojina	Delež preživelih celic glede na netretirane celice	Spojina	Delež preživelih celic glede na netretirane celice
NT (netretirane celice)	100,00 %	NT (netretirane celice)	100,00 %
10F4 (<u>1</u>)	97,82 %	7H2 (<u>18</u>)	81,04 %
10A4 (<u>2</u>)	96,54 %	7G3 (<u>19</u>)	84,69 %
10C1 (<u>3</u>)	87,02 %	10C3 (<u>20</u>)	78,07 %
10E10 (<u>4</u>)	84,84 %	10E6 (<u>21</u>)	90,59 %
14E7 (<u>7</u>)	98,61 %	10G4 (<u>22</u>)	88,40 %
1A7 (<u>8</u>)	99,70 %	11H5 (<u>23</u>)	88,03 %
4H10 (<u>9</u>)	88,15 %	1F8 (<u>24</u>)	82,76 %
1A10 (<u>10</u>)	118,28 %	1G8 (<u>25</u>)	85,60 %
7E4 (<u>11</u>)	96,09 %	9F6 (<u>26</u>)	79,76 %
7C2 (<u>12</u>)	89,73 %	7G2 (<u>27</u>)	83,68 %

4G8 (14)	80,93 %	9G7 (28)	83,98 %
10A11 (15)	100,79 %	1A9 (29)	90,02 %
7G1 (16)	105,76 %	4D10 (31)	54,56 %
1C10 (17)	99,81 %	4F4 (32)	91,77 %
		7H1 (33)	61,04 %
		SAM-3 (34)	71,83 %
		SAM-4 (35)	66,00 %

Vidimo, da so rezultati izračunov za spojine 1A10 (**10**), 10A11 (**15**) in 7G1 (**16**) v 1. setu dosegli vrednosti večje od 100 %. Najverjetnejši razlog za to je, da smo v vdolbinice s temi spojinami odpipetirali nekoliko več živih celic, kot bi jih morali, hkrati pa je nekaj celic v vdolbinicah z netretiranimi celicami pomrlo. Celična linija HEK293 je namreč precej občutljiva na dejavnike iz okolja, pogoste so zlasti njihove mehanske poškodbe pri centrifugiranju in pipetiranju.

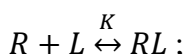
Ugotovili smo, da spojine iz 1. seta pri koncentracijah, pri katerih so maksimalno topne, niso močno citotoksične. Pri uporabi večine spojin je v primerjavi s kontrolo pomrlo največ do 10 % celic. Za najbolj toksično se je izkazala spojina 4G8 (**14**), pri uporabi katere je v primerjavi s kontrolo pomrlo skoraj 20 % celic.

Spojine iz 2. seta so bile bolj citotoksične kot tiste iz 1. seta. V povprečju je v njihovi prisotnosti preživelo okrog 80 % celic. Izkazalo se je, da so najbolj toksične spojine 4D10 (**31**), 7H1 (**33**) in SAM-4 (**35**). Pri najbolj toksični spojini 4D10 (**31**) je pomrla skoraj polovica celic v primerjavi z netretiranimi. Glede na to, da smo za testiranje uporabljali najvišje možne koncentracije spojin, je verjetno, da spojine delujejo na TLR4 tudi pri nižjih koncentracijah, ki pa niso več toksične. Zato smo se odločili, da bomo za nadaljnje testiranje uporabili vse spojine, vendar bomo pri interpretaciji rezultatov pazljivi in bomo upoštevali ugotovitve glede njihove citoksičnosti.

5.3 TEST ANTAGONISTIČNE IN AGONISTIČNE AKTIVNOSTI SPOJIN

Na Fakulteti za farmacijo smo tistim spojinam, ki so izkazovale največjo afiniteto do TLR4, določili konstanto disociacije (K_d). Vrednost K_d nam pove, pri kateri koncentraciji liganda bo ta zasedel 50 % vseh receptorjev, kar predstavlja merilo afinitete liganda do receptorja. Večja K_d pomeni manjšo afiniteto vezave na receptor.

Matematično lahko vezavo liganda na receptor opišemo z enačbama [36]:



$$K_d = \frac{[L][R]}{[LR]} = \frac{[L][R_{total} - LR]}{[LR]}$$

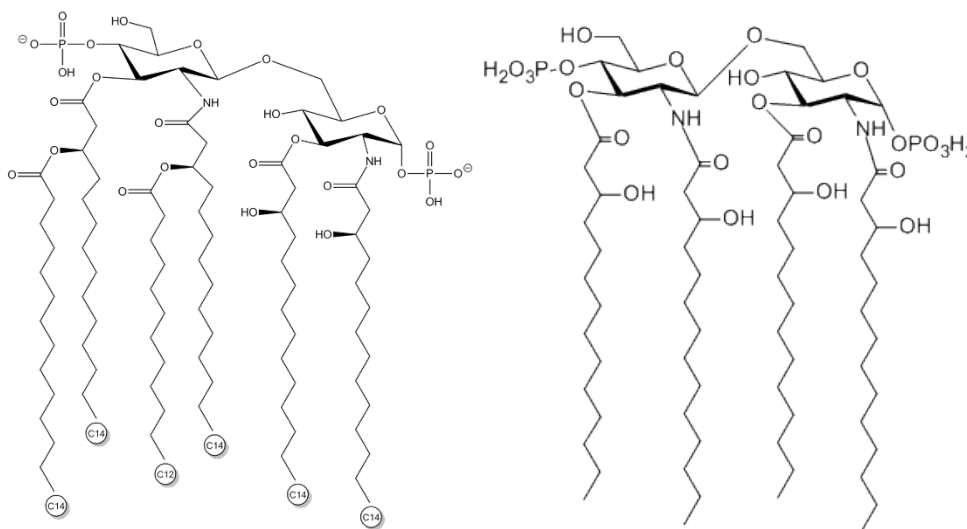
Enačbi 4 in 5: Enačbi vezave liganda na receptor. R = receptor; L = ligand; RL = kompleks receptor-ligand; K_d = ravnotežnostna konstanta oziroma konstanta disociacije

Konstanta disociacije oziroma afiniteta spojin do receptorja pa ne pove ničesar o njihovem delovanju. Ker smo želeli ugotoviti, kako spojine učinkujejo na receptor TLR4, smo preverjali njihovo agonistično in antagonistično delovanje.

Agonisti in antagonisti so ligandi, ki se specifično vežejo na molekulo receptorja. Agonisti sprožijo signal in povzročijo učinek, ki je enak učinku naravnega liganda. Antagonisti preprečijo sproženje signala po vezavi na receptor, oziroma ga ne omogočijo, zato do učinka ne pride. V primeru receptorjev TLR4 bi se antagonist kompetitivno vezal na vezavno mesto agonista oziroma naravnega liganda in tako preprečil njegovo vezavo, zato ne bi prišlo do spremembe konformacije in sproženja signalizacijske poti. Kompetitivni antagonist namreč z agonistom tekmuje za vezavo na receptor, pri čemer je večja verjetnost, da bo ligand, ki je v plazmi v večji koncentraciji, izpodrinil drugega [36, 38].

Zgolj na podlagi kemijske strukture posamezne spojine težko sklepamo, ali bo ta delovala agonistično ali antagonistično. Strukture agonistov in antagonistov so si v splošnem zelo podobne, saj morajo za vezavo na isti receptor tvoriti enak delež določenih kemijskih vezi in zavzemati podobno konformacijo (ureditev v prostoru). Že majhne spremembe v strukturi, kot je na primer zamenjava ene same funkcionalne skupine, lahko povsem

spremenijo delovanje spojine. Dober primer je lipid A, ki predstavlja aktivni del molekule LPS in je naravni agonist na TLR4. Lipid IVa je njegov prekurzor pri sintezi. Deluje kot agonist na mišjem kompleksu TLR4-MD2, v prisotnosti človeškega MD-2 pa kot antagonist, saj ne sproži dimerizacije, ki je potrebna za signalizacijo. Njuni strukturi se razlikujeta le v številu aciliranih verig, pri čemer ima lipid A dve več (Slika 8) [18, 37, 40].



Slika 8: Lipid A (levo) in lipid IVa (desno).

Odločili smo se testirati agonistično in antagonistično aktivnost vseh spojin, ki smo jih prikazali v Preglednici II.

Spojine iz 1. seta so zaradi nizkih vrednosti K_d in večje afinitete do receptorja vsekakor izgledale bolj obetavno, kljub temu pa smo v testiranje vključili tudi spojine iz 2. seta, ki jim nismo določili K_d (ta je višja od 200 $\mu\text{mol/l}$), saj bi kljub temu lahko aktivno delovale na celično linijo. Testirali smo jih pri koncentracijah, pri katerih so maksimalno topne, in tudi pri nižjih koncentracijah. S testiranjem maksimalnih še topnih koncentracij smo pojasnili delovanje spojin. Ugotavljanje, ali so spojine aktivne tudi pri nižjih koncentracijah, pa je pomembno zlasti za tiste, ki so pri maksimalnih delovale citotoksično. Razen tega je tako visoke koncentracije spojin v plazmi težko, večinoma nerealno doseči. Za kontrolo delovanja smo hkrati z netretiranimi celicami v obeh testih uporabili tudi lipopolisaharid (LPS), izoliran iz bakterije *E. coli*, ki je naravni agonist na TLR4. Delovno koncentracijsko območje za LPS je po navodilih proizvajalca od 1 ng/ml

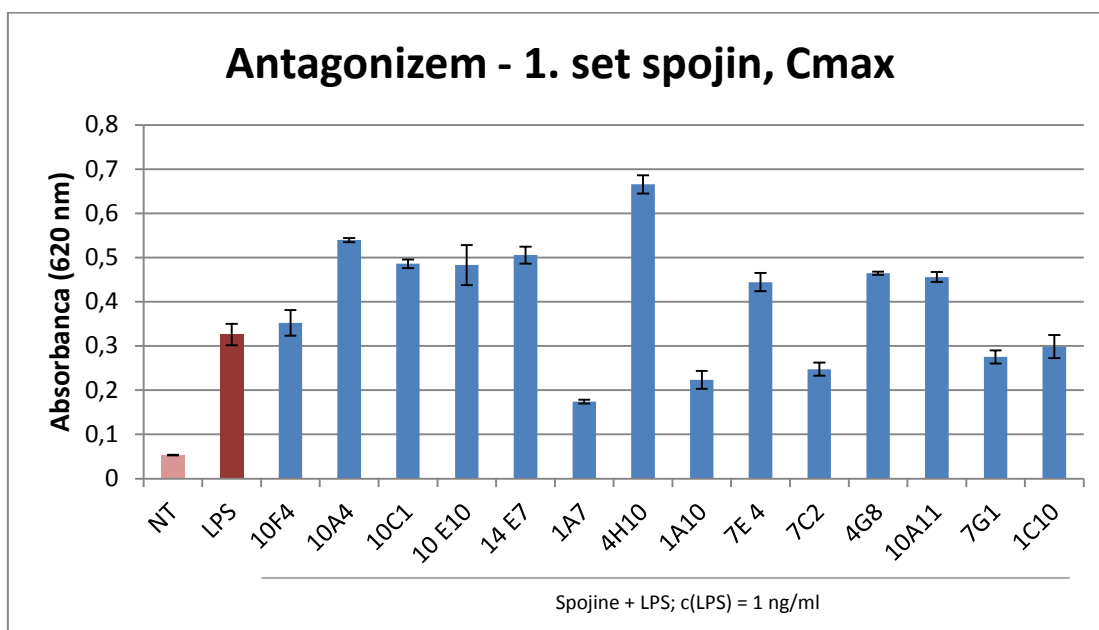
do 10 µg/ml [39]. Mi smo večinoma uporabljali koncentracijo 1 ng/ml, ki je na celični liniji HEK293 že sprožila dober odziv.

Med preskušanjem spojin smo ugotovili, da je zaradi občutljivosti celične linije HEK-Blue™ hTLR4 najboljše, da mikrotitrne plošče po dodajanju celic v vdolbinice dodatno inkubiramo 24 ur, preden jim dodamo spojine. Tako zagotovimo, da se celice lahko nemoteno pritrdijo na podlago in da jih preživi čim več, saj je to zelo pomembno za točnost in primerljivost dobljenih rezultatov.

5.3.1 Test antagonistične aktivnosti spojin

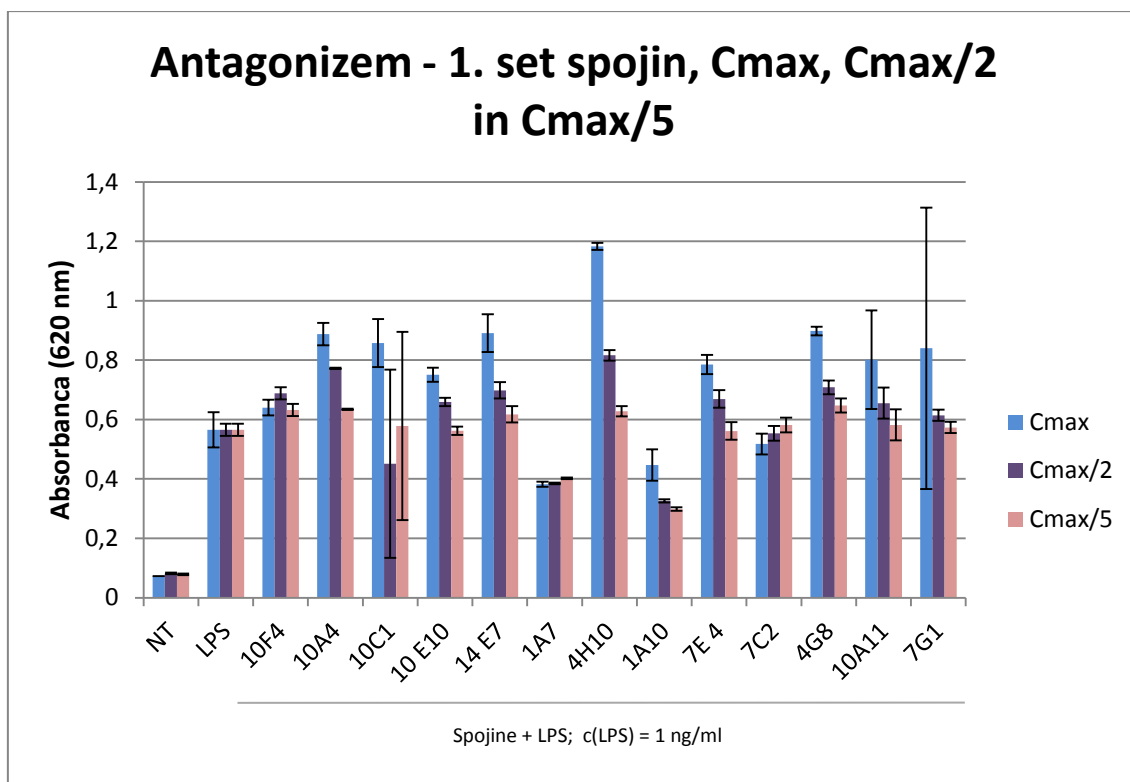
Razmere za ugotavljanje antagonističnega delovanja smo izboljšali z daljšo, šesturno predinkubacijo spojin in celic. Tako smo omogočili dovolj časa, da so spojine lahko zasedle vezavna mesta na receptorju, preden smo dodali LPS. Po inkubaciji celic s spojinami smo za delovanje antagonistične aktivnosti dodali LPS vsem celicam, razen tistim, ki so služile za slepo kontrolo. Celice HEK-Blue™ hTLR4 v mediju, ki so ostale netretirane, smo na Slikah 9 in 10 označili z NT. Negativno kontrolo je predstavljal znani agonist LPS, ki smo ga brez ostalih spojin dodali k celicam v mediju. Na Slikah 9 in 10 smo to označili z LPS. Rezultate testiranja smo prikazali v obliki stolpičnih diagramov.

a) 1. set spojin



Slika 9: Grafični prikaz izmerjenih absorbanc v testu antagonizma za 1. set spojin.

Največjo antagonistično aktivnost so pokazale spojine 1A7 (**8**), 1A10 (**10**) in 7C2 (**12**). Opazimo lahko tudi, da nekatere spojine izkazujejo agonistično aktivnost, saj so njihove absorbance presegle vrednosti kontrole LPS. Z absorbanco, ki je dvakrat večja od kontrolne, najbolj izstopa spojina 4H10 (**9**). Na podlagi teh rezultatov smo se odločili, da bomo vsem spojinam ugotovili tudi agonistično aktivnost.



Slika 10: Grafični prikaz izmerjenih absorbanc v testu antagonizma pri koncentracijah Cmax, Cmax/2 in Cmax/5 za 1. set spojin.

Na Sliki 10 je prikazana absorbanca mikrokultur v prisotnosti posameznih spojin pri njihovi maksimalni, polovični in petinski maksimalni koncentraciji³. Spojine pri nižjih koncentracijah delujejo šibkeje, kar smo tudi pričakovali. Izjemi sta spojini 1A7 (**8**) in 1A10 (**10**), za kateri lahko rečemo, da delujeta enako močno tudi pri polovičnih maksimalnih koncentracijah (50 $\mu\text{mol/l}$ in 100 $\mu\text{mol/l}$).

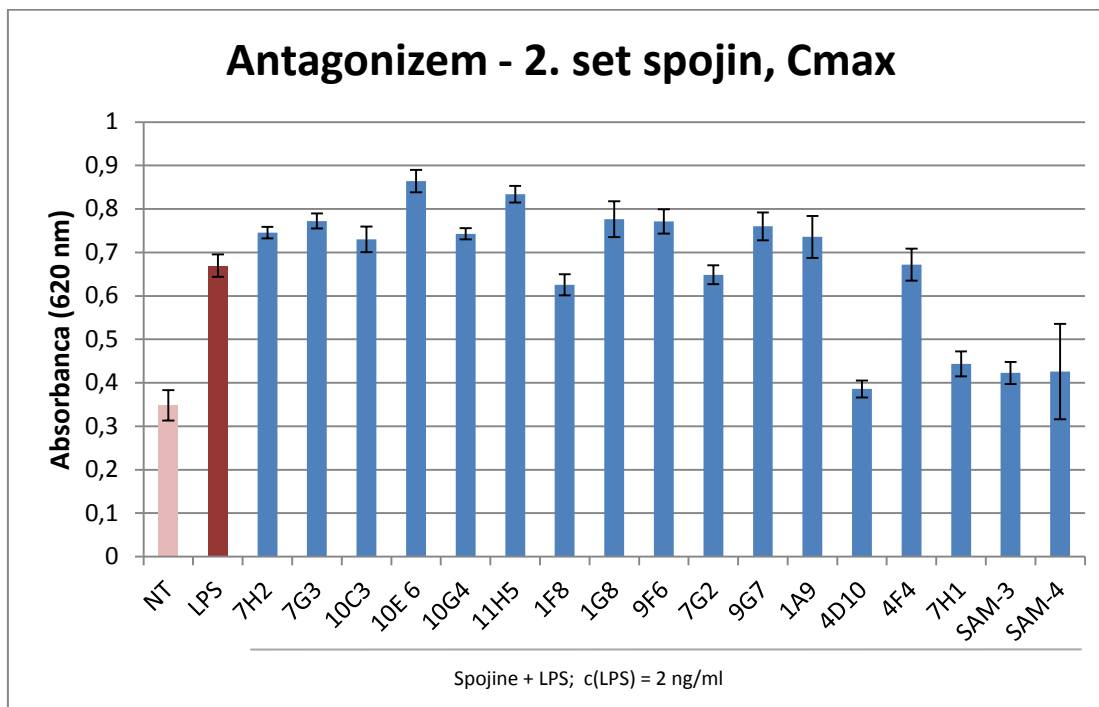
Med vsemi spojinami smo za nadaljnje testiranje in ugotavljanje IC₅₀ izbrali le spojini 1A7 (**8**) in 7C2 (**12**). Za spojino 1A10 (**10**) smo v predhodnih testiranjih ugotovili, da deluje citotoksično in najverjetneje zato izkazuje večji antagonistični učinek, kot bi ga sicer.

³ Spojine 1C10 je zmanjkalo, zato je nismo mogli testirati.

Vrednost IC_{50} pomeni polovično (50-odstotno) inhibitorno koncentracijo spojine. Pove nam, koliko učinkovine potrebujemo, da določen biološki proces ustavimo za polovico. Pogosto jo uporabljamo pri ugotavljanju, kako močan je učinek določenega antagonista [36, 40]. Za ugotavljanje IC_{50} smo spojinam izmerili absorbance pri koncentracijah C_{max} , $C_{max}/2$, $C_{max}/4$, $C_{max}/8$ in tako dalje, vse do $C_{max}/128$. Nato smo mikrotitrne plošče s celicami znova pozorno opazovali z mikroskopom. Ugotovili smo, da pri višjih koncentracijah žal tudi spojin 1A7 (**8**) in 7C2 (**12**) zavirata rast celic. Ko smo testirali citotoksičnost, pa ti spojin nista dali pozitivnih rezultatov. Najverjetnejši razlog za to je, da sta testiranje in inkubacija celic potekali hkrati, in sicer le dva dni, kar je bilo premalo, da bi se celice razrastle tako, kot so se lahko pri testih antagonizma in agonizma, ki sta trajala tri dni. Zato je razumljivo, da pri testu citotoksičnosti nismo tako jasno zaznali zaviranja rasti celic. Na citotoksičnost spojin ni kazala niti barva medija, saj so žive celice poskrbele za spremembo barve iz rožnate v rumeno, kar pomeni porabo hranilnih snovi in zmanjšanje pH vrednosti medija.

Toksične spojine, ki celice pobijejo ali preprečujejo njihovo rast, imajo zaradi zavrte ali zmanjšane metabolne aktivnosti in posledično manjšega izločanja alkalne fosfataze manjšo absorbanco od kontrole (LPS s celicami brez spojin). Kljub temu da spojine sicer morda delujejo nekoliko selektivno antagonistično na TLR4 in preprečujejo delovanje LPS, se moramo zavedati, da je manjšo izmerjeno absorbanco povzročila tudi njihova neselektivna toksičnost in zato niso primerne za nadaljnje študije.

b) 2. set spojin



Slika 11: Grafični prikaz izmerjenih absorbanc v testu antagonizma za 2. set spojin.

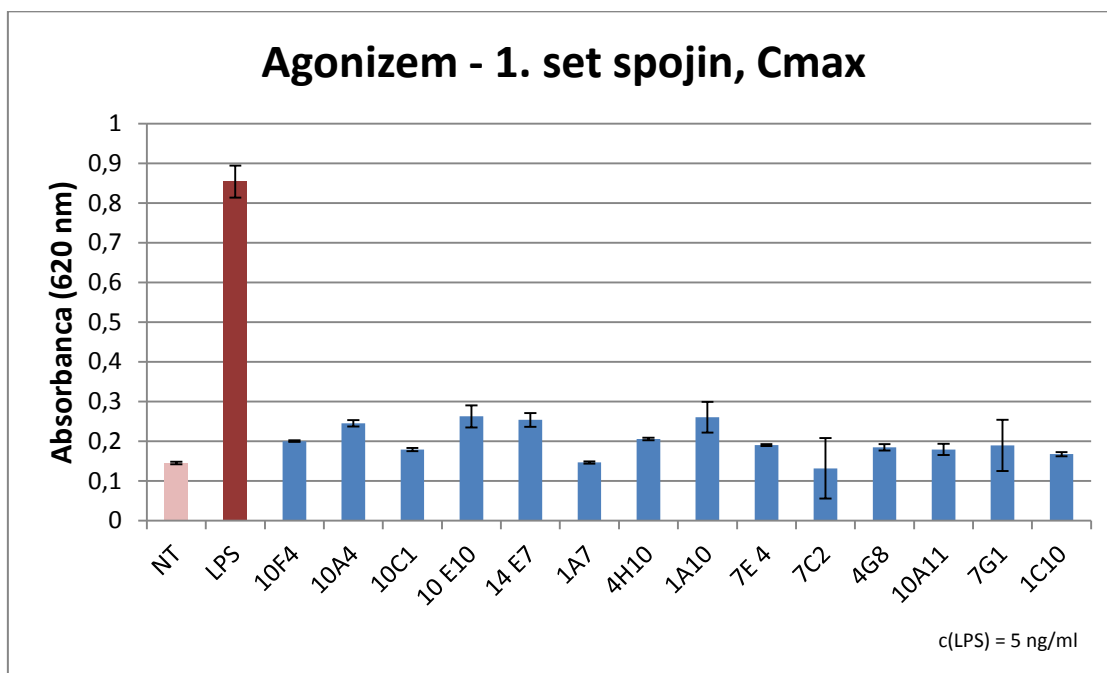
Slika 11 prikazuje rezultate testiranja antagonizma 2. seta spojin. Največjo antagonistično aktivnost so izkazovale spojine 4D10 (**31**), 7H1 (**33**), SAM-3 (**34**) ter SAM-4 (**35**), ki pa so se pri testu citotoksičnosti najslabše odrezale. Največji potencial izmed naštetih ima najverjetneje spojina SAM-4 (**35**), saj smo jo testirali pri koncentraciji, pri kateri je bila maksimalno topna, je pa v primerjavi s preostalimi zelo visoka (250 $\mu\text{mol/ml}$). Možno je, da spojina pri nižjih koncentracijah še vedno deluje, vendar ni več toksična.

Podobno kot pri testiranju antagonizma 1. seta spojin, smo tudi pri testiranju 2. seta opazili, da ima veliko spojin večjo absorbanco kot LPS, kar pomeni, da morda delujejo agonistično na TLR4.

5.3.2 Test agonistične aktivnosti spojin

Test agonistične aktivnosti se je od testa antagonistične aktivnosti razlikoval v tem, da smo izpustili predinkubacijo, LPS pa smo dodali samo v 3 vdolbinice za kontrolo (na Sliki 12 in 13 označeno z LPS), in sicer hkrati z dodajanjem spojin v preostale mikrokulture.

a) 1. set spojin



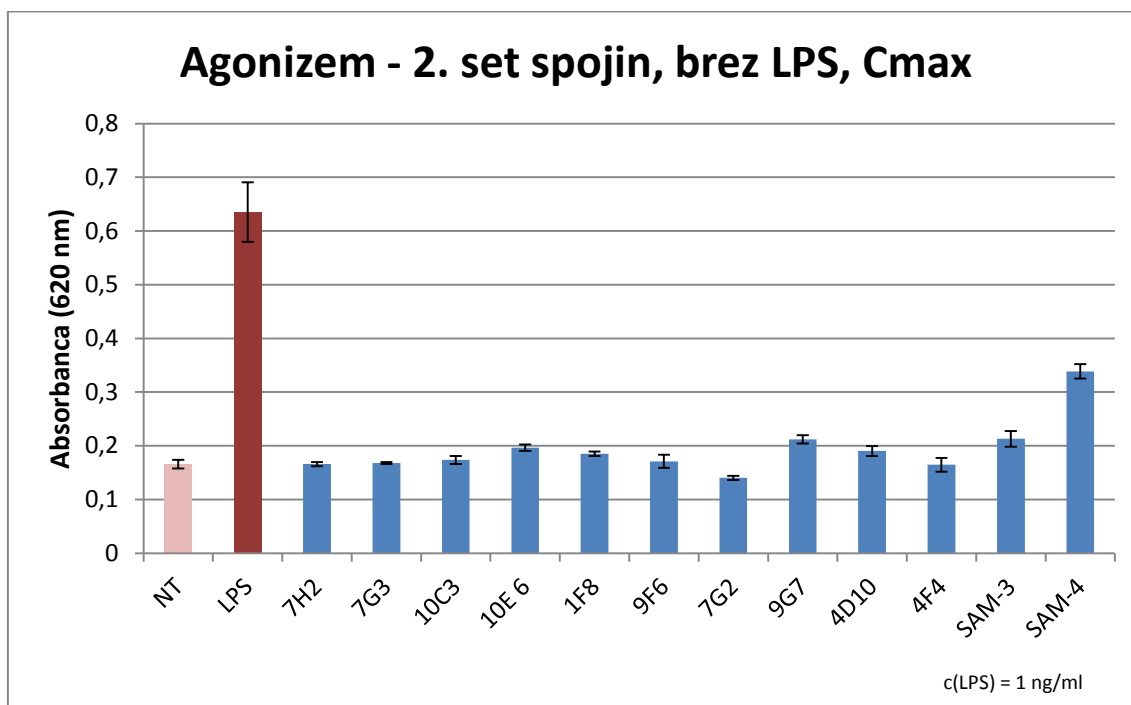
Slika 12: Grafični prikaz izmerjenih absorbanca v testu agonizma za 1. set spojin.

Vidimo, da spojine iz 1. seta delujejo zelo šibko intrinzično oziroma da nekatere med njimi delujejo kot delni agonisti na TLR4. Pri interpretaciji rezultatov se moramo zavedati, da je absorbanca kontrole LPS zelo visoka, ker smo uporabili višjo koncentracijo LPS (5 ng/ml). Testiranje je namreč potekalo, še preden smo koncentracijo LPS znižali na 1 ng/ml, v tem primeru se je vrednost absorbance gibala okrog 0,6. Delovanje spojin si lahko bolje predstavljamo, če primerjamo absorbance njihovih mikrokultur z absorbanco kontrolnih mikrokultur z netretiranimi celicami. Te so največje pri spojinah 10A4 (2), 10E10 (4), 14E7 (7) in 1A10 (10). Tudi pri testiranju antagonističnega delovanja so imele mikrokulture s spojinami 10A4 (2), 10E10 (4) in 14E7 (7) večjo absorbanco, ki je nakazovala na majhno agonistično delovanje. Nasprotno pa je spojina 1A10 (10) v testu antagonističnega delovanja delovala antagonistično. Spojina 1A10 (10) bi lahko imela dvojno delovanje na receptorju, vendar je njena antagonistična aktivnost veliko bolj izražena.

Spojina 4H10 (9), ki je v testu antagonizma izzvala največjo absorbanco, ki je bila dvakrat večja od kontrole LPS, pa je v tem testu delovala le zelo šibko agonistično. Spojina

najverjetneje deluje kot alosterični modulator. To pomeni, da vpliva na delovanje naravnega liganda tako, da se v TLR4 veže na drugo vezavno mesto kot LPS. Take spojine navadno spremenijo konformacijo in okrepijo ali zmanjšajo njegovo delovanje, kar pa je mogoče doseči le s spremembo učinkovitosti ali afinitete LPS do receptorja [36].

b) 2. set spojin



Slika 13: Grafični prikaz izmerjenih absorbanc v testu agonizma za 2. set spojin.

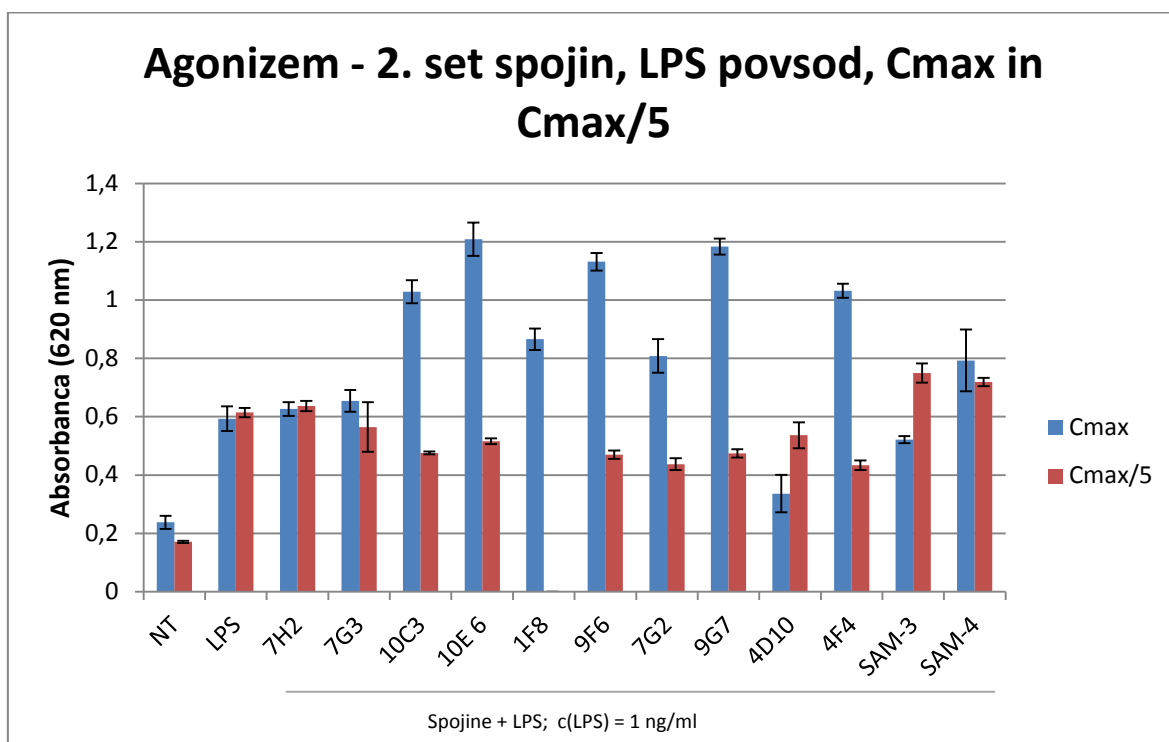
Agonistično delovanje spojin iz 2. seta je bilo v povprečju še slabše od tistega pri spojinah iz 1. seta.⁴ Edina spojina, ki je med testiranimi izstopala, je SAM-4 (**35**). Spojina SAM-4 (**35**) je sicer izkazovala tudi antagonistično aktivnost, vendar je to lahko posledica njene delne citotoksičnosti, ki smo jo zaznali s testom citotoksičnosti. Za več informacij o delovanju SAM-4 (**35**) bi morali opraviti več testov, glede preostalih spojin iz 2. seta pa lahko zaključimo, da ne delujejo agonistično.

Za dodatno testiranje agonistične aktivnosti 2. seta spojin smo se odločili glede na rezultate predhodnega testiranja antagonistične aktivnosti. Tokrat smo LPS dodali v vse

⁴ Spojin 10G4 in 7H1 je zmanjkalo in ju nismo mogli testirati.

mikrokulture že takoj po dodatku spojin. Tako smo preverili, ali spojine delujejo kot alosterični modulatorji.

Rezultate tega testiranja prikazuje Slika 14.⁵



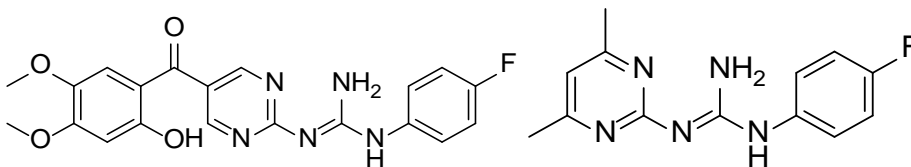
Slika 14: Grafični prikaz izmerjenih absorbanc v testu agonizma z dodatkom LPS, pri koncentracijah Cmax in Cmax/5 za 2. set spojin.

Vidimo, da je pri maksimalnih koncentracijah precej spojin iz 2. seta preseglo kontrolno absorbance celic z LPS, česar pa ne moremo trditi za iste spojine pri koncentracijah Cmax/5. Izjema je bila spojina SAM-3 (**34**), ki pri nižjih koncentracijah očitno ni bila več citotoksična, kljub temu pa je delovala dovolj močno, da smo lahko opazili nekaj njenega agonističnega učinka. Sklepamo torej, da deluje kot delni agonist.

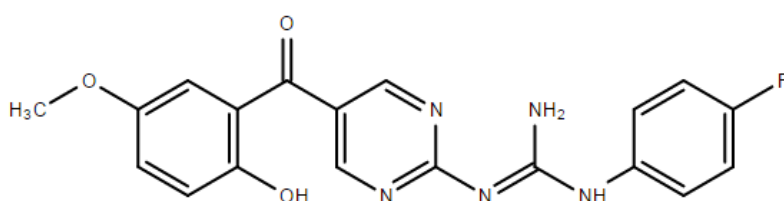
Strukturi spojin SAM-3 (**34**) in SAM-4 (**35**) (Slika 15) smo primerjali s strukturo spojine **3** (Slika 16), o testiranju katere so poročali v članku [23]. Na celično linijo HEK-Blue™ hTLR4 je delovala antagonistično z veliko jakostjo ($IC_{50} = 16,6 \mu\text{mol/l}$). Prav tako je aktivnost izkazovala na mononuklearnih celicah iz periferne krvi in zavirala izločanje TNF- α po njihovi izpostavitvi LPS. Pri spojini **3** je za vezavo na TLR4 najverjetneje bistvenega pomena tvorba vodikovih vezi med gvanidinskim delom spojine in

⁵ Spojine 1F8 je zmanjkalo in njenega delovanja pri Cmax/5 nismo mogli testirati.

aminokislinskimi ostanki Asp-234, Asp-209 in Ser-211, ki so na delu A receptorja TLR4, kar preprečuje vezavo MD-2 nanj [23]. Obe spojini imata enak gvanidinski del kot spojina **3**, ta pa jima verjetno omogoča vezavo na receptor.



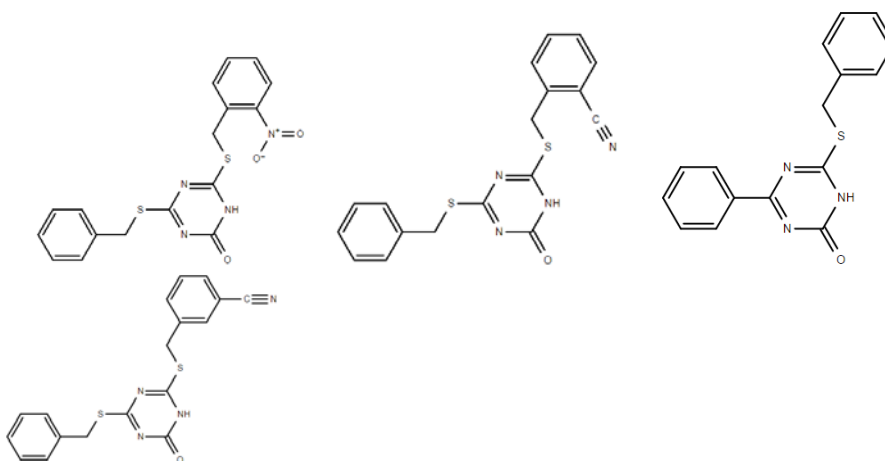
Slika 15: Strukturi spojini SAM-3 (**34**) - levo in SAM-4 (**35**) - desno.



Slika 16: Struktura spojine **3** [23].

Spojina **3** je bila dobro topna v mediju in netoksična. Spojina SAM-3 (**34**) se od spojine **3** razlikuje le v eni dodatni metoksilni skupini na aromatskem obroču, ta pa očitno vpliva na zmanjšanje topnosti, povečanje citotoksičnosti in zmanjšanje njene antagonistične aktivnosti. Spojina SAM-4 (**35**) nima levega aromatskega dela strukture, ima pa dve metilni skupini na pirimidinu. Spojina je kljub manjši možnosti tvorbe vodikovih vezi še vedno zelo dobro topna v mediju, je pa nekoliko bolj citotoksična.

Podobnosti med strukturnimi formulami opazimo tudi pri spojinah 7E4 (**11**), 7C2 (**12**), 7G1 (**16**), 7H2 (**18**), 7G3 (**19**), 7G2 (**27**) in 7H1 (**33**), ki jim je skupen 1,3,5-triazin-2-on, z variacijami na 4. in 6. mestu (Slika 17). Osnovni obroč 1,3,5-triazin-2-on najverjetneje tvori vodikove vezi, ki so nujne za vezavo na TLR4, in ima podobno vlogo kot gvanidinski del v strukturah SAM-3 (**34**) in SAM-4 (**35**).



Slika 17: Strukture spojin: z leve proti desni - 7C2 (**12**), 7G1 (**16**), 7E4 (**11**), 7H1 (**33**).

Če primerjamo spojin 7C2 (**12**) in 7G1 (**16**) iz 1. seta, ugotovimo, da se razlikujeta le v eni funkcionalni skupini na *orto*-mestu aromatskega obroča. Pri 7C2 (**12**) je tam vezana nitro-, pri 7G1 (**16**) pa ciano-skupina. Nitro-skupina v spojin 7C2 (**12**) povzroči boljše afiniteto do receptorja (manjša vrednost K_d), nekoliko večjo citotoksičnost in večjo antagonistično aktivnost, medtem ko ne vpliva na njeno topnost.

Spojina 7E4 (**11**) nasprotno od spojin 7C2 (**12**) in 7G1 (**16**) na *orto*-mestu aromatskega obroča nima nobene funkcionalne skupine, prav tako pa je fenilni obroč na mestu 6 neposredno pripet na triazinski obroč brez metilsulfidnega dela. Te spremembe očitno vplivajo na izgubo njene antagonistične aktivnosti in celo pripomorejo k nekoliko agonističnemu delovanju. Pri tem ni razlik v topnosti, citotoksičnost pa je manjša kot pri spojin 7C2 (**12**) in večja kot pri 7G1 (**16**).

Spojina 7H1 (**33**) ima ciano skupino na *meta*-mestu (pri spojin 7G1 (**16**) je ta na *orto*-mestu). Čeprav smo ugotovili, da spojina 7G1 (**16**) nekoliko zavira rast celične linije HEK293, pa je spojina 7H1 (**33**) bistveno bolj citotoksična, kar verjetno tudi precej vpliva na njeno izkazano antagonistično delovanje.

6. SKLEP

V magistrski nalogi smo uspešno ovrednotili vseh 35 spojin, izbranih z virtualnim rešetanjem interne knjižice spojin, za katere smo dokazali vezavo na molekulo TLR4 z metodo SPR.

Izkazalo se je, da je večina spojin dobro topnih v mediju za gojenje celic, saj smo zaradi slabe topnosti morali iz nadaljnega testiranja izključiti le 4 med njimi. Veliko večji problem je predstavljala citotoksičnost spojin oziroma njihovo zaviranje rasti celic HEK293, ki pa nas, glede na lastnosti preskušanih spojin (majhne, lipofilne molekule), ni zelo presenetila.

Spojin, za katere se je pri testiranju citotoksičnosti izkazalo, da so toksične za celično linijo HEK293, je bilo le nekaj. Izstopale so 4G8 (**14**), 4D10 (**31**), 7H1 (**33**) in SAM-4 (**35**). Kljub temu pa smo pri nadaljnjem testiranju njihovega antagonističnega in agonističnega delovanja s pozornim opazovanjem morfologije celic ugotovili, da tudi nekatere druge spojine zavirajo njihovo rast, na primer 1A7 (**8**), 1A10 (**10**) in 7C2 (**12**). Zato ni presenetljivo, da so se ravno te spojine pri testiranju antagonističnega delovanja izkazale najbolje. Spojine, ki so toksične za celično linijo ali nanjo delujejo zaviralno, zaradi posledično manjšega števila celic v kulturi sprostijo manj SEAP kot neprizadete celice. Rezultate bi tako lahko zmotno interpretirali in ugotovili, da delujejo antagonistično. Tudi če bi omenjene spojine dejansko delovale antagonistično, bi bilo zaradi hkratnega zaviranja rasti celic težko oceniti, ali imajo kakršenkoli potencial za uporabo v terapiji in kolikšen je. Med vsemi testiranimi spojinami ima najverjetneje največji potencial za uporabo spojina SAM-4 (**35**). Njeno delovanje smo namreč testirali pri visoki koncentraciji in ni izključeno, da dobro deluje tudi v nižjih odmerkih, pri katerih ni več citotoksična.

Metoda SPR je bila učinkovita pri iskanju spojin z afiniteto do receptorja TLR4. Vendar afiniteta ni zadostni pogoj, da je neka spojina učinkovit antagonist na TLR4. Ni namreč nujno, da se bo spojina vezala na predvideno aktivno mesto, saj lahko receptor interagirata z ligandi na različnih mestih. Prav tako to ne pomeni nujno, da bo spojina delovala agonistično ali antagonistično, četudi bi se vezala na želeno mesto na receptorju. Že zelo majhne spremembe v strukturi spojine, kot je zamenjava ene same funkcionalne spojine,

lahko povsem spremenijo njene lastnosti in učinke. To smo uspešno pokazali na primeru spojin SAM-3, SAM-4 in spojine 3 [23].

V magistrski nalogi smo tako potrdili, da imajo izbrane testirane spojine afiniteto do receptorja TLR4, na katerega večinoma delujejo kot delni antagonisti ali delni agonisti. Upali smo, da bomo s testiranjem odkrili nove potencialne učinkovine, primerne za zmanjševanje prekomernega imunskega odziva, kar pa nam ni uspelo. V nadaljnjih študijah bi tako morali veliko bolje raziskati tiste spojine, ki v testu citotoksičnosti ne zavirajo rasti uporabljenih celic.

7. LITERATURA

1. Golan, D. E. et al. *Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy*. 3. izdaja. LWW, Philadelphia, 2011; 729 – 739 (Principles of Inflammation and the Immune system)
2. Rang, H. P. et al. *Rang and Dale's Pharmacology*. 8. izdaja. Philadelphia: Churchill Livingstone, Elsevier, 2011; 78 – 89
3. Ihan, A. *Dodatek: Cepiva in imunost*. Dostopno preko: http://www.imi.si/pedagoska-dejavnost/datoteke/Cepljenje_knjiga_2.pdf (31.3.2015)
4. Kaisho, T. in Akira, S. *Toll-like receptors as adjuvant receptors*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, št. 1598; 1-13
5. Akira, S. et al. *Pathogen recognition and innate immunity*. *Cell*, Februar 2006, št. 124; 783-801
6. Hennessy, E. et al. *Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics?* *Nature Reviews Drug Discovery*, April 2010, št. 9; 293-307
7. Matsushima, N. et al. *Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors*. *BMC Genomics*, Maj 2007, 8:124
8. Roach, JC. et al. *The evolution of vertebrate Toll-like receptors*. *Proc. Natl. Acad. Sci, U. S. A.* 2005, št. 102; 9577–9582
9. Botos, I. et. al. *The Structural Biology of Toll-Like Receptors*. *Structure*, April 2011, št. 19; 447–459
10. Slika 1: Prikaz signalizacijskih poti TLR. Dostopno preko: <http://www.nature.com/nri/journal/v13/n6/images/nri3446-f1.jpg> (10.9.2015)

11. Kaisho, T. in Akira, S. *Toll-like receptors as adjuvant receptors*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, št. 1598; 1-13
12. Nijland R. et al. *Recognition of LPS by TLR4: Potential for Anti-Inflammatory Therapies*. *Marine Drugs*, Julij 2014, št. 12; 4260–4273
13. Peri F in Calabrese V. *Toll-like Receptor 4 (TLR4) Modulation by Synthetic and Natural Compounds: An Update*. *Journal of Medicinal Chemistry*, November 2013, št. 57; 3612–3622
14. Slika 2: Dimeriziran kompleks LPS.MD-2.TLR4. Dostopno preko: http://splice-bio.com/wp-content/uploads/2015/07/TLR_4.jpg (10.9.2015)
15. Takeda, K. in Akira, S. *TLR signaling pathways*. *Seminars in Immunology*, Februar 2004, št. 16; 3-9
16. Evropsko javno poročilo o oceni zdravila (EPAR) Aldara, Povzetek. Dostopno prek: http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000179/WC500023123.pdf (11.5.2015)
17. O'Neill, L. *Targeting signal transduction as a strategy to treat inflammatory diseases*. *Nature Reviews Drug Discovery*, Julij 2006, št. 5; 549–563
18. Slika 3: Lipid A. Dostopno preko: http://www.adipogen.com/media/catalog/product/e/_/e._coli-class_of_lipid_a-wide.png (10.9.2015)
19. Slika 3: Eritoran. Dostopno preko: <http://www.drugfuture.com/chemdata/structure/Eritoran.gif> (10.9.2015)
20. H.M. Kim, B.S. Park, J.-I. Kim, S.E. Kim, J. Lee, S.C. Oh, et al. *Crystal structure of the TLR4.MD-2 complex with bound endotoxin antagonist eritoran*. *Cell*(Cambridge, Mass.), 2007, št. 130; 906-917

21. Park, B.S. et al. *The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4.MD-2 complex*. Nature, 2009, št. 458; 1191-1195.
22. Han, J. et al. *Structure-based rational design of a toll-like receptor 4 (TLR4) decoy receptor with high binding affinity for a target protein*. PLoS ONE, 7(2): e30929. doi: 10.1371/journal.pone.0030929
23. Švajger, U. et al. *Novel toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists identified by structure- and ligand-based virtual screening*. European Journal of Medicinal Chemistry, October 2013, št. 70; 393-399
24. Splošne informacije o topilu DMSO, družbe Sigma Aldrich. Dostopno preko: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/SIAL/D5879?lang=en®ion=SI&clid=CjwKEAiA2JqkBRDshIOY_9eMghkSJABvNd1QZQGnOXU4b1eRPDdcgdrxevn3Icc_7-q_2ZqNZOcHBhoCOCDw_wcB (5.7.2015)
25. Graham, F.L. et al. *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. Journal of General Virology, 1977, št. 36; 59-74
26. Lin, YC. et al. *Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations*. Nature Communications, 2014, št. 5, doi: 10.1038/ncomms5767
27. Osnovni podatki ter Technical Data Sheet za celično linijo HEK-Blue™ hTLR4, družbe InvivoGen. Dostopno preko: <http://www.invivogen.com/hek-blue-htlr4> ter http://www.invivogen.com/PDF/HEK_Blue_htlr4_TDS.pdf (5.7.2015)
28. Informacije o celičnih medijih, družbe PAA. Dostopno preko: https://www.brunschwig-ch.com/pdf/downloads/PAA_CellCultureMedia.pdf (5.7.2015)

29. Informacije o FBS, dodatku k celičnemu mediju, družbe PAA. Dostopno preko:
https://www.brunschwig-ch.com/pdf/downloads/PA_Serum_Brochure.pdf (5.7.2015)
30. Technical Data Sheet za antibiotik Normocin™, družbe InvivoGen. Dostopno preko:
http://www.invivogen.com/PDF/Normocin_TDS.pdf (5.7.2015)
31. Informacije o DPBS, družbe Gibco™. Dostopno preko:
<https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/14190250> (5.7.2015)
32. Slika mreže, odtisnjene na Bürker-Türkovi števnici. Dostopno preko:
<http://www.lo-laboroptik.de/englisch/info/buerkert.gif> (5.7.2015)
33. Protokol za uporabo MTS reagenta. Dostopno preko:
<https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/0/celltiter%2096%20aqueous%20one%20solution%20cell%20proliferation%20assay%20system%20protocol.pdf> (5.7.2015)
34. Technical Data Sheet za encimski kolorimetrični test QUANTI-Blue™, družbe InvivoGen. Dostopno preko:
http://www.invivogen.com/PDF/QUANTI_Blue_TDS.pdf (5.7.2015)
35. Informacije o reagentu LPS, družbe Sigma-Aldrich. Dostopno preko:
<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/glycobiology/lipopolysaccharides.html> (5.7.2015)
36. G.L.Patrick: *An introduction to medicinal chemistry*, 4. izdaja, Oxford University press, New York, 2009; 101 – 117
37. Saitoh, S. et al.: *Lipid A antagonist, lipid IVa, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization*. *International Immunology*, junij 2004, št. 16; 961-969

38. Foye, W.O. et. Al. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. 6. izdaja. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2008; 85-98
39. Technical Data Sheet za spojino LPS družbe InvivoGen. Dostopno preko: <http://www.invivogen.com/lps-ek> (27.5.2015)
40. Slika 8: Lipid IVa. Dostopno preko: <http://www.peptide.co.jp/gazo/chem/24006.gif> (10.9.2015)