



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Petra SUŠJAN

**SPREMLJANJE VPLIVA NAČRTOVANIH
PEPTIDOV NA AKTIVACIJO INFLAMASOMA
NLRP3**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Petra SUŠJAN

**SPREMLJANJE VPLIVA NAČRTOVANIH PEPTIDOV NA
AKTIVACIJO INFLAMASOMA NLRP3**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**MONITORING THE EFFECT OF THE DESIGNED PEPTIDES ON
THE ACTIVATION OF THE NLRP3 INFLAMMASOME**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Biotehnologija. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Petra Dovča, za somentorico dr. Ivo Hafner Bratkovič in za recenzenta prof. dr. Gregorja Anderluha.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: izr. prof. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Peter DOVČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: dr. Iva HAFNER BRATKOVIČ
Kemijski inštitut, Laboratorij za biotehnologijo

Član: prof. dr. Gregor ANDERLUH
Kemijski inštitut, Laboratorij za molekularno biologijo in
nanobiotehnologijo,
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Petra Sušjan

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du1
DK UDK 606:61:577.27(043.2)
KG Imunologija/vnetje/inflamasom NLRP3/inhibitorji inflamasoma/peptidni inhibitorji/medproteinske interakcije
AV SUŠJAN, Petra, dipl. bioteh. (UN), Magistrica forenzičnih znanosti
SA DOVČ, Peter (mentor)/HAFNER BRATKOVIČ, Iva (somentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI 2015
IN SPREMLJANJE VPLIVA NAČRTOVANIH PEPTIDOV NA AKTIVACIJO INFILMASOMA NLRP3
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP XI, 71 str., 18 pregl., 29 sl., 59 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Inflamasom NLRP3 je multiproteinski kompleks, ki nastane kot odgovor na različne indikatorje celičnega stresa npr. prisotnost zunajceličnega ATP, mikrobnih komponent in kristalov. Kompleks sestoji iz senzorskega proteina NLRP3, adaptorja ASC in prokaspaze-1, ki se samoaktivira in pretvarja citokinske prekurzorje v njihove zrele oblike. Pri boleznih kot so kriopirinopatije, nevrodegenerativne bolezni in azbestoza je inflamasom NLRP3 pretirano aktiviran bodisi zaradi mutacij v genu NLRP3 bodisi zaradi prisotnosti amiloidnih plak ali kristalov, ki delujejo kot aktivatorji inflamasoma in prispevajo k napredovanju bolezni. Mehanizem aktivacije inflamasoma NLRP3 ostaja pretežno nepojasnjjen, zato ni poznanih veliko tarčnih inhibitorjev inflamasoma NLRP3. Na podlagi kristalnih zgradb proteinov, udeleženih v inflamasomu, in regij NLRP3 s patološkimi mutacijami smo načrtovali dve vrsti kandidatnih peptidnih inhibitorjev sestave inflamasoma NLRP3. Z imunsko-encimskimi testi in z Western prenosom smo pokazali, da nekateri načrtovani peptidi v koncentracijski odvisnosti inhibirajo izločanje IL1 β in aktivacijo kaspaze-1. Nekateri izmed peptidov so specifično inhibirali tvorbo inflamasoma NLRP3 in niso imeli učinka na druge inflamasome. Načrtovani peptidi ponujajo vpogled v mehanizem sestave inflamasoma NLRP3 in predstavljajo osnovo za razvoj novih terapevtskih pristopov k boleznim, v katerih je udeležen inflamasom NLRP3.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ŠD Du1
DK UDK 606:61:577.27(043.2)
KG Immunology/inflammation/NLRP3 inflammasome/inflammasome
inhibitors/peptide inhibitors/protein interactions
AV SUŠJAN, Petra
SA DOVČ, Peter (supervisor)/HAFNER BRATKOVIČ Iva (co-supervisor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology
LI 2015
IN MONITORING THE EFFECT OF THE DESIGNED PEPTIDES ON THE
ACTIVATION OF THE NLRP3 INFLAMMASOME
TD M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
OP XI, 71 p., 18 tab., 29 fig., 59 ref.
IJ sl
JI sl/en
AI NLRP3 inflammasome is a multiprotein complex which forms within cells in response to various triggers e.g. extracellular ATP, microbial components and crystals. The complex consists of a sensor protein NLRP3, adaptor protein ASC and procaspase-1, which self-activates and converts cytokine proforms into their mature forms. In diseases such as cryopyrinopathies, neurodegenerative diseases and asbestosis NLRP3 inflammasome is over-activated either due to the mutations in the gene encoding NLRP3, or due to the presence of amyloid plaques and crystals, that act as inflammasome activators and worsen the prognosis of the disease. The mechanism of the inflammasome activation is poorly understood and inhibitors targeting early steps of the inflammasome assembly are lacking. Based on the available structures of the proteins that comprise the inflammasome and on the NLRP3 regions, carrying pathological mutations we designed two groups of putative inhibitory peptides. Using immunoenzymatic tests and Western blotting we showed that several of the designed peptides inhibit the release of IL1 β and the activation of caspase-1 in a concentration-dependent manner. Furthermore, we found that some of the peptides specifically inhibited the NLRP3 inflammasome and not other inflammasomes. Designed peptides provide an insight into the mechanism of NLRP3 inflammasome assembly as well as the basis for the development of novel therapies of diseases connected to NLRP3 overactivation.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 OZADJE.....	1
1.2 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.3 CILJI NALOGE	2
1.4 HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 INFLAMASOM	3
2.1.1 Potek inflamasoma	3
2.1.2 Mehanizmi aktivacije inflamasoma NLRP3	4
2.1.3 Zgradba proteinov inflamasoma NLRP3	5
2.1.4 Interakcije med proteini inflamasoma NLRP3.....	6
2.1.5 Drugi inflamasomi	8
2.2 MEHANIZMI INHIBICIJE INFLAMASOMA NLRP3	9
2.2.1 Vzgibi za iskanje inhibitorjev inflamasoma NLRP3	9
2.2.2 Inhibicija inflamasoma NLRP3 z endogenimi inhibitorji	10
2.2.2.1 Proteini POP in COP	10
2.2.2.2 Protein SHP	11
2.2.3 Inhibicija inflamasoma NLRP3 z mikrobnimi proteini.....	11
2.2.4 Inhibicija inflamasoma NLRP3 z metaboliti in majhnimi molekulami	13
2.3 INHIBICIJA INFLAMASOMA NLRP3 S PEPTIDNIMI INHIBITORJI.....	14
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 MATERIALI.....	16
3.1.1 Laboratorijska oprema in potrošni material	16
3.1.2 Kemikalije	17
3.1.3 Raztopine in pufri.....	17
3.1.4 Protitelesa	18
3.1.5 Sintetični peptidi	18
3.1.6 Celične kulture.....	18
3.2 METODE	19
3.2.1 Načrtovanje peptidov	19

3.2.2 Sterilizacija pripomočkov in sterilno delo.....	19
3.2.3 Delo s celičnimi kulturami	19
3.2.3.1 Gojenje celic	19
3.2.3.2 Redčenje celic.....	20
3.2.3.3 Zamrzovanje celic.....	20
3.2.3.4 Odmrzovanje celic.....	21
3.2.3.5 Nacepljanje celic za eksperimente.....	21
3.2.4 Priprava peptidov	22
3.2.5 Spremljanje vpliva peptidov na izločanje citokinov pri inflamasomih	22
3.2.5.1 Sprožitev prvega signala aktivacije inflamasoma	22
3.2.5.2 Inkubacija celic s peptidi	23
3.2.5.3 Sprožitev drugega signala aktivacije inflamasoma	23
3.2.5.4 Določanje koncentracije citokinov	24
3.2.6 Spremljanje vpliva peptidov na aktivacijo kaspaze-1 pri inflamasomih	
NLRP3 in AIM2.....	25
3.2.6.1 Obarjanje proteinov	25
3.2.6.2 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata	25
3.2.6.3 Western prenos na membrano	26
3.2.6.4 Detekcija proteinov.....	26
3.2.7 Spremljanje vpliva peptidov na signalno pot NFκB	27
3.2.7.1 Določanje koncentracije TNF α	27
3.2.7.2 Uporaba rekombinantnih makrofagov RAW-Blue v kombinaciji s substratom QUANTIBlue	27
3.2.7.3 Z luciferaznim testom na transficiranih celicah HEK293T	28
3.2.8 Spremljanje preživelosti celic	29
4 REZULTATI.....	30
4.1 NAČRTOVANJE PEPTIDOV	30
4.1.1 Izbira peptidov.....	30
4.1.2 Peptidi iz interakcijskih regij proteinov inflamasoma	31
4.1.3 Peptidi iz regij NLRP3 s patološkimi mutacijami	34
4.1.4 Opremljanje peptidov	36
4.2 PEPTIDI IZ INTERAKCIJSKIH REGIJ INFLAMASOMA NLRP3	37
4.2.1 Spremljanje vpliva peptidov na sestavljanje inflamasoma NLRP3.....	37
4.2.1.1 Spremljanje količine izločenih citokinov	37
4.2.1.2 Spremljanje aktivacije kaspaze-1	44
4.2.2 Spremljanje vpliva peptidov na signalno pot NFκB	45
4.2.3 Spremljanje vpliva peptidov na inflamasoma AIM2.....	47
4.2.4 Spremljanje vpliva peptidov na preživelost celic	49
4.3 PEPTIDI IZ REGIJ NLRP3 S PATOLOŠKIMI MUTACIJAMI.....	50

4.3.1 Spremljanje vpliva peptidov na sestavljanje inflamasoma NLRP3.....	50
4.3.1.1 Spremljanje količine izločenih citokinov	50
4.3.2 Spremljanje vpliva peptidov na signalno pot NFκB	55
4.3.3 Spremljanje vpliva peptidov na inflamasom AIM2	56
4.3.4 Spremljanje preživelosti celic	57
5 RAZPRAVA.....	58
5.1 ŽELENE LASTNOSTI PEPTIDNIH INHIBITORJEV	58
5.2 INHIBITORNI POTENCIJAL NAČRTOVANIH PEPTIDOV	59
5.3 VPLIV EKSPERIMENTALNIH POGOJEV NA INHIBITORNI POTENCIJAL PEPTIDOV	60
5.4 NADALJNJE DELO	61
6 SKLEPI	62
7 POVZETEK.....	63
8 VIRI	65

KAZALO SLIK

Slika 1: Sestavljanje inflamasoma.....	4
Slika 2: Interakcije PYD-PYD in CARD-CARD med proteini znotraj inflamasoma NLRP3.....	7
Slika 3: Inflamasomski kompleks	7
Slika 4: Sestava inflamasomov NLRP3, AIM2 in NLRC4	9
Slika 5: Kemijska struktura šikonina.....	13
Slika 6: Princip zaznave antigena pri testu ELISA.....	25
Slika 7: Princip delovanja testa QUANTIBlue	27
Slika 8: Grafični prikaz vezavnih tarč kandidatnih peptidnih inhibitorjev	30
Slika 9: Struktura domene PYD proteina NLRP3 (zgoraj) in struktura ASCa (spodaj) ..	33
Slika 10: Peptid opremljen z miristinsko skupino	36
Slika 11: Vpliv peptida P1 na koncentracijo izločenega IL1 β (zgoraj) in IL18 (spodaj)....	38
Slika 12: Vpliv peptida P2 na koncentracijo izločenega IL1 β (zgoraj) in IL18 (spodaj)....	39
Slika 13: Vpliv peptida P3 na koncentracijo izločenega IL1 β (zgoraj) in IL18 (spodaj)....	40
Slika 14: Vpliv peptida P4 na koncentracijo izločenega IL1 β (zgoraj) in IL18 (spodaj)....	42
Slika 15: Vpliv peptidov iz interakcijskih regij inflamasoma na koncentracijo IL1 β na celicah BMDM	43
Slika 16: Vpliv peptidov iz interakcijskih regij na aktivacijo kaspaze-1	44
Slika 17: Vpliv peptidov iz interakcijskih regij na pot NF κ B na makrofagih RB (zgoraj) in na celicah HEK293 (spodaj).....	45
Slika 18: Vpliv peptidov iz interakcijskih regij na koncentracijo TNF α	47
Slika 19: Vpliv peptidov iz interakcijskih regij na inflamasom AIM2	48
Slika 20: Vpliv peptidov iz interakcijskih regij na metabolno aktivnost celic	49
Slika 21: Vpliv peptida P7 na koncentracijo izločenega IL1 β	51
Slika 22: Vpliv peptida P8 na koncentracijo izločenega IL1 β	51
Slika 23: Vpliv peptida P9 na koncentracijo izločenega IL1 β	52
Slika 24: Vpliv peptida P10 na koncentracijo izločenega IL1 β	52
Slika 25: Vpliv peptida P11 na koncentracijo izločenega IL1 β	53
Slika 26: Vpliv peptida P12 na koncentracijo izločenega IL1 β	54
Slika 27: Vpliv peptidov iz regij NLRP3 s patološkimi mutacijami na pot NF κ B na makrofagih RB	55
Slika 28: Vpliv peptidov iz regij NLRP3 s patološkimi mutacijami na inflamasom AIM2	56
Slika 29: Vpliv peptidov iz regij NLRP3 s patološkimi mutacijami na metabolno aktivnost celic.....	57

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Pregled inhibitorjev inflamasoma NLRP3	14
Preglednica 2: Uporabljena laboratorijska oprema in potrošni material	16
Preglednica 3: Uporabljeni kemikaliji.....	17
Preglednica 4: Uporabljeni raztopine in pufri.....	17
Preglednica 5: Uporabljena protitelesa.....	18
Preglednica 6: Uporabljeni peptidi	18
Preglednica 7: Uporabljeni celične kulture.....	18
Preglednica 8: Pogoji gojenja uporabljenih celic	20
Preglednica 9: Primeri redčenja celic	20
Preglednica 10: Parametri nacepljanja celic za eksperimente	21
Preglednica 11: Parametri priprave peptidov in inkubacije s peptidi	23
Preglednica 12: Parametri priprave aktivatorjev in inkubacije z aktivatorji	24
Preglednica 13: Količine komponent za prehodno transfekcijo celic HEK293T	28
Preglednica 14: Kandidatni peptidni inhibitorji iz interakcijskih regij inflamasoma in njihove domnevne tarče.....	34
Preglednica 15: Biokemijske lastnosti kandidatnih peptidnih inhibitorjev iz interakcijskih regij inflamasoma	34
Preglednica 16: Kandidatni peptidni inhibitorji iz regij NLRP3 s patološkimi mutacijami in njihove domnevne tarče.....	35
Preglednica 17: Biokemijske lastnosti kandidatnih peptidnih inhibitorjev iz regij NLRP3 s patološkimi mutacijami.....	36
Preglednica 18: Izvedba raziskave	59

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

%	Odstotek
*	Krat
A	Absorbanca
Angl.	Angleško
AP	Alkalna fosfataza (angl. <i>Alkaline Phosphatase</i>)
APS	Amonijev persulfat (angl. <i>Ammonium persulphate</i>)
ASC	Angl. <i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
ATP	Adenozin trifosfat (angl. <i>Adenosine triphosphate</i>)
BMDM	Makrofagi iz kostnega mozga (angl. <i>Bone marrow derived macrophages</i>)
CAPS	Periodični vročinski sindromi v povezavi s kriopirinom (angl. <i>Cryopyrin-associated periodic syndromes</i>)
COP	Angl. <i>CARD-only protein</i>
DD	Domena smrti (angl. <i>Death domain</i>)
DMSO	Dimetil sulfoksid (angl. <i>Dimethyl sulfoxide</i>)
DNA	Deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Etilendiamintetraocetna kislina (angl. <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ELISA	Imunsko-encimski test (angl. <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>)
FBS	Fetalni goveji serum (angl. <i>Fetal bovine serum</i>)
Fc	Regija Fc (angl. <i>Fragment crystallizable region</i>)
FCAS	Družinski avtoinflamatorni sindrom povzročen z mrazom (angl. <i>Familial cold autoinflammatory syndrome</i>)
H	Vijačnica (angl. <i>Helix</i>)
HEK293	Celična linija iz ledvic človeškega zarodka (angl. <i>Human embryonic kidney</i>)
IKK	Kinaza IκB (angl. <i>IκB kinase</i>)
IL	Interlevkin (angl. <i>Interleukin</i>)
KSAH	Angl. <i>Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus</i>
LPS	Lipopolisaharid (angl. <i>Lipopolysaccharide</i>)
LRR	Z levcinom bogate ponovitve (angl. <i>Leucin-rich repeats</i>)
MQ	Dodatno očiščena deionizirana voda (angl. <i>Milli-Q</i>)
MWS	Muckle-Wellsov sindrom (angl. <i>Muckle-Wells syndrome</i>)
NAD	Angl. <i>NACHT-associated domain</i>
NaDS	<u>N</u> atrijev <u>dodecil</u> <u>sulfat</u>
NAIP	Angl. <i>Neuronal apoptosis inhibitory protein</i>

NBD	Angl. <i>Nucleotide binding domain</i>
NFκB	Transkripcijski jedrni faktor - κB (angl. <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NLR	NOD-u podobni receptor (angl. <i>NOD-like receptor</i>)
NLRP3	Angl. <i>NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3</i>
NMR	Jedrska magnetna resonanca (angl. <i>Nuclear magnetic resonance</i>)
NOMID	Multisistemska bolezen z začetkom pri novorojenčku (angl. <i>Neonatal onset multisystem inflammatory disease</i>)
PAGE	Poliakrilamidna gelska elektroforeza (angl. <i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PAMP	Molekulski vzorci, značilni za patogene mikroorganizme (angl. <i>Pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBS	Fosfatni pufer s soljo (angl. <i>Phosphate buffered saline</i>)
PMS	Fenazin metosulfat (angl. <i>Phenazine methosulfate</i>)
POP	Angl. <i>Pyrin-only protein</i>
RB	Komercialno ime rekombinantnih makrofagov (angl. <i>RawBlue</i>)
RFU	Relativne fluorescenčne enote (angl. <i>Relative fluorescence units</i>)
ROS	Reaktivne kisikove zvrsti (angl. <i>Reactive oxygen species</i>)
SHP	Angl. <i>Small heterodimer partner</i>
TEMED	N,N,N,N-tetrametil-etylendiamin
TNF	Dejavnik tumorske nekroze (angl. <i>Tumor necrosis factor</i>)
TRIS	Tris (hidroksimetil)-aminometan
vrt./min	Vrtljaji na minuto
XTT	2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolni-5-karboanilid

1 UVOD

1.1 OZADJE

Iskanju terapevtikov za zdravljenje bolezni kot so Alzheimerjeva bolezen, sladkorna bolezen tipa II, putika in ateroskleroza se v biomedicinskih raziskavah posveča čedalje večja pozornost predvsem zaradi naraščanja starajoče se populacije, ki je najbolj dovetna za tovrstne bolezni in zaradi velikega družbeno-ekonomskega bremena, ki ga predstavlja zdravljenje in nega bolnikov. Številne študije poročajo, da v patofiziološkem ozadju teh navidez popolnoma različnih bolezni tiči skupen dejavnik – aktiviran inflamasom NLRP3. Inflamasom NLRP3 je multiproteinski kompleks, ki se običajno sestavlja znotraj mieloidnih celic kot odziv na vdor patogenov v organizem in preko encima kaspaze-1 sproži zorenje glavnega proinflamatornega citokina IL1 β . Inflamasom NLRP3 je običajno nepogrešljiv obrambni mehanizem organizma, ki je sposoben učinkovito zatreći infekcijo. Pri zgoraj omenjenih boleznih in pri nekaterih boleznih, ki so posledica mutacij v genu za NLRP3 (periodični vročinski sindromi v povezavi s kriopirinom) pa je inflamasom NLRP3 aktiviran v sterilnem stanju in prispeva k napredovanju bolezni, zato je aktualno iskanje ustreznih inhibitorjev tega inflamasoma.

1.2 OPREDELITEV PROBLEMA

Večina znanih inhibitorjev inflamasoma NLRP3 zavira pozne stopnje v procesu sestavljanja inflamasoma NLRP3, saj so ti mehanizmi razmeroma dobro poznani. Inhibicija inflamasoma NLRP3 v poznejših stopnjah njegovega sestavljanja je problematična, saj poleg inflamasoma NLRP3 obstajajo tudi drugi inflamasomi, ki se v poznejših stopnjah sestavlajo na podoben način kot inflamasom NLRP3, niso pa udeleženi v patofiziologijo bolezni. Obstojeci inhibitorji inflamasoma NLRP3 torej inhibirajo tudi druge inflasome, s tem pa zmanjšujejo specifičnost zdravljenja in povzročajo imunokompromitiranost bolnikov. Glede na to, da se inflasomi med seboj razlikujejo v načinu aktivacije, je smiseln tarče za inhibicijo iskati na tej, zgodnejši stopnji sestavljanja inflamasoma, vendar mehanizmi, po katerih stresne molekule aktivirajo inflamasom NLRP3, ostajajo pretežno neraziskani. Iz tega razloga terapevtiki, ki bi zavirali sestavljanje inflamasoma NLRP3 v njegovih zametkih, še niso v uporabi.

1.3 CILJI NALOGE

Vodilna ideja pričajoče magistrske naloge je zasnovati inovativne peptidne inhibitorje, ki bi specifično inhibirali zgodnje stopnje sestavljanja inflamasoma NLRP3. V ta namen smo zasnovali dve vrsti peptidov: peptide, ki posnemajo motive iz interakcijskih regij proteinov inflamasoma in peptide, ki posnemajo regije NLRP3, kjer se pojavljajo patološke mutacije, ki povzročajo periodične vročinske sindrome v povezavi s kriopirinom.

Cilj naloge je bil izmed kandidatnih peptidnih inhibitorjev identificirati tiste, ki inhibirajo inflamasom NLRP3. To smo želeli pokazati na ravni izločenih citokinov IL1 β , IL18 in encima kaspaze-1. Zanimalo nas je tudi, kateri peptidi specifično inhibirajo inflamasom NLRP3 in če izkazujejo kakšen vpliv na signalno pot NF κ B.

1.4 HIPOTEZE

Delovne hipoteze te raziskave so bile:

- Peptidi iz regij, kjer prihaja do interakcij med proteini inflamasoma, bodo inhibirali sestavljanje inflamasoma NLRP3 (tvorbo aktivne kaspaze-1 in proizvodnjo IL-1 β).
- Peptidi iz regij NLRP3, kjer se pojavljajo patološke mutacije, bodo bodisi aktivirali inhibirali ali pa ne bodo imeli vpliva na aktivacijo inflamasoma NLRP3.

2 PREGLED OBJAV

2.1 INFLAMASOM

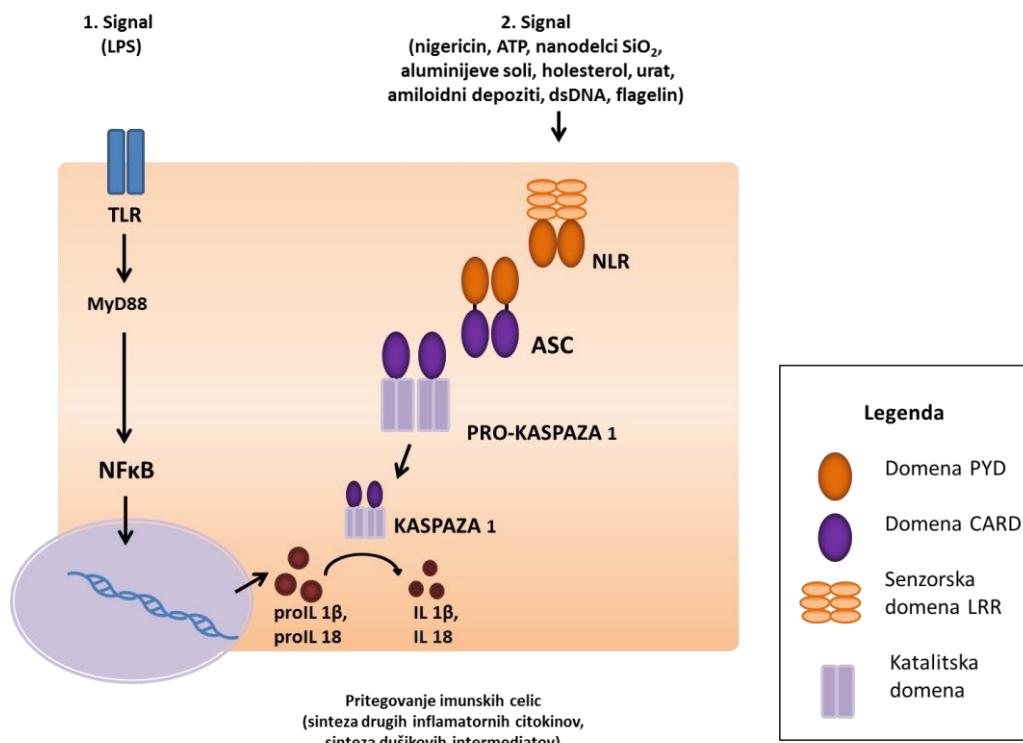
2.1.1 Potek inflamasoma

Inflamasom je kompleks več proteinov, ki se sestavi v mieloidnih in drugih celicah ob prisotnosti indikatorjev celičnega stresa kot so ekstracelularni ATP, bakterijski toksini ali kristali. Sestavljen je iz senzorskega proteina NLR (angl. *NOD-like receptor*), iz adaptorskega proteina ASC (angl. *Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) in iz prekurzorja katalitskega proteina kaspaze-1 (Schroder in Tschopp, 2010).

Tvorjenje inflamasomskega kompleksa je pogojeno z dvema signaloma (Gross in sod., 2011). Prvi signal predstavlja aktivacija Toll-u podobnih receptorjev (TLR, angl. *Toll-like receptors*), ki jo sprožijo različni molekulski vzorci, značilni za patogene mikroorganizme (PAMP, angl. *Pathogen-associated molecular patterns*). Preko TLR se aktivira transkripcijski faktor NF κ B, ki sproži prepisovanje citokinskih prekurzorjev proIL1 β in proIL18. Hkrati se sproži tudi prepisovanje NLR, prvega člena v sestavi inflamasoma, ki zaznava indikatorje celičnega stresa in druge aktivatorje inflamasoma. Zaznava teh molekul predstavlja drugi signal, potreben za aktivacijo inflamasoma (Slika 1).

Ob prisotnosti obeh signalov pride do zaporedne interakcije in oligomerizacije več proteinov, ki se povežejo v inflamasom (Lu in sod., 2014). Senzorski protein NLR se poveže z adapterjem ASC, ta pa s prokaspazo-1. Aktivna kaspaza-1 nastane iz prokaspaze-1 (45kDa), in sicer z avtokatalitsko odcepitvijo in povezavo dveh domen p10 (10kDa) in dveh domen p20 (20kDa) v tetramer. Kaspaza-1 nato cepi citokinske prekurzorje proIL1 β (31 kDa) in proIL18 v njune zrele različice IL1 β (17 kDa) in IL18 (18 kDa) (Slika 1). Citokini se izločajo iz celic in zunaj celice preko specifičnih receptorjev potencirajo vnetje s pritegovanjem imunskih celic na mesto vnetja (Dinarello, 2005).

Obstaja več vrst inflamasomov, ki se med seboj razlikujejo po tipu senzorskega proteina in udeležbi proteina ASC v inflamasomski verigi. V tej magistrski nalogi se osredotočamo na inflamasom NLRP3 s senzorskim proteinom NLRP3 (angl. *NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3*), ki je najbolj raziskan in za katerega je poznanih tudi največ aktivatorjev.



Slika 1: Sestavljanje inflamasoma

2.1.2 Mehанизmi aktivacije inflamasoma NLRP3

Nabor različnih molekul, ki lahko aktivirajo inflamasom NLRP3, vztrajno raste, neznano pa ostaja, po kakšnem ključu jih senzorski protein NLRP3 zaznava. Aktivatorje inflamasoma NLRP3 lahko po kemijskih lastnostih razdelimo na vodotopne in partikularne. Med topne sodijo nigericin (Mariathasan in sod., 2006), ATP (Perregaux in Gabel, 1994), imidazokvinolin (Muruve in sod., 2008) in reaktivne kisikove zvrsti (ROS, angl. *Reactive oxygen species*) (Cruz in sod., 2007) med partikularne pa kristali aluminijevih soli (Hornung in sod., 2008), urata (Martinon in sod., 2006), azbesta (Dostert in sod., 2008) in holesterola (Duewell in sod., 2010), nanodelci SiO₂ (Hornung in sod., 2008) ter amiloidne plake (Halle in sod., 2008). Poleg topnosti se aktivatorji med seboj razlikujejo tudi po izvoru in funkciji, večini pa je skupno, da so indikatorji celičnega stresa (Rathinam in sod., 2012). Prisotnost zunajceličnega ATP je na primer indikator poškodbe celic in tkiv, kristali in proteinski agregati v telesu pa so pogosto povezani z bolezenskim stanjem, npr. putiko ali Alzheimerjevo boleznijo v primeru kristalov urata in amiloidnih plakov, azbestozo v primeru azbesta oz. hiperholesterolemijo v primeru holesterolnih kristalov.

Predlaganih je bilo več različnih mehanizmov aktivacije inflamasoma. Najpreprostejši mehanizem predpostavlja zaznavo aktivatorja preko direktne vezave na senzorsko regijo proteina NLRP3 (Gross in sod., 2011). Tak je namreč standardni model zaznave pri receptorjih, ki vsebujejo regijo, bogato z levcinskimi ponovitvami (LRR, angl. *Leucine-rich repeats*), med katere spada tudi NLRP3. Ta model težko pojasni veliko fizikalno in kemijsko raznovrstnost aktivatorjev inflamasoma NLRP3. Bolj verjetno je, da inflamasom NLRP3 aktivira nek citoplazemski intermediat, ki se sintetizira kot splošni odziv na različne aktivatorje (Hornung in sod., 2008). Primer takšnega intermediata so ROS, za katere so ugotovili, da se pri aktivaciji inflamasoma NLRP3 z večino aktivatorjev v citosolu nahajajo v povečani koncentraciji (Cruz in sod., 2007, Dosert in sod., 2008). ROS v citosolu so indikatorji metabolnega stresa celice, ki lahko nastopi zaradi okužbe, zaradi poškodbe celice ali pa zaradi akumulacije okvarjenih mitohondrijev, ki poleg tega, da generirajo ROS, v citoplazmo sproščajo še en aktivator inflamasoma NLRP3 - mitohondrijsko DNA. Strateška lokacija NLRP3 v bližini mitohondrijev nakazuje, da bi NLRP3 lahko zaznaval ROS, vendar točen mehanizem zaznave ostaja nepojasnjen. (Zhou in sod., 2011).

Po drugem predlaganem mehanizmu naj bi topni aktivatorji inflamasoma NLRP3 povzročili izstop kalija iz celice, kar naj bi aktiviralo inflamasom NLRP3. Muñoz-Planillo in sod. (2013) so namreč pokazali, da je znižanje količine kalija v citosolu zadosten pogoj za aktivacijo NLRP3 tudi ob odsotnosti aktivatorjev. Izstop kalija iz citoplazme lahko povzročijo bakterijski ionofori, kot je nigericin, ki tvorijo pore na celični membrani ali ekstracelularni ATP preko kationskega kanala P2X7. Ni povsem jasno ali NLRP3 zaznava kalijeve ione direktno ali pa nizka koncentracija kalija v citosolu spremeni intracelularno okolje in s tem povzroči spremembo v konformaciji NLRP3 (Rathinam in sod., 2012).

Tretja teorija sloni na raziskavi Hornunga in sod. (2008) in pojasnjuje mehanizem aktivacije inflamasoma NLRP3 preko partikularnih aktivatorjev oz. kristalov. Pokazali so, da NLRP3 ne zaznava kristalne oz. proteinske strukture direktno, temveč ga aktivira poškodba lizosomov. Celice namreč kristale fagocitirajo, ti pa povzročijo otekanje in poškodbo fagolizosomov, pri čemer se v citoplazmo sprostijo lizosomalne proteaze kot je katepsin B in nekako aktivirajo NLRP3. Po tej teoriji bi moral biti v citosolu prisoten nek substrat za katepsin B, ki v cepljeni obliki aktivira inflamasom, vendar ga doslej še niso identificirali (Rathinam in sod., 2012).

2.1.3 Zgradba proteinov inflamasoma NLRP3

Protein NLRP3, ki ima senzorsko vlogo v inflamasomu NLRP3, je sestavljen iz regije LRR, oligomerizacijske domene NACHT oz. NBD (angl. *Nucleotide binding domain*) in

interakcijske domene PYD. Adaptor ASC, ki predstavlja interakcijski most med NLRP3 in prokaspazo-1, je sestavljen iz dveh interakcijskih domen - PYD in CARD. Prokaspaza-1 je sestavljena iz interakcijske domene CARD in katalitske domene, ki se odcepi kot kaspaza-1 in katalizira aktivacijo citokinov. Poleg vloge v inflamasomu ima pomembno vlogo tudi v procesih piroptoze in apoptoze (Schroder in Tschoop, 2010).

Vsi proteini, ki sestavljajo inflamasom NLRP3, so v neaktivnem stanju v celici prisotni kot monomeri, ob prisotnosti aktivatorjev inflamasoma pa oligomerizirajo. V izogib spontanim interakcijam in oligomerizaciji so proteini inflamasoma v neaktiviranem stanju prostorsko ločeni. NLRP3 se nahaja v endoplazmatskem retikulumu, ASC pa v celičnem jedru (Bryan in sod., 2009). Inflamasom se sestavlja v perinuklearnem prostoru, med mitohondriji in endoplazmatskim retikulumom. Pred aktivacijo inflamasoma je torej potrebna translokacija proteinov NLRP3 in ASC v perinuklearni prostor (Misawa in sod., 2013). Nekatere študije kažejo, da kompartmentalizacija poteka tudi na stopnji sinteze citokinov (Dinarello in sod., 2005). Citokinski prekurzorji naj bi se skupaj s kaspazo-1 zapakirali v sekretorne lisosome, kjer se zgodi cepitev v zrele citokine. Ti naj bi se nato iz mieloidnih celic izločali z eksocitozo.

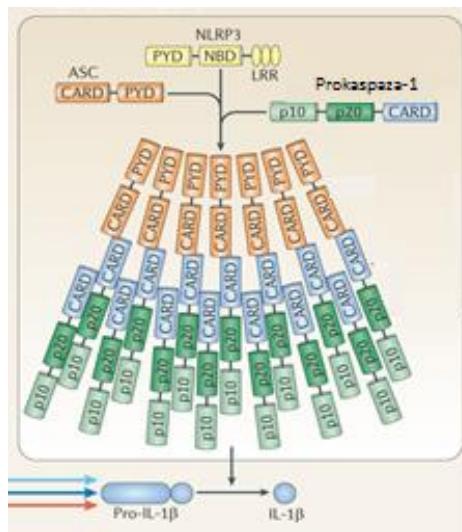
2.1.4 Interakcije med proteini inflamasoma NLRP3

Proteini se v inflamasom povezujejo preko homotipnih interakcij med domenami PYD ali CARD (Lu in sod., 2014). Oba tipa domen gradi motiv iz šestih antiparalelno povezanih α -vijačnic, imenovan domena smrti (DD, angl. *Death domain*). Domeno DD značilno vsebujejo proteini, ki so udeleženi pri vnetjih ali apoptozi. Preko domen PYD se povežeta NLRP3 in ASC (interakcije PYD-PYD), preko domen CARD pa ASC in prokaspaza-1 (interakcije CARD-CARD) (Slika 2).

Interakcije PYD-PYD in CARD-CARD pretežno temeljijo na elektrostatskem privlaku med nasprotno nabitimi predeli na domenah PYD oz. CARD vezavnih partnerjev. Te domene imajo namreč jasno definirane pozitivno in negativno nabite predele. Domena PYD proteina ASC ima na primer na vijačnicah H2 in H3 pozitivno nabite stranske skupine, na vijačnicah H1 in H4 pa negativno nabite stranske skupine (Srimathi in sod., 2008). Domena PYD NLRP3 ima izrazit negativni predel na vijačnicah H1 in H2. V teh nasprotno nabitih predelih NLRP3 in ASC naj bi potekala njuna interakcija.

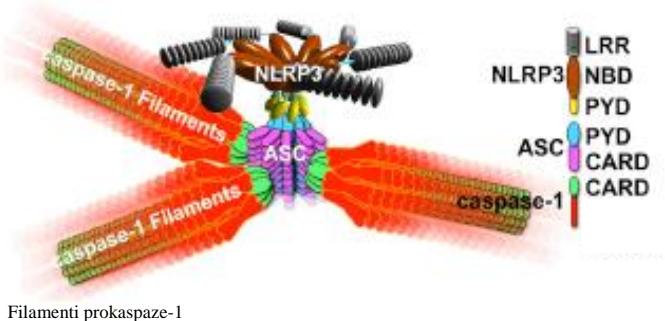
Ne le povezovanje vezavnih partnerjev, tudi oligomerizacija monomerov posameznega proteina inflamasoma temelji na elektrostatskih interakcijah med domenami PYD in CARD. Pri oligomerizaciji domen CARD proteina ASC se na primer povežeta pretežno negativni nabiti vijačnici H1 in H4 prvega monomera ASC s pretežno pozitivno nabitim vijačnicama H2 in H3 drugega monomera ASC (De Alba, 2009). Tovrstna asimetrična

interakcija pušča pri vsakem monomeru po dve prosti vijačnici za vezavo drugih monomerov, kar omogoča neomejeno oligomerizacijo.



Slika 2: Interakcije PYD-PYD in CARD-CARD med proteini znotraj inflamasoma NLRP3
(Blander, 2014)

V kontekstu medproteinskih interakcij so Lu in sod. (2014) podali podroben tridimenzionalen model sestave inflamasoma NLRP3. Po zaznavi drugega signala potrebnega za aktivacijo inflamasoma NLRP3 oligomerizira v svoji domeni NACHT oz. NBD. Oligomerizacija NLRP3 je ključnega pomena za nadaljno sestavo inflamasoma. Domene PYD oligomeriziranega senzorja NLRP3 predstavljajo platformo, okoli katere se nalagajo domene PYD monomerov ASC (Slika 3). Zaradi neposredne bližine ob nukleaciji monomeri proteina ASC oligomerizirajo v domenah CARD, pri čemer se tvori struktura v obliki diska (Slika 3). Podobno kot prej NLRP3, sedaj oligomeriziran ASC predstavlja ogrodje, okoli katerega se lahko nalagajo in oligomerizirajo molekule prokaspaze-1. Pri tem se tvorijo dolgi radialni filamenti od katerih se avtoprotolitsko odcepljujo molekule kaspaze-1 (Slika 3).



Filamenti prokaspaze-1

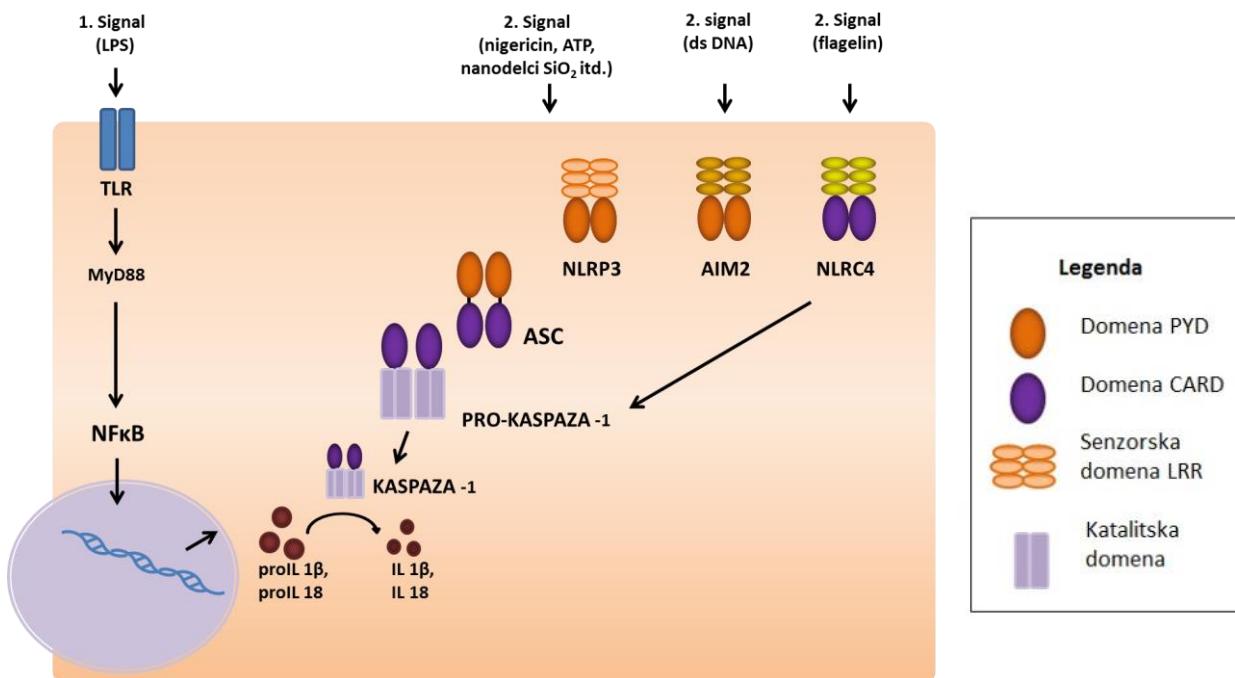
Slika 3: Inflamasomski kompleks (Lu in sod., 2014: 1202)

Inflamasomski kompleksi so vidni pod mikroskopom kot točkasti agregati (angl. *Specks*). V vsaki celici je načeloma po en agregat, vendar pod mikroskopom lahko izgledajo celice prepredene s fibrilami, ki izhajajo iz agregata. Franklin in sod. (2014) so ugotovili, da se ti agregati po piroptozi sprostijo v ekstracelularno okolje, kjer ohranijo sposobnost pretvorbe proIL1 β v zrelo obliko, vendar za to potrebujejo prokaspazo-1. Prokaspaza-1 in prekurzorji citokinov se akumulirajo tudi zunaj celic z aktiviranim inflamasomom, zato lahko agregati vršijo zunajcelično proizvodnjo IL1 β . Agregati se sicer ne izločajo aktivno, dokler je celica še živa, ampak potem ko odmre. Poleg zunajcelične dejavnosti aggregatov iz odmrlih celic, lahko le-ti ponovno preidejo nazaj v celice s fagocitozo. Pri tem sprostijo poškodbe lizosomov, se sprostijo v citoplazmo celic in tam vodijo nalaganje novih molekul ASC in prokaspaze-1. Agregati lahko na tak način močno ojačajo inflamasom, saj predstavljajo drugi signal v aktivaciji inflamasoma (Franklin in sod., 2014).

2.1.5 Drugi inflamasomi

Do sedaj so bili odkriti inflamasomi NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP12, NLRC4 in AIM2, ki se med seboj razlikujejo po tipu senzorskega proteina in po udeležbi proteina ASC v inflamasomski verigi (Schroder in Tschopp, 2010). Najbolje raziskani so inflamasomi NLRP3, NLRC4 in AIM2. Inflamasom NLRC4 aktivira bakterijski flagelin. Flagelin pride v citosol v sklopu sekrecijskega sistema raznih virulenčnih bakterij, ki injicirajo flagelin v celice z iglastim proteinom T3SS. Znotraj celic flagelin najprej zaznajo proteini NAIP (angl. *Neuronal apoptosis inhibitory protein*), ki se nato povežejo s senzorjem NLRC4 (Lucena Lage in sod., 2014). Senzorski protein NLRC4 vsebuje domeno CARD, zato se lahko brez adaptorja ASC poveže s prokaspazo-1 (Slika 4). Čeprav udeležba ASC v inflamasomu NLRC4 ni kritična za aktivacijo inflamasoma, prisotnost ASC poveča kapaciteto tvorbe IL1 β (Miao in sod., 2006). Proteini NAIP poleg flagelina lahko zaznavajo tudi komponente bakterijskega sekrecijskega sistema npr. T3SS (Lucena Lage in sod., 2014).

AIM2 je posebnež med inflamasomi. Aktivira ga virusna ali bakterijska dvostranska DNA (dsDNA, angl. *Double stranded DNA*) (Hornung in sod., 2009). Senzorski protein vsebuje domeno PYD, zato je za sestavo inflamasoma potrebna prisotnost ASC. V nasprotju s senzorji NLR, ki svojih aktivatorjev verjetno ne zaznavajo z neposredno vezavo, se AIM2 aktivira z direktno vezavo dsDNA. AIM2 se tako kot drugi senzorji nahaja v citoplazmi, tako da lahko zaznava citosolno DNA, ki je pogosto posledica okužbe z virusi ali sproščanja mitohondrijske DNA ob okvari mitohondrijev.



Slika 4: Sestava inflamasomov NLRP3, AIM2 in NLRC4

2.2 MEHANIZMI INHIBICIJE INFLAMASOMA NLRP3

2.2.1 Vzgibi za iskanje inhibitorjev inflamasoma NLRP3

Inflamasom je običajno nepogrešljiv del naravne imunosti. Preko sinteze glavnega proinflamatornega citokina IL1 β lahko potencira imunski odziv in učinkovito eliminira patogene mikroorganizme v gostitelju. Zaradi jakosti odziva, ki ga sproži, je ključno, da se aktivira le ob prisotnosti signalov, ki so indikatorji infekcije. Celice z različnimi intrinzičnimi in ekstrinzičnimi procesi strogo regulirajo inflamasom na ravni transkripcije, lokalizacije, zorenja ter sekrecije proteinov in produktov inflamasoma (Schroder and Tschopp, 2010).

Prekomerna aktivacija inflamasoma NLRP3 v sterilnem stanju gostitelja lahko povzroči avtoimunske bolezni npr. periodične vročinske sindrome v povezavi s kriopirinom (CAPS, angl. *Cryopyrin-associated periodic syndromes*) med katere sodijo družinski avtoinflamatorični sindrom povzročen z mrazom (FCAS, angl. *Familial cold autoinflammatory syndrome*), Muckle-Wellssov sindrom (MWS, angl. *Muckle-Wells syndrome*) in multisistemska bolezen z začetkom pri novorojenčku (NOMID, angl. *Neonatal onset multisystem inflammatory disease*) (Abderrazak in sod., 2015). Ti so posledica genskih mutacij na senzorskem proteinu NLRP3, zanje pa so značilni periodični

pojavi kožnih izpuščajev, vročine ter vnetja pljuč in sklepov, povzročajo pa tudi okvaro sluhu in ledvic.

Poleg genskih mutacij je prekomerna aktivacija inflamasoma NLRP3 lahko tudi posledica kronične izpostavljenosti molekuli, ki jo inflamasom NLRP3 prepozna kot stresni signal (Abderrazak in sod., 2015). Amiloidne plake pri Alzheimerjevi bolezni, patološka oblika prionskega proteina pri Creutzfeld-Jakobovi bolezni, azbestna vlakna pri azbestozni, kristali holesterola pri hiperholesteremiji so primeri molekul in delcev, ki se dolgotrajno kopijo v telesu in stimulirajo aktivacijo inflamasoma NLRP3 v sterilnem stanju. Prekomerno aktiviran inflamasom NLRP3 prispeva k slabšanju prognoze teh bolezni. Pri nevrodegenerativnih boleznih aktiviran inflamasom NLRP3 na primer v možganih sproži vnetje, ki je toksično za nevrone (Heneka in sod., 2012).

Pri zdravljenju bolezni, povezanih z deregulirano aktivacijo inflamasoma NLRP3, je torej ključnega pomena zajezitev njegove aktivacije. Obstojeca zdravila za tovrstne bolezni vključujejo antagoniste receptorja IL1R npr. anakinra in IL1 β -nevtralizirajoča protitelesa npr. kanakinumab (Coll in sod., 2015). Ta zdravila ne inhibirajo neposredno inflamasoma NLRP3, ampak učinke IL1 β . IL1 β je končni produkt aktivacije več različnih inflamasomov, tudi tistih, ki niso udeleženi v patologijo zdravljenje bolezni. Bolniki, zdravljeni s takšnimi zdravili, so zato v primeru okužbe zmožni le šibkega antimikrobnega odziva. Poleg imunokomprimiranosti bolnikov je inhibicija na nivoju citokinov problematična, ker ne preprečuje piroptoze celic z aktiviranim inflamasomom, saj se inflamasom v celicah še vedno sestavlja. Ti problemi odpirajo obetavno raziskovalno nišo - iskanje oz. načrtovanje tarčnih terapevtikov, ki bi specifično inhibirali sestavo inflamasoma NLRP3 v zgodnjih fazah njegovega sestavljanja. V nadaljevanju sledi pregled znanih inhibitorjev inflamasoma NLRP3 in mehanizmov inhibicije inflamasoma NLRP3, po katerih se pri načrtovanju inhibitorjev lahko zgledujemo.

2.2.2 Inhibicija inflamasoma NLRP3 z endogenimi inhibitorji

2.2.2.1 Proteini POP in COP

Inflamasomi so pri človeku regulirani z endogenimi regulatorji. Glavni in najbolje okarakterizirani endogeni regulatorji človeškega inflamasoma so proteini PYD-only (POP, angl. *Pyd-only proteins*) in CARD-only (COP, angl. *Card-only proteins*). Proteini POP oz. COP so sestavljeni iz ene interakcijske domene PYD oz. CARD. Obe domeni imata podobno sekundarno strukturo (Stehlik in Dorfleutner, 2007). Večina genov za proteine POP oz. COP se nahaja blizu skupaj na kromosому, kar nakazuje, da so nastali z genskimi duplikacijami nekega PYD oz. CARD kodirajočega gena. Doslej so poznani trije človeški

proteini POP - POP1, POP2 in POP3, izmed katerih POP1 in POP2 inhibirata inflamasom NLRP3 ter pet človeških proteinov COP - Iceberg, COP1/Pseudo-ICE, INCA, caspase-12 in NOD2-S, ki vsi inhibirajo inflamasom NLRP3 (Preglednica 1).

Kot regulatorji inflamasoma proteini POP in COP delujejo tako, da se vežejo na PYD oz. CARD vsebujoče proteine, udeležene v inflamasom, in preprečijo medproteinske interakcije, potrebne za sestavo inflamasoma. Tako kot na domenah PYD in CARD proteinov, ki sestavljajo inflamasom, so tudi na proteinih POP in COP jasno razločne pozitivno in negativno nabite površine (Srimathi in sod., 2008), kar nakazuje, da tudi vezava proteinov POP in COP na tarčne proteine temelji na elektrostatskih interakcijah. Protein Iceberg iz družine proteinov COP se na primer veže na prokaspazo-1 in zasede njeno interakcijsko mesto z ASC.

Inhibicija ni nujno vedno kompetitivne narave. POP1 se na primer domnevno veže na ASC na drugem mestu kot domena PYD NLRP3, saj imata različen elektrostatski nabo (Srimathi in sod., 2008). Vezava na eno od teh mest naj bi povzročila konformacijsko spremembo v drugem vezavnem mestu in tako inducirala disociacijo s tega mesta.

2.2.2.2 Protein SHP

Nedavno je bil odkrit nov endogeni negativni regulator človeškega inflamasoma NLRP3 - protein SHP (angl. *Small heterodimer partner*), ki inhibira inflamasom na stopnji tvorbe ROS (Yang in sod., 2015). S celično frakcionacijo so pokazali, da SHP inflamasom NLRP3 regulira preko prostorske relokacije komponent inflamasoma. Inflamasomski se v primeru izničenega gena za SHP sestavlja v perinuklearnem prostoru, torej v običajnem ambientu inflamasomske aktivacije. V primeru prisotnosti SHP pa se SHP veže s proteinom NLRP3 in se translocira v notranjost mitohondrijev, s čimer NLRP3 ni več dostopen za nadaljno sestavo inflamasoma. Poleg regulacije na ravni prostorske razporeditve proteinov inflamasoma ima SHP tudi vlogo pri vzdrževanju homeostaze mitohondrijev. Po translokaciji v mitohondrije SHP tudi inhibira generiranje ROS in sproščanje mitohondrijske DNA v citosol, s tem pa zajezi aktivacijo inflamasoma NLRP3.

2.2.3 Inhibicija inflamasoma NLRP3 z mikrobnimi proteini

Mikroorganizmi so idealen model za proučevanje in načrtovanje inflamasomskih inhibitorjev, saj so razvili številne mehanizme, s katerimi lahko zaobidejo gostiteljev imunski sistem. Nekateri mikroorganizmi, npr. virusi iz družine Pox, sintetizirajo homologe človeških proteinov POP, ki motijo interakcije PYD-PYD med senzorjem NLRP3 in adapterjem ASC (Johnston in sod., 2005).

Poleg motenja interakcij mikrobi lahko sintetizirajo inhibitorje, ki posnemajo kaspazni substrat in tako blokirajo inflamasom na stopnji zorenja citokinskih prekurzorjev. Primer takšnih inhibitorjev so homologi serpinov, ki jih sintetizirajo virusi Myxoma in Vaccinia (Young in sod., 2000). Serpini so v osnovi inhibitorji serinskih proteaz, vendar delujejo tudi na cisteinske proteaze, kot je kaspaza-1. Serpini se vežejo v aktivno mesto proteaze in irreverzibilno spremenijo njeno konformacijo, pri čemer se popači njeno aktivno mesto.

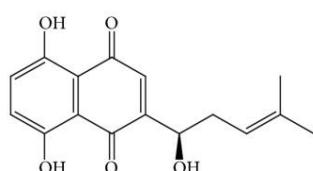
Na stopnji kaspaze-1 inflamasom inhibira tudi bakterija *Mycobacterium tuberculosis*, povzročiteljica tuberkuloze. Ugotovili so, da se ob okužbi z *Mycobacterium tuberculosis* v okviru gostiteljeve naravne imunosti sproži sinteza večine citokinov razen najpomembnejšega proinflamatornega citokina IL1 β (Master in sod., 2008). Izkazalo se je, da *Mycobacterium tuberculosis* izraža gen za cinkovo metaloproteazo zmp1. Ko bakterijo fagocitirajo makrofagi, da bi jo razgradili v fagolizosому, cinkova metaloproteaza preko inhibicije kaspaze-1 po zaenkrat neznanem mehanizmu zavre zorenje fagosomov v fagolizosome.

Zgoraj omenjeni mikrobni inhibitorji delujejo v poznejših fazah sestave inflamasoma, ki so skupne več tipom inflamasomov, zato ne inhibirajo specifično inflamasoma NLRP3. Izjema pri tem je protein Orf63, ki ga sintetizira virus KSAH (angl. *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*) (Gregory in Damania, 2011). Pokazali so, da se protein Orf63 veže na senzorska proteina NLRP1 in NLRP3. Orf63 je homologen domeni LRR senzorjev NLR, zato sta Gregory in Damania (2011) na primeru inflamasoma NLRP1 podala model mikrobne inhibicije inflamasoma, kjer Orf63 posnema delovanje LRR. NLRP1 je v odsotnosti patogenov avtoinhibiran, ker je njegova domena LRR upognjena nazaj in prekriva NLRP1, s tem pa onemogoča sestavo inflamasoma. Ob vezavi aktivatorjev pa se konformacija NLRP1 odpre in omogoči povezavo NLRP1 z ostalimi proteini inflamasoma. Orf63 naj bi v aktiviranem stanju inflamasoma deloval podobno kot LRR in prekril NLRP1, s tem pa preprečeval sestavljanje inflamasoma.

Poleg Orf63 inflamasom NLRP3 specifično inhibira tudi protein V, ki ga sintetizira virus ošpic (Komune in sod., 2011). S koimunoprecipitacijskimi testi so pokazali, da se protein V veže na senzor NLRP3, vendar pa za razliko od Orf63 protein V ni homolog NLRP3, zato se verjetno veže na manj ohranjene domene NLRP3.

2.2.4 Inhibicija inflamasoma NLRP3 z metaboliti in majhnimi molekulami

Številne spojine naravnega izvora, za katere so poznani zaviralni učinki na razvoj bolezni, v zahodni medicini obravnavamo s skepso, največkrat zaradi nezadostne raziskanosti nezaželenih učinkov. Nedavne raziskave so pokazale specifičen inhibitorni potencial nekaterih rastlinskih metabolitov na patološka stanja, v katerih je udeležen inflamasom NLRP3. Inhibitorni vpliv na aktivnost kaspaze-1 so na primer pokazali za šikonin iz rastline *Lithospermum erythrorhizon* (Slika 5) (Zorman in Hafner-Bratkovič, v recenziji).



Slika 5: Kemijska struktura šikonina

Pri inhibiciji inflamasoma se prepoznavata tudi pomen produktov človeškega metabolizma. Youm in sod. (2015) so pokazali, da ketonsko telesce β -hidroksibutirat, ki kot alternativni vir ATP nastaja ob stradanju, specifično inhibira inflamasom NLRP3. Prav tako so pokazali, da β -hidroksibutiratu sorodni metaboliti npr. butirat in acetoacetat, ki tudi nastajajo od stradanju, ne inhibirajo inflamasoma NLRP3. Mehanizem inhibicije še ni pojasnjen, je pa jasno, da inhibicija ni povezana s procesi, ki potekajo med stradanjem, npr. z redukcijo pri oksidativnem stresu ali avtofagijo.

Številne majhne organske molekule bolj ali manj specifično inhibirajo inflamasom NLRP3. Med specifične inhibitorje inflamasoma NLRP3 sodijo diarilsulfonilureo vsebujoče spojine kot je antagonist cisteinil-leukotrienskega receptorja gliburid, ki se uporablja za zdravljenje diabeta tipa II (Lamkanfi in sod., 2009) in molekula MCC950, za katero so Coll in sod. (2015) pokazali, da v nanomolarnih koncentracijah inhibira izločanje IL1 β ob aktivaciji z različnimi aktivatorji inflamasoma NLRP3. Mehanizma njenega delovanja niso razjasnili, pokazali pa so, da inhibicija ne poteka preko modulacije pretoka kalija niti ne preko inhibicije oligomerizacije NLRP3 ali interakcij med proteini inflamasoma.

Nespecifično inflamasom NLRP3 inhibirajo tudi naravna protivnetna spojina partenolid (Juliana in sod., 2010), sintetični inhibitor kinaze IκB Bay 11–7082 (Juliana in sod., 2010) in zdravilo za malarijo artemisinin (Shi in sod., 2013). Med inhibitorje inflamasoma NLRP3 naj bi sodil tudi dimetil sulfoksid (DMSO), ki se zaradi svoje amfifilnosti pogosto uporablja kot topilo v biokemijskih raziskavah in kot sestavni del končnih formulacij

farmacevtskih učinkovin. Znano je, da DMSO inhibira pot NF κ B, glede inhibitornega vpliva na inflamasom pa si študije niso enotne (Xing in Remick, 2005).

Preglednica 1 : Pregled inhibitorjev inflamasoma NLRP3

Inhibitor	Izvor	Tarča	Mehanizem inhibicije	
Proteini POP Stehlik in Dorfleutner, 2007: 7995	POP1 POP2	Endogeni človeški inhibitorji	ASC, PYD NLR, PYD	Inhibicija interakcij med proteini inflamasoma
Proteini COP Stehlik in Dorfleutner, 2007: 7995	Iceberg COP1/Pseudo-ICE INCA Caspase 12 NOD2-S	Endogeni človeški inhibitorji	Prokaspaza-1, CARD	Inhibicija interakcij med proteini inflamasoma
Protein SHP Yang in sod., 2015		Endogeni človeški inhibitor	NLRP3, PYD	Prostorska relokacija proteinov inflamasoma
β-hidroksibutirat Youn in sod., 2015		Metabolit v procesu stradanja	NLRP3	?
Zmp1 Master in sod., 2008		<i>Mycobacterium</i> <i>tuberculosis</i>	Kaspaza-1	Inhibicija zorenja fagolizosomov
Homologi serpinov Young in sod., 2000	Serp2	Virus Myxoma	Kaspaza-1	Inhibicija encimske aktivnosti kaspaze-1
Orf63 Gregory in Damania, 2011		KSAH	NLRP3, NLRP1	Posnemanje delovanja domene LRR
Protein V Komune in sod., 2011		Virus ošpic	NLRP3, PYD	?
Šikonin Zorman in Hafner Bratkovič, v recenziji		<i>Lithospermum</i> <i>erythrorhizon</i>	Kaspaza-1	?
DMSO Xing in Remick, 2005		Majhna organska molekula	NF κ B, NLRP3?	Lovljenje ROS
MCC950 Coll in sod., 2015		Majhna organska molekula	?	?

2.3 INHIBICIJA INFLAMASOMA NLRP3 S PEPTIDNIMI INHIBITORJI

Peptidni inhibitorji niso nov koncept, nekateri so že komercialno dostopni npr. Goserelin in Leuprolide, agonista gonadotropinskih receptorjev, ki se uporablja v terapiji raka na dojki oz. raka prostate (Uhlig in sod., 2014). Kot terapevtiki so peptidni inhibitorji zanimivi zaradi specifičnega delovanja, varnosti in relativno enostavnega načrtovanja (Eldar-Fikelman in Eisenstein, 2009). Uporabo peptidov za terapevtske namene so dlje

časa obravnavali s skepso, predvsem zaradi njihove metabolne nestabilnosti, oteženega prenosa čez celično membrano, potencialne imunogenosti in neprimernosti za oralno administracijo. V zadnjem času se uveljavljajo strategije za izboljšanje biološke dostopnosti in stabilnosti peptidov, ki vključujejo razne kemijske modifikacije in formulacije, ki izboljšajo stabilnost peptidov proti proteazam. Te vključujejo dostavo peptidov z liposomi, nanodelci, nanoemulzijami, tabletami s pomožnimi agensi npr. proteaznimi inhibitorji ipd. (Uhlig in sod., 2014). Alternativo intravenozni oz. oralni administraciji predstavlja tudi transdermalna aplikacija z obliži.

Tarče peptidnih inhibitorjev so praviloma proteini, delujejo pa po mehanizmu posnemanja substrata encimov ali posnemanja interakcijskega mesta med vezavnima partnerjema:

- Posnemanje naravnih inhibitorjev tarčnega proteina

Cheng in sod. (1986) so na primer načrtovali kratke peptide na podlagi zaporedja naravnega inhibitorja PKI, ki inhibira od cAMP odvisno proteinsko kinazo, in jo na tak način učinkovito inhibirali.

- Posnemanje psevdosubstrata

Deli polipeptidne verige proteina lahko včasih delujejo kot psevdosubstrat, saj zaradi homologije s substratom zasedejo lastno aktivno mesto in se na tak način avtoinhibirajo. Peptidi, ki izhajajo iz psevdosubstratnih regij proteinov, lahko z visoko selektivnostjo inhibirajo matični protein (Eldar-Fikelman in Eisenstein, 2009).

- Posnemanje mesta interakcije med proteinskima partnerjema

Signalne poti pogosto delujejo na principu interakcij več proteinov v grozd, ki nato aktivira tarčni encim. Na tak način se aktivirajo proteaze, med katere sodi tudi kaspaza-1.

Pri načrtovanju specifičnih peptidnih inhibitorjev z visoko afiniteto za tarčni protein je koristno upoštevati sledeče kriterije (Eldar-Fikelman in Eisenstein, 2009):

- Motivi, ki jih posnemajo peptidi, morajo biti na površini proteina, saj so izpostavljene površine ponavadi udeležene v medproteinske interakcije.
- Visok faktor fleksibilnosti (faktor B) v regiji proteina, iz katere izbiramo peptid
- Dolžina peptida med 5 in 50 aminokislinskih ostankov, saj predolge peptide lahko razgradijo proteaze, prekratki pa lahko izgubijo biološko funkcijo
- Aminokislinsko zaporedje regije proteina, iz katere izbiramo peptid, naj bo ohranjen, a ne preveč (ohranjenost zaporedja nakazuje na funkcionalno pomembno vlogo, pretirana ohranjenost pa zmanjšuje specifičnost).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Laboratorijska oprema in potrošni material

Preglednica 2: Uporabljena laboratorijska oprema in potrošni material

Proizvajalec	Laboratorijska oprema
Bemis	Parafilm M
Berthold Detection Systems	Luminometer za mikrotitrskie plošče Orion, računalniški program Simplicity 4.2
Binder	CO ₂ inkubator za celične kulture
Biometra	Vakumska sesalna črpalka
BioRad	MiniProtean (sistem za poliakrilamidno gelsko elektroforezo), Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (sistem za mokri Western prenos), električni napajalnik
BioTek	Čitalec mikrotitrskih plošč Synergy Mx
CBS	Komora s tekočim dušikom
Corning	Plošče s 96 luknjicami, plošče z 24 luknjicami, strgala za celice
Eppendorf	Namizna centrifuga MiniSpin, termoblok Thermomixer comfort, avtomatske pipete (10 ml, 5 ml, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl in 2,5 µl), mikrocentrifugirke, mikrocentrifugirke Protein LoBind, avtomatski pipetnik
GE Healthcare	Nitrocelulozna membrana Amersham Hybond™ ECL™
Gilson	Avtomatske pipete (10 mL, 5 ml, 200 µl, 100 µl in 20 µl) s pripadajočimi nastavki
Gorenje	Zamrzovalnik -20 °C
Hettich	Centrifuga Universal 320R
HygoNorm	Mrežice za lase
HygoStar	Copatki za celični laboratorij
IKA	Magnetno mešalo, vibracijski stresalnik MS3 basic
inoLab	pH meter WTW series
Invitrogen	Naprava za štetje celic Countess, ploščice za štetje celic, barvilo tripan modro
Iskra PIO d.o.o.	Brezpršna komora M18
Kambič	Parni sterilizator A500/700, inkubator, stresalnik
Kimberly-Clark	Rokavice KIMTECH (sive in oranžne)
Leica	Invertni svetlobni mikroskop
New Brunswick	Stresalnik/inkubator Innova 42
Nunc	Bele plošče s 96 luknjicami, plošče s 96 luknjicami MaxiSorp
Sanolabor	Halje
Sartorius Stedim Biotech	Tehtnica
Starlab	Stresalnik za mikrotitrskie plošče Microplate mixer
Syngene	G:BOX, računalniški program za obdelavo podatkov GeneTools
Tecan	Spiralec plošč za ELISE
ThermoScientific	Zamrzovalnik -80 °C
TPP	Gojitvene posodice za celične kulture T-75 in 60 mm, serološke pipete, centrifugirke, plastične banjice, krioviale
Zanussi	Hladilnik

3.1.2 Kemikalije

Preglednica 3: Uporabljeni kemikaliji

Proizvajalec	Kemikalije
Ebioscience	Kiti za teste ELISA: Mouse IL-1 β ELISA Ready-SET-Go!, Mouse IL-18 Platinum ELISA, Mouse TNF alpha ELISA Ready-SET-Go!
Ecolab	Dezinfeckcijsko sredstvo Skinman Soft N
Gibco	FBS, DMEM, DMEM no colour, RPMI 1640, OPTIMEM, destilirana voda
Invivogen	EB Ultrapure LPS, QUANTI-Blue, Poly(dA:dT)/LyoVec, NanoSiO ₂
Life Technologies	PageRuler Prestained Protein Ladder, Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent
Lux	Luciferin, koelenterazin
Merck	Izopropanol
Sigma Aldrich	Amonijev persulfat (APS), ATP, DMSO, akrilamid, β -merkaptoetanol, fenazin metosulfat (PMS), metanol, TEMED, tripsin-EDTA, Tris, Tween-20, XTT
Thermo Scientific	SuperSignal West Femto Substrate, SuperSignal West Pico Substrate, aluminijeve soli
Tropix	I-Block
Promega	5 x Passive Lysis Buffer
Proteogenix	Sintetični peptidi
Šampionka	Varikina
ECP	Etanol Stella

3.1.3 Raztopine in pufri

Preglednica 4: Uporabljeni raztopine in pufri

Raztopina / pufer	Sestava
10 x PBS (fosfatni pufer)	1,7 M NaCl, 34 mM KCl, 100 mM NaH ₂ PO ₄ , 18 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
15 % ločitveni poliakrilamidni gel	2,2 mL MQ, 2,6 mL 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 100 μ L 10 % NaDS, 5 mL 30 % akrilamid, 100 μ L 10 % APS, 10 μ l TEMED
4 % vstopni poliakrilamidni gel	2,975 mL MQ, 1,25 mL 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 50 μ L 10 % NaDS, 0,670 mL 30 % akrilamid, 50 μ L 10 % APS, 5 μ L TEMED
10 x elektroforezni pufer (za poliakrilamidno gelsko elektroforezo)	0,250 M Tris, 1,92 M glicin, 1 % NaDS, pH 8,3
5x Passive Lysis Buffer	Sestava ni dostopna (Promega)
Vzorčni pufer NaDS	1 x NaDS z β -merkaptoetanol v MQ
Pufer za Western prenos	25 mM Tris, 192 mM glicin, 20 % metanol, pH 8,3
Pufer za spiranje membrane pri Western prenosu	1 x PBS v MQ z 0,01 % detergenta Tween 20
Pufer I-Block za blokiranje membrane	0,2g I-Block/100 mL pufra za spiranje membrane
Pufer za spiranje plošč pri ELISI	1 x PBS v MQ z 0,05 % detergenta Tween 20
Raztopina STOP pri ELISI	11,5 mL fosforjeve V kisline (H ₃ PO ₄) v 100 mL MQ
Raztopina pri testu XTT	100 μ L PMS v MQ, 5 mL soli XTT v MQ

3.1.4 Protitelesa

Preglednica 5: Uporabljeni protitelesi

Proizvajalec	Protitelo	Opis
AdipoGen	anti-Caspase-1 (p20) (mouse)	Mišje protitelo proti fragmentu p20 mišje kaspaze-1
Santa Cruz Biotech	goat anti-mouse IgG-HRP	Kozje protitelo proti mišjemu receptorju IgG, konjugirano s hrenovo peroksidazo

3.1.5 Sintetični peptidi

Preglednica 6: Uporabljeni peptidi

Proizvajalec	Ime peptida	Zaporedje
Proteogenix	P1	WGGMASSAELDFNLQALLEQLSQDEK
	P2	WGGVDGVLDALHGSVLTEGQYQAVRK
	P3	WGGGDELKKFKMKLLTVQLREGYGRIPRGALLQK
	P4	WGGDVDLKKFKMHLEDYPPEKGCI PVRGQMEKADK
	P7	WGGMASSAELDFNLQALLEQLSQDEK
	P8	WGGDYLFFIHCREVSLRTP
	P9	WGGLENYGKFEKGYLIFVVRLFGLVNQERTSYLEKK
	P10	WGGTTRPVALEKLQHLLDH
	P11	WGGSLAQTSKTTAVYVFFLSSLL
	P12	WGGMDGFDELQGAFDEHIGEV

3.1.6 Celične kulture

Preglednica 7: Uporabljeni celični kulturi

Proizvajalec/Donor	Celična kultura	Opis
ATCC	HEK293T	Celična linija iz človeških embrionalnih ledvičnih celic z vstavljenim velikim T-antigenom virusa SV40
prof. K. A. Fitzgerald (Hornung in sod., 2008)	Makrofagi WT	Imortalizirana celična linija iz mišjih makrofagov iz kostnega mozga mišk C57B/6
Kemijski inštitut	BMDM	Mišji makrofagi, izolirani iz kostnega mozga miši (pripravo kosti, izolacijo BMDM in njihovo zorenje opravila Iva Hafner Bratkovič in Duško Lainšček)
Invivogen	Makrofagi RawBlue	Rekombinantna celična linija iz mišjih makrofagov, ki vsebuje gen za alkalno fosfatazo pod promotorjem, občutljivim na NFκB

3.2 METODE

3.2.1 Načrtovanje peptidov

Peptide smo načrtovali na podlagi dostopnih kristalnih zgradb proteinov, udeleženih v inflamasom NLRP3, ki smo jih pridobili iz podatkovne baze RCSB Protein Data Bank. Za ogled in manipulacijo proteinskih struktur smo uporabili program Chimera 1.9. Poravnave aminokislinskih zaporedij proteinov smo izvedli s programoma BLASTP in CLUSTALW. Biokemijske lastnosti peptidov (izoelektrična točka, analiza hidrofobnosti ipd.) smo določali s spletnim programom Peptide Property Calculator (GenScript, 2015).

3.2.2 Sterilizacija pripomočkov in sterilno delo

Vsi pripomočki za delo s celičnimi kulturami so bili bodisi dobavljeni v sterilni embalaži bodisi smo jih pred začetkom dela sterilizirali s standardnim postopkom parne sterilizacije: 20 min, 121°C in $1,2 \times 10^5$ Pa. Vsa opravila s celicami so potekala v sterilnih pogojih v brezprašni komori in ob nošnji ustrezne zaščitne opreme (halja, mrežica za lase, copati in rokavice). Uporabljene površine in pripomočke za delo smo pred uporabo prebrisali s 70 % etanolom, rokavice pa smo pred in med delom dezinficirali z dezinfekcijskim sredstvom.

3.2.3 Delo s celičnimi kulturami

3.2.3.1 Gojenje celic

Uporabljali smo sledeče celice in celične linije: imortalizirano linijo mišjih makrofagov iz kostnega mozga iz mišk C57B/6 (makrofagi WT), mišje makrofage RawBlue (makrofagi RB), mišje makrofage iz kostnega mozga (BMDM, angl. *Bone marrow derived macrophages*) in človeško celično linijo HEK293T (angl. *Human embryonic kidney 293T*).

Celice smo gojili v celičnem inkubatorju pri pogojih 37 °C in 5 % CO₂. Za gojenje smo uporabljali gojitvene posodice, v katerih so se celice pritrstile na podlago (vse celične linije so bile adherentne) in rastle v monosloju. Z izjemo BMDM smo celice gojili v mediju Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) z 10 % fetalnega govejega seruma (FBS, angl. *Fetal bovine serum*). Celice BMDM smo gojili v mediju Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640) z 20 % FBS.

Preglednica 8: Pogoji gojenja uporabljenih celic

Celice	Gojitveni medij	Gojitvene posodice	Površina posodice (mm ²)	Volumen posodice (mL)	Število celic ob konfluenci
Makrofagi WT	DMEM z 10 % FBS	T-75	7500	8-15	8,4*10 ⁶
Makrofagi RB	DMEM z 10 % FBS	T-75	7500	8-15	8,4*10 ⁶
HEK293T	DMEM z 10 % FBS	T-75	7500	8-15	8,4*10 ⁶
BMDM	RPMI z 20 % FBS	60 mm	2827	3-5	3,2*10 ⁶

3.2.3.2 Redčenje celic

Ko so celične linije prerastle površino gojitvene posodice T-75 oz. so postale konfluentne, smo s sesalno črpalko iz nje odsesali medij, sprali celice s 5 mL 1 x fosfatnega pufra s soljo (1 x PBS) in ga odsesali. Na tak način smo odstranili ostanke FBS, ki lahko inhibira delovanje encima tripsina. Le-tega smo uporabili za odlepiljanje celic od podlage, saj so makrofagi in celice HEK293T adherentne celice. Dodali smo 2 mL tripsina z EDTA in celice z njim 10 minut inkubirali na 37 °C. Tripsin smo razredčili z dodatkom 8 mL ogretega medija z FBS in celice postrgali s strgalom za celice. Ustrezne volumne celic glede na želeno redčitev smo prestavili v novo posodico in dodali medij do 10 mL.

Preglednica 9: Primeri redčenja celic

Redčitev	Volumen gojitvene posodice T-75 (mL)	Volumen celic (mL)	Volumen dodanega medija (mL)
1:2	10	5	5
1:3	10	3,3	6,7
1:5	10	2	8
1:10	10	1	9

3.2.3.3 Zamrzovanje celic

Za zamrzovanje so bile celice primerne, ko so prerastle 90 % površine gojitvene posodice. Iz ene preraščene gojitvene posodice smo pripravili dve krioviali celic (trajni kulti). Iz gojitvene posodice (10 mL) smo posesali star medij, jih sprali s 5 mL PBS in ga odsesali. Celice smo odlepili z dodatkom 2 mL tripsina z EDTA in 10-minutno inkubacijo na 37 °C. Tripsin smo razredčili z dodatkom 8 mL ogretega medija z 10 % FBS, celice postrgali in jih odpipetirali v centrifugirko, ki smo jo z ustrezno protiutežjo centrifugirali 5 min na 1200 vrt./min pri sobni temperaturi. Pripravili smo zamrzovalni medij, ki je vseboval 90 % FBS in 10 % DMSO. Uporabili smo hladen FBS, ker se ob dodatku DMSO segreje. Posedenim celicam iz ene preraščene posodice smo odsesali supernatant in celice

resuspendirali v 2 mL zamrzovalnega medija. Tako pripravljene celice smo alikvotirali v krioviale po 1 mL in jih čim hitreje prenesli v zmrzovalnik na -80 °C. Po 24 h smo jih shranili v parah tekočega dušika (okoli -180 °C).

3.2.3.4 Odmrzovanje celic

Iz par tekočega dušika smo vzeli kriovialo z želeno celično kulturo in jo odtalili. Vsebino viale smo odpipetirali v centrifugirko z 9 mL ogretega medija z 10 % FBS, jo rahlo resuspendirali in centrifugirali z ustrezno utežjo 5 min na 1200 vrt./min pri sobni temperaturi. Usedlini celic smo odstranili supernatant, celice resuspendirali v 10 mL medija z 10 % FBS, nato pa prenesli v gojitveno posodico T-75 in inkubirali v celičnem inkubatorju.

3.2.3.5 Nacepljanje celic za eksperimente

Eksperimente smo izvajali na ploščah s 96 luknjicami ali s 24 luknjicami. Celice smo na plošče nacepljali v mediju z 10 % FBS, ob dodatku reagentov pa smo uporabljali medij brez FBS, z izjemo celic BMDM in HEK293T, kjer smo tudi ob dodatku reagentov uporabljali medij z 10 % FBS. Pri nacepljanju celic na plošče s 96 luknjicami smo do koraka tripsinizacije ravnali po istem postopku kot pri redčenju celic v poglavju 3.2.3.2. Odlepljene in postrgane celice smo prenesli v centrifugirke in jih dobro resuspendirali. Nato smo 20 µL celic v razmerju 1:1 zmešali z barvilom tripan modro, ki odmrle celice obarva modro, saj lahko prehaja skozi njihovo membrano. Tako pripravljene celice smo najkasneje v 3 minutah od barvanja s tripan modrim nanesli na ploščico za štetje celic, le-to pa vstavili v napravo za štetje celic Countess. Na podlagi preštetega števila celic smo lahko izračunali, kako moramo redčiti celice za pridobitev želenega števila celic na luknjico.

Preglednica 10: Parametri nacepljanja celic za eksperimente

Celice	Plošče	Število celic v luknjici	Volumen gojišča v luknjici (µL)
Makrofagi WT	96 luknjic	$1,6 \cdot 10^5$	100
Makrofagi RB	96 luknjic	$2,2 \cdot 10^5$	100
HEK293T	96 luknjic (bele)	$5 \cdot 10^4$	100
BMDM	96 luknjic	$1,6 \cdot 10^5$	100
Makrofagi WT (za Western prenos)	24 luknjic	$1,6 \cdot 10^5$	500

3.2.4 Priprava peptidov

Načrtovane peptide z miristinsko skupino smo naročili pri Proteogenixu, dobavljeni pa so bili v liofilizirani obliki. Peptide smo zatehtali in jih raztopili v dimetilsulfoksidu (DMSO) v založni koncentraciji 10 mM. Za raztpljanje in hranjenje peptidov smo uporabljali mikrocentrifugirke Protein LoBind. Ker se volumen po raztpljanju peptidov spremeni, smo po raztopitvi ponovno izmerili volumen raztopine peptidov ter izračunali natančno koncentracijo peptidov. Peptide smo hranili na -20 °C. Pred vsakim eksperimentom smo iz založne raztopine peptidov pripravili različne koncentracije peptidov v mediju brez FBS z daljšim mešanjem na vibracijskem mešalniku in jih nekaj časa pustili na sobni temperaturi. Vsi peptidi razen peptida P7, ki se je rahloobarjal na stenah mikrocentrifugirke, so bili dobro topni v DMSO, prav tako nismo opazili nobenih agregatov pri pripravi delovnih koncentracij peptidov v mediju.

3.2.5 Spremljanje vpliva peptidov na izločanje citokinov pri inflamasomih

3.2.5.1 Sprožitev prvega signala aktivacije inflamasoma

Poskuse smo izvajali v ploščah s 96 luknjicami. Za poskuse smo uporabljali celice v nizkih pasažah, kar je bilo še posebej pomembno za uspešno aktivacijo inflamasoma AIM2. Aktivacijo inflamasoma NLRP3 smo izvajali ob prisotnosti medija DMEM brez FBS, aktivacijo inflamasoma AIM2 pa ob prisotnosti medija DMEM z 10 % FBS. Prvi signal aktivacije inflamasoma NLRP3 smo sprožili z inkubacijo celic v 100 µL medija DMEM z agonistom receptorja TLR4 - lipopolisaharidom (LPS). Končna koncentracija LPS pri poskusih na makrofagih WT je bila 100 ng/mL, na makrofagih RB 25 ng/mL, na BMDM in HEK293T pa 10 ng/mL. Makrofage WT smo z LPS inkubirali 6 h, BMDM pa 3 h.

Tudi pri inflamasomu AIM2 smo za sproženje prvega signala uporabili LPS v končni koncentraciji 100 ng/mL, ki pa smo ga raztopili v DMEM z 10 % FBS. Za aktivacijo inflamasoma AIM2 smo uporabljali makrofage WT v nizki pasaži.

3.2.5.2 Inkubacija celic s peptidi

Po sproženju prvega signala smo celicam odsesali medij z LPS in jih 30 min inkubirali v 80 µL medija, ki je vseboval raztopljene peptide P1-P4 oz. P7-P12 v končnih koncentracijah od 1 µM do 50 µM.

Preglednica 11: Parametri priprave peptidov in inkubacije s peptidi

Peptid	Založna koncentracija peptidov (µM)	Delovna koncentracija peptidov (µM)	Končna koncentracija peptidov (µM)	Volumen peptidov v luknjici (µL)	Končni volumen v luknjici (µL)	Čas inkubacije (h)
P1	10100	12,5; 25; 37,5	10; 20; 30	80	100	0,5
P2	9636	1,25; 6,25; 12,5; 25; 37,5	1; 5; 10; 20; 30	80	100	0,5
P3	9730	1,25; 6,25; 12,5; 25; 37,5	1; 5; 10; 20; 30	80	100	0,5
P4	9880	1,25; 6,25; 12,5; 25; 37,5	1; 5; 10; 20; 30	80	100	0,5
P7	10000	1,25; 6,25; 12,5; 25; 50	1; 5; 10; 20; 40	80	100	0,5
P8	9953	1,25; 6,25; 12,5; 25; 50	1; 5; 10; 20; 40	80	100	0,5
P9	10163	1,25; 6,25; 12,5; 25; 50	1; 5; 10; 20; 40	80	100	0,5
P10	9390	1,25; 6,25; 12,5; 25; 50	1; 5; 10; 20; 40	80	100	0,5
P11	9351	1,25; 6,25; 12,5; 25; 50	1; 5; 10; 20; 40	80	100	0,5
P12	9561	1,25; 6,25; 12,5; 25; 50	1; 5; 10; 20; 40	80	100	0,5

3.2.5.3 Sprožitev drugega signala aktivacije inflamasoma

Celicam smo nato brez menjave gojišča sprožili drugi signal za aktivacijo inflamasoma, in sicer z dodatkom po 20 µL aktivatorja v ustrezni koncentraciji (Preglednica 12) na luknjico. Inflamasom NLRP3 smo aktivirali s topnimi aktivatorji (ATP in nigericin) in s partikularnimi aktivatorji (nanoSiO₂, aluminijeve soli). Inflamasom AIM2 smo aktivirali z reagentom Poly(dA:dT)/LyoVec. Ta reagent vsebuje sintetičen analog dsDNA, ki je aktivator inflamasoma AIM2 in transfekcijski reagent LyoVec, ki DNA transportira v notranjost celice. Celice smo z aktivatorji inkubirali na 37 °C, po preteklem času inkubacije pa smo jim odstranili supernatante in jih zamrznili na -20 °C. Na celicah pa smo izvedli test metabolne aktivnosti z XTT (Točka 3.2.8).

Preglednica 12: Parametri priprave aktivatorjev in inkubacije z aktivatorji

Aktivator	Založna koncentracija aktivatorjev	Delovna koncentracija aktivatorjev	Končna koncentracija aktivatorjev	Volumen aktivatorjev v luknjici (μL)	Končni volumen v luknjici (μL)	Čas inkubacije (h)
ATP	113 mM	25 mM	5 mM, 1 mM (BMDM)	20	100	1
Nigericin	13,4 mM	50 μM	10 μM	20	100	1
NanoSiO_2	5 mg/mL	1,25 mg/mL	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$	20	100	4
Aluminijeve soli	40 mg/mL	2,5 mg/mL	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	20	100	4
Poly(dA:dT)/ LyoVec	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	20	100	12

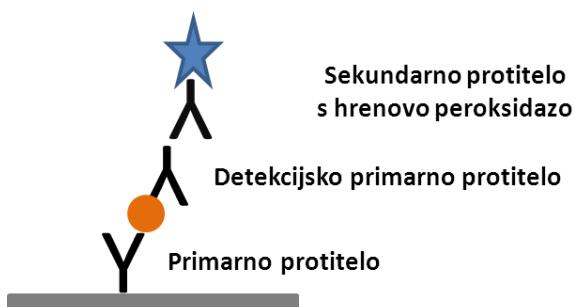
Pri vsakem poskusu smo kot kontrolo testirali sledeče vzorce:

- Kontrola ozadja (medij brez LPS, peptidov in aktivatorjev)
- Kontrola prvega signala aktivacije inflamasoma (medij z LPS)
- Kontrola drugega signala aktivacije inflamasoma (medij z LPS in aktivatorji, brez peptidov)
- Kontrola DMSO kot inhibitorja (medij z LPS in aktivatorji ter z DMSO namesto peptidov; pri tej kontroli je bil volumski delež DMSO v mediju tolikšen, kot volumski delež najmanj koncentriranega peptida, torej vzorca z najvišjo koncentracijo DMSO)

3.2.5.4 Določanje koncentracije citokinov

Na odvzetih celičnih supernatantih smo s testom ELISA (angl. *Enzyme linked immunosorbent assay*) v skladu z navodili proizvajalca določili koncentracijo citokinov. Glavni parameter, ki smo ga spremljali, je bila koncentracija IL1 β (mouse IL-1 β ELISA Ready-SET-Go, eBioscience), določali pa smo tudi koncentracijo IL18 (mouse IL-18 Platinum ELISA, eBioscience).

Uporabljeni kiti s testi ELISA delujejo na principu zaznave želenega antiga v vzorcu z dvema primarnima protitelesoma, ki antigen vežeta v sendvič (Slika 6). Na regijo Fc vrhnjega protitelelesa se nato veže sekundarno protitelo, konjugirano s hrenovo peroksidazo, ki ob dodatku substrata katalizira tvorboobarvanega produkta. Izmerjena absorbanca tega produkta korelira s koncentracijo antiga. Koncentracijo lahko iz absorbance preračunamo na podlagi naklona standardne krivulje. Skupaj z vzorci namreč absorbanco določamo tudi vzorcem z zanimi koncentracijami želenega antiga (standardom), na podlagi katerih izrišemo standardno krivuljo.



Slika 6: Princip zaznave antigena pri testu ELISA

3.2.6 Spremljanje vpliva peptidov na aktivacijo kaspaze-1 pri inflamasomih NLRP3 in AIM2

3.2.6.1 Obarjanje proteinov

Za testiranje aktivacije kaspaze-1 smo naredili enak eksperiment kot v točkah od 3.2.5.1 do 3.2.5.3, le da smo ga izvedli v ploščah s 24 luknjicami. Aktivna kaspaza-1 se sicer nahaja v celicah, vendar se je nekaj iz celic tudi izloča, zato smo lahko določali njeno prisotnost v celičnem supernatantu. Aktivacijo kaspaze-1 smo spremljali s poliakrilamidno gelsko elektroforezo in z Western prenosom, za kar smo najprej oborili proteine. Ker je koncentracija proteinov v celičnem supernatantu razmeroma nizka, nismo ovrednotili količine celokupnih proteinov v supernatantu, ampak smo z dodatkom 1 mL metanola supernatantu celic (220 µL) in prekonočno inkubacijo na -80 °C oborili vse proteine iz supernatanta. Nato smo vzorce centrifugirali 1 h na 12000 vrt./min pri 4 °C. Odstranili smo supernatant in oborino za poliakrilamidno gelsko elektroforezo denaturirali v 30 µL vzorčnega pufra NaDS, ki je bil sestavljen iz 1 x NaDS v MQ z β-merkaptoetanolom in z 10-minutnim segrevanjem na 95 °C.

3.2.6.2 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata

Denaturirane proteine v vzorcih smo ločili po velikosti s tehniko poliakrilamidne gelske elektroforeze ob prisotnosti NaDS. V ta namen smo najprej pripravili poliakrilamidne gele. Glede na velikost kaspaze-1 smo se odločili za 15 % ločitveni gel in zanj zamešali ustreznarazmerja sestavin (Preglednica 4). Gel smo vlili med dve stekelci z 1 mm režo, vpeti v nosilni okvir in pričvrščeni na stojalu. Da smo izravnali površino gela, smo čezenj vlili tudi izopropanol, nato pa gel pustili na sobni temperaturi, da se je strdil. Zatem smo zamešali še 4 % vstopni gel (Preglednica 4) in ga vlili na strjeni ločitveni gel, s katerega smo predhodno odstranili izopropanol. Vanj smo vstavili glavničke za oblikovanje vdolbinic in

pustili, da je prišlo do zamreženja. Pripravljene gele smo hrаниli v hladilniku, zavite v mokre brisačke in folijo.

Pri izvedbi elektroforeze smo gele vpeli v nosilce in jih postavili v banjico, napolnjeno z 1 x elektroforeznim pufrom za poliakrilamidno gelsko elektroforezo (Preglednica 4). V posamezno luknjico na gelu smo nanesli 15 µL denaturiranega vzorca. Kot velikostni standard za proteine smo uporabili PageRuler Prestained Protein Ladder z lestvico od 10 do 250 kDa. Elektroforeza je potekala 40 min pri konstantni napetosti 200 V.

3.2.6.3 Western prenos na membrano

Nato smo z metodo po Westernu proteine z gela prenesli na nitrocelulozno membrano. V ta namen smo sestavili sendvič: gobica, filter papir, gel, membrana, filter papir, gobica in ga vpeli v košarico. Le-to skupaj z banjico ledu postavili v kaseto za Western prenos, napolnjeno s hladnim pufrom za Western prenos. Kaseto smo vstavili tako, da je bila stran z gelom obrnjena proti negativni elektrodi in stran z membrano proti pozitivni elektrodi.

V kaseto smo vstavili tudi magnetno mešalo, pod njo pa magnetni mešalnik. Prenos je potekal 1 h pri konstantnem toku 350 mA. Po končanem prenosu smo membrano blokirali v pufru I-Block (Preglednica 4), da bi prekrili morebitna nespecifična vezavna mesta. Blokada je potekala bodisi preko noči bodisi 1 h na sobni temperaturi.

3.2.6.4 Detekcija proteinov

Detekcija proteinov poteka s protitelesi po podobnem principu kot pri testu ELISA. Blokirano membrano smo spirali s pufrom za spiranje membrane (Preglednica 4) štirikrat po 5 minut ob stresanju na namiznem stresalniku. Membrano smo nato zapakirali v vrečke, vanjo dodali raztopino primarnega protitelesa – protitelesa proti fragmentu mišje kaspaze-1 (Preglednica 5) in jo 2 h inkubirali ob intenzivnem stresanju. Raztopino primarnega protitelesa smo pripravili z redčitvijo založnega protitelesa 1:1000 v pufru I-Block. Po inkubaciji smo membrano štirikrat po 5 minut spirali v pufru za spiranje membrane, jo ponovno zapakirali v vrečko in vanjo dodali raztopino sekundarnega protitelesa - proti mišjem IgG, konjugiranim s hrenovo peroksidazo (Preglednica 5). Sekundarno protitelo smo pripravili z redčitvijo založnega protitelesa 1:3000 v pufru I-Block. Membrano smo ob intenzivnem stresanju inkubirali 1,5 h in ponovili postopek spiranja. Kaspazo-1 na membrani smo vizualizirali z reagentom SuperSignal West Femto, ki smo ga pripravili po navodilih proizvajalca in ga za 5 min kanili na membrano, pri čemer smo pazili, da se membrana ni izsušila. Membrano smo slikali z napravo G:BOX in sliko obdelali v programu GeneTools.

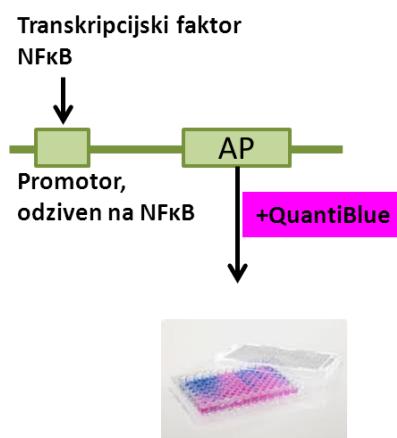
3.2.7 Spremljanje vpliva peptidov na signalno pot NFκB

3.2.7.1 Določanje koncentracije TNF α

TNF α je citokin, ki je podobno kot proIL1 β neposredni produkt poti NFκB, vendar je aktivien in se izloča iz celic. Supernatantom iz točke 5.2.4.3 smo določili še koncentracijo TNF- α . Njegovo koncentracijo smo določali s testom ELISA (mouse TNF alpha ELISA Ready-SET-Go!).

3.2.7.2 Uporaba rekombinantnih makrofagov RAW-Blue v kombinaciji s substratom QUANTIBlue

Makrofagi RAW-Blue vsebujejo gen za alkalno fosfatazo (AP-1) pod promotorjem, odzivnim na NFκB in AP-1 (Slika 7). Če je v vzorcu prisotna aktivna oblika NFκB se alkalna fosfazata prepisuje in izloča v gojišče, njeno aktivnost pa lahko merimo z dodatkom substrata QUANTI-Blue, ki ob prisotnosti alkalne fosfataze spremeni barvo iz rožnate v vijolično.



Slika 7: Princip delovanja testa QUANTIBlue

Poskus z makrofagi RB smo zastavili tako, da smo celice najprej inkubirali z 80 μ L peptidov v ustrezeni koncentraciji, nato pa brez menjave medija dodali LPS (končna koncentracija 25 ng/mL) in celice inkubirali preko noči. Zjutraj smo po navodilih proizvajalca izvedli test QUANTI-Blue. 50 μ L celičnega supernatanta smo prenesli v novo mikrotitrsko ploščico in dodali 150 μ L substrata QUANTIBlue, ki smo ga predhodno raztopili v vodi v koncentraciji 1,5 g/100 mL in segrevali 0,5 h na 37 °C. Celični supernatant in substrat QUANTIBlue smo nato inkubirali 0,5-1 h na 37 °C, nato pa pomerili absorbanco pri valovni dolžini 630 nm (A_{630}).

Pri tem eksperimentu smo uporabili sledeče kontrole:

- Kontrola ozadja (medij brez LPS in peptidov)
- Kontrola aktivacije NF κ B poti (medij z LPS, a brez peptidov)
- Kontrola DMSO kot inhibitorja (medij z LPS ter z DMSO namesto peptidov; pri tej kontroli je bil volumski delež DMSO v mediju tolikšen, kot volumski delež najmanj koncentriranega peptida, torej vzorca z najvišjo koncentracijo DMSO)

3.2.7.3 Dvojni luciferazni test na transficiranih celicah HEK293T

Celice HEK293T ne vsebujejo endogenega TLR4 in drugih komponent poti NF κ B, zato smo jih prehodno transficirali s plazmidi, ki vsebujejo gene za te komponente. Plazmide smo zmešali v mediju OPTIMEM. Za transfekcijo smo uporabili transfekcijski reagent Lipofectamine 2000, ki smo ga redčili z medijem OPTIMEM v volumskem deležu 0,5 μ L/25 μ L. Tako pripravljen transfekcijski reagent smo v razmerju 1:1 zmešali s 25 μ L mešanice plazmidov za 20 min, nato pa mešanico dodali celicam. Celice smo preko noči inkubirali v celičnem inkubatorju.

Preglednica 13: Količine komponent za prehodno transfekcijo celic HEK293T

	Količina v luknjici
Plazmidna DNA (darilo C. Kirshninga)	
TLR4 (ng)	1
MD2/CD14 (ng)	1
NF κ B luc (ng)	50
Renilla luc (ng)	5
OPTIMEM (μ L)	do 25
Lipofectamine 2000 (μ L)	0,5
OPTIMEM (μ L)	23,5
Končni volumen v luknjici (μ L)	50

Celicam samo naslednji dan previdno odsesali medij (celice HEK293T se slabše pritrjajo) in nanje za 0,5 h nanesli 80 μ L peptidov v različnih koncentracijah. Zatem smo celicam dodali 20 μ L LPS v končni koncentraciji 10 ng/mL in jih inkubirali preko noči.

Pri tem eksperimentu smo uporabili sledeče kontrole:

- Kontrola ozadja (medij brez LPS in peptidov)
- Kontrola aktivacije NF κ B poti (medij z LPS, a brez peptidov)
- Kontrola DMSO kot inhibitorja (medij z LPS ter z DMSO namesto peptidov; pri tej kontroli je bil volumski delež DMSO v mediju tolikšen, kot volumski delež najmanj koncentriranega peptida, torej vzorca z najvišjo koncentracijo DMSO)

Naslednji dan smo celicam odsesali medij in v luknjice nanesli po 20 µL pufra 1x Passive Lysis Buffer (Preglednica 4). Tako pripravljeno ploščo smo zamrznili na -20 °C. Luminescenco smo spremljali na čitalcu mikrotitrskih plošč, in sicer najprej luminescenco, ki nastane pri reakciji med luciferinom in luciferazo iz kresničke, ki se v našem primeru izraža odvisno od NFκB, nato pa še luminescenco reakcije koelenterazina in luciferaze Renilla iz zelenega trdoživa (*Renilla reniformis*), ki se izraža konstitutivno. Prikazujemo normalizirane vrednosti, ki jih dobimo tako, da delimo vrednost luminescence prve reakcije z vrednostjo druge reakcije v isti jamici.

3.2.8 Spremljanje preživelosti celic

Živost celic po vsakem eksperimentu smo spremljali s kolometričnim testom XTT, ki meri metabolno aktivnost celic. Test meri pretvorbo tetrazolne soli 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolni-5-karboanilida (XTT) v topen, oranžno obarvan produkt formazan. Pretvorbo izvajajo aktivno respirajoče celice, zato je intenziteta obarvanega produkta indikator metabolne aktivnosti oz. viabilnosti celic.

Po vsakem končanem eksperimentu smo v luknjice celicam, ki smo jim odstranili supernatant, nanesli 100 µL DMEM brez fenol rdečega, nato pa dodali še po 50 µL mešanice XTT in fenazin metosulfata (PMS). Mešanico smo pripravili z 50 µL raztopine PMS in 5 mL raztopine XTT, ki smo ju raztopili v MQ v skladu z navodili proizvajalca. Po 2 h smo pomerili absorbanco pri valovni dolžini 490 nm (A₄₉₀).

4 REZULTATI

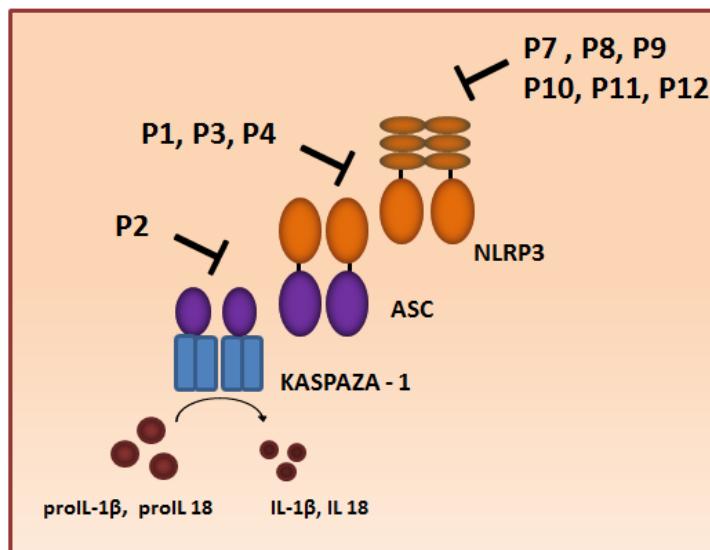
4.1 NAČRTOVANJE PEPTIDOV

4.1.1 Izbira peptidov

V magistrski nalogi smo želeli načrtovati in testirati peptidne inhibitorje inflamasoma NLRP3. V ta namen smo v skladu s kriteriji iz točke 2.3 načrtovali dve vrsti peptidov:

- Peptide, ki posnemajo motive iz interakcijskih regij PYD in CARD proteinov inflamasoma. Tako so bili izbrani peptidi P1-P4 (Slika 8).
- Peptide, ki posnemajo regije NLRP3, kjer se pojavljajo mutacije, ki povzročajo periodične vročinske sindrome v povezavi s kriopirinom. Tako so bili izbrani peptidi P7 - P12 (Slika 8).

V nadaljevanju utemeljujemo izbiro posameznih peptidov.



Slika 8: Grafični prikaz vezavnih tarč kandidatnih peptidnih inhibitorjev

4.1.2 Peptidi iz interakcijskih regij proteinov inflamasoma

Peptide P1-P4 smo izbrali iz interakcijskih regij proteinov inflamasoma, pri čemer smo si pomagali z dostopnimi kristalnimi zgradbami proteinov, udeleženih v inflamasom (Slika 9). Peptide smo načrtovali, preden so bile objavljene interakcijske študije, ki so identificirale aminokisline, kritične za interakcije PYD-PYD ali CARD-CARD. Peptid P1 izhaja iz endogenega človeškega inhibitorja POP2, peptid P2 iz domene CARD mišjega ASC, peptid P3 iz domene PYD mišjega ASC in peptid P4 iz domene PYD mišjega NLRP3. Peptidi so izbrani v regijah, ki so zelo ohranjene, tako da med mišjim in človeškim zaporedjem v teh regijah ni velikih razlik. Za peptide P1-P4 smo predpostavili, da bodo inhibirali interakcijska mesta med proteini inflamasoma, pri čemer bodo njihove tarče vezavni partnerji proteinov, iz katerih izhajajo (Preglednica 14, Slika 8).

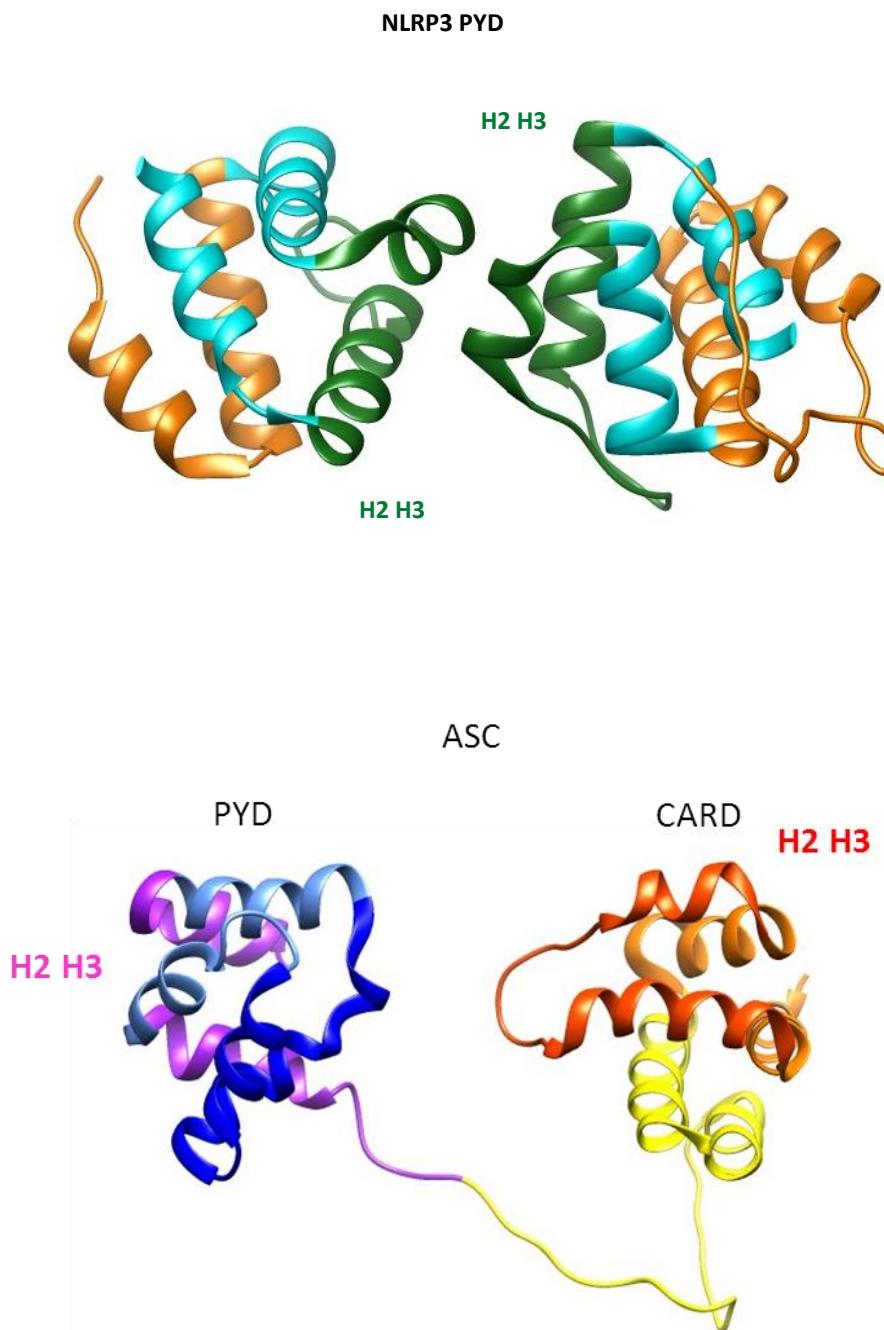
Peptid P1 smo izbrali iz proteina POP2, človeškega endogenega inhibitorja inflamasoma, za katerega so pokazali, da lahko negativno regulira delovanje več inflamasomov NLR z vezavo na domeno PYD njihovih senzorjev, med drugim tudi NLRP3 (Atianand in sod., 2011). Pokazali so, da je za povezavo POP2 z NLR ključna vijačnica H1. Na podlagi te študije smo peptid P1 izbrali iz vijačnice H1 in predpostavili, da se bo vezal na domeno PYD NLRP3 ter tako onemogočal interakcije PYD-PYD med NLRP3 in ASC (Preglednica 14, Slika 8).

Peptid P2 in P3 smo izbrali na podlagi študij De Alba (2009) ter Srimathija in sod. (2008). De Alba (2009) je z uporabo NMR visoke ločljivosti osvetlila strukturo proteina ASC in pokazala, da ASC sestoji iz dveh domen, sestavljenih iz šestih vijačnic (domen PYD in CARD), ki sta med seboj povezani z gibljivim povezovalcem iz 23 aminokislinskih ostankov (Slika 9 spodaj). Domeni PYD in CARD sta med seboj neodvisni in obrnjeni s hrbitom (delom domene, ki se stika s povezovalcem) druga proti drugi, kar preprečuje medsebojno sterično oviranje domen in omogoča dovolj prostora za simultano vezavo več proteinov v supramolekularni kompleks. Z vidika naboja aminokislinskih ostankov je domena PYD proteina ASC podobno kot druge domene PYD iz družine DD močno polarizirana. ASC se z NLRP3 domnevno poveže s pozitivno nabitimi vijačnicami H2 in H3 svoje domene PYD (Srimathi in sod., 2008). Iz teh vijačnic smo zato izbrali peptid P3 ter predpostavili, da bo z vezavo na PYD NLRP3 inhibiral interakcije PYD-PYD med NLRP3 in ASC. Glede na to, da se ASC v domeni PYD povezuje tudi z AIM2, bi se teoretično peptid P3 lahko vezal tudi na AIM2 in inhibiral inflamasom AIM2. Vpliv peptida P3 na sestavljanje inflamasoma NLRC4 težko predvidimo, saj prisotnost proteina ASC ni nujno potrebna za sestavljanje inflamasoma NLRC4 (Preglednica 14, Slika 8).

Domena CARD proteina ASC ima v primerjavi z drugimi domenami CARD, ki imajo dva jasno ločena nasprotno nabita predela, več manjših, enakomerno posejanih pozitivno in negativno nabitih predelov (De Alba, 2009). Palacios-Rodriguez in sod. (2011) so na primeru proteina APAF-1, ki je udeležen v apoptozo in ki tudi deluje preko interakcij CARD-CARD, pokazali, da domene CARD v velikih koncentracijah lahko delujejo kot inhibitorji, prav tako pa so inhibitoren učinek pokazali tudi za kratke peptide iz domen CARD. Peptid P2 smo izbrali iz domene CARD ASC, in sicer iz vijačnic H2 in H3, kjer se nahajajo nekateri ohranjeni aminokislinski ostanki, ki so skupni tako APAF-1 kot tudi ASC. Za peptid P2 smo predvidevali, da se bo vezal na domeno CARD prokaspaze-1 in inhibiral interakcije CARD-CARD med ASC in prokaspazo-1. Ker so interakcije CARD-CARD s prokaspazo-1 prisotne tudi pri sestavljanju inflamasomov AIM2 in NLRC4, pričakujemo, da bo imel peptid P2 poleg inhibicije inflamasoma NLRP3 tudi inhibitoren vpliv na ta dva inflamasoma (Preglednica 14, Slika 8).

Peptid P4 smo izbrali na podlagi študije Bae in Parka (2011), ki sta objavila kristalno zgradbo domene PYD proteina NLRP3. V kristalni zgradbi je domena PYD NLRP3 prisotna v obliki dimera (Slika 9 zgoraj). Ker NLRP3 v fizioloških pogojih običajno nastopa kot monomer, Bae in Park dopuščata možnost, da prisotnost dimera ni biološko relevantna, temveč posledica kristalizacije. Vseeno pa je prisotnost dimera lahko indikator, da so v tem predelu možne interakcije PYD-PYD. Domena PYD NLRP3 nima izrazito polariziranih nabitih predelov, ampak so ti enakomerno razporejeni po celi površini domene PYD (Bae in Park, 2011). V njej sta opazni tudi dve ohranjeni in izrazito hidrofobni jedri. Ti dve ugotovitvi nakazujeta na pomembnost tako elektrostatskih kot tudi hidrofobnih interakcij v povezovanju domen PYD NLRP3 z drugimi proteini.

Znotraj dimera se domeni PYD stikata v vijačnicah H2 in H3, ta segment pa ima tudi največji faktor fleksibilnosti (faktor B), kar nakazuje, da bi ta predel lahko sodeloval pri specifičnosti interakcij. Na podlagi teh indicev smo iz vijačnic H2 in H3 izbrali peptid P4. Predpostavljam, da bo njegova primarna tarča vezavno mesto domene PYD NLRP3 na domeni PYD ASC in da bo na tak način P4 inhibiral interakcije PYD-PYD med tema dvema proteinoma (Preglednica 14, Slika 8). V skladu s tem pričakujemo tudi razmeroma veliko specifičnost inhibicije za inflamasom NLRP3. Podrobni opis načrtovanja peptidov P1-P4 se nahaja v Brili (2015).



Slika 9: Kristalna zgradba domene PYD proteina NLRP3 (zgoraj) (Bae in Park, 2011) in proteina ASC (spodaj) (De Alba, 2009)

Preglednica 14: Kandidatni peptidni inhibitorji iz interakcijskih regij inflamasoma in njihove domnevne tarče

Peptid	Aminokislinsko zaporedje (N-terminalni konec → C-terminalni konec)	Izvorna regija	Domnevna tarčna regija	Domnevno inhibirani inflamasom
P1	WGGMASSAELDFNLQALLEQLSQDEK	Človeški POP2, H1	ASC, PYD	NLRP3
P2	WGGVDGVLDALHGSQLTEGQQYQAVRK	Mišji ASC, CARD, H2 H3	Prokaspaza-1, CARD	NLRP3, AIM2, NLRC4
P3	WGGGDELKKFKMKLTVQLREGYGRIPRGALLQK	Mišji ASC, PYD, H2 H3	NLRP3, PYD	NLRP3, AIM2 mogoče NLRC4
P4	WGGDVDLKKFKMHLEDYPPEKGCIKVPRGQMEKA DK	Mišji NLRP3, PYD, H2 H3	ASC, PYD	NLRP3

Preglednica 15: Biokemijske lastnosti kandidatnih peptidnih inhibitorjev iz interakcijskih regij inflamasoma (GeneScript, 2015)

Peptid	Izoelektrična točka PI	Analiza hidrofobnosti	Celokupni naboј	Kislost/ Bazičnost
P1	3,64	WGGMASSAELDFNLQALLEQLSQDEK	-4	Kisel
P2	5,52	WGGVDGVLDALHGSQLTEGQQYQAVRK	0	Nevtralen
P3	10,99	WGGGDELKKFKMKLTVQLREGYGRIPRGALLQK	5	Bazičen
P4	7.36	WGGDVDLKKFKMHLEDYPPEKGCIKVPRGQMEKA DK	1	Bazičen

Opomba: Rdeče so obarvani kisi aminokislinski ostanki (npr. D, E); modro so obarvani bazični aminokislinski ostanki (npr. R, K, H); zeleno pa hidrofobni, nenabiti aminokislinski ostanki (npr. F, I, L, M, V, W, A, P). Preostali aminokislinski ostanki (npr. G, S, T, C, N, Q, P) so obarvani črno. Podčrtani so aminokislinski ostanki, ki so v izvornem proteinu glede na literaturo ključni za interakcije PYD-PYD oz. CARD-CARD.

4.1.3 Peptidi iz regij NLRP3 s patološkimi mutacijami

Peptide P7-P12 smo izbrali iz regije NACHT NLRP3 oz. domen v bližini NACHT (NAD, angl. *NACHT-associated domain*) (Preglednica 16). V tej domeni se nahajajo motivi, pomembni za vezavo nukletidov, mednje pa so umeščena mesta, kjer so pri boleznih, kot so periodični vročinski sindromi v povezavi s kriopirinom prisotne mutacije (Infevers, 2014).

Peptide P7, P9 in P10 smo izbrali iz motivov, pomembnih za vezavo in hidrolizo nukleotidov npr. ATP (MacDonald in sod., 2013) (Preglednica 16). Peptid P7 izhaja iz

začetka domene NACHT in vsebuje motiv Walker A, za katerega je značilna t.i. zanka P (angl. *P-loop*), ki se ovije okoli fosfatne skupine vezanega nukleotida. Peptid P9 vsebuje motiv Walker B, ki s koordinacijsko vezjo veže Mg²⁺ odgovoren za hidrolizo nukleotidov. Peptid P10 vsebuje senzorsko mesto za ATP, saj veže γ-fosfat nukleotidov in lahko razlikuje med ADP in ATP.

Peptide P8, P11 in P12 pa smo izbrali iz regij, umeščenih med motive za vezavo nukletidov. Albrecht in sod. (2003) pokazali, da se večina mutacij v tem predelu NLRP3 nahaja v gručah. Patologija mutacij nakazuje na udeležbo teh regij v aktivacijo inflamasoma NLRP3. Peptid P8 izvira iz regije med motivoma Walker A in Walker B. P11 in P12 pa izvirata iz regije NAD1 in NAD3 (Preglednica 16).

Pri peptidih iz regije NACHT NLRP3 je težje predvideti njihov vpliv na sestavljanje inflamasoma NLRP3. Glede na to, da izhajajo iz domene NACHT, ki je odgovorna za oligomerizacijo inflamasoma NLRP3, bi lahko bodisi posnemali delovanje monomerov NLRP3 in dodatno aktivirali inflamasom, bodisi z vezavo sterično preprečili oligomerizacijo NLRP3 in inhibirali inflamasom. Lahko bi se tudi vezali bodisi na motive za vezavo nukleotidov v regiji NACHT, bodisi na nukleotid sam in tako inhibirali sestavo inflamasoma NLRP3.

Preglednica 16: Kandidatni peptidni inhibitorji iz regij NLRP3 s patološkimi mutacijami in njihove domnevne tarče

Peptid	Aminokislinsko zaporedje (N-terminalni konec → C-terminalni konec)	Izvorna regija	Domnevna tarčna regija	Domnevno inhibirani inflamasom
P7	WGGMASSEALDFNLQALLEQLSQDEK	Motiv Walker A	?	NLRP3
P8	WGGDYLFFIHCREVSLRTP	Domena med motivoma Walker A in Walker B	?	NLRP3
P9	WGGMDGFDELQGAFDEHIGEV	Motiv Walker B	?	NLRP3
P10	WGGTTRPVALEKLQHLLDH	Senzor 1R	?	NLRP3
P11	WGGSLAQTSKTTAVYVFFLSSLL	Domena NAD1	?	NLRP3
P12	WGGLENYGKFEKGYLIFVVVRFLFGLVNQERTSYLEKK	Domena NAD3	?	NLRP3

Preglednica 17: Biokemijske lastnosti kandidatnih peptidnih inhibitorjev iz regij NLRP3 s patološkimi mutacijami (GeneScript, 2015)

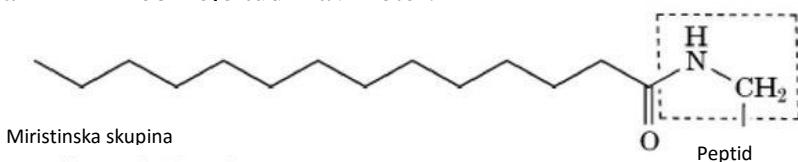
Peptid	Izoelektrična točka PI	Analiza hidrofobnosti	Celokupni naboj	Kislost/ Bazičnost
P7	3,64	WGGMASSAELDFNLQALLEQLSQDEK	-4	Kisel
P8	7,36	WGGDYLFFIHCREVSLRTP	1	Bazičen
P9	3,53	WGGMMDGFDELQGAFDEHIGEV	-5	Kisel
P10	7,72	WGTTTRPVVALEKLQHLLDH	2	Bazičen
P11	9,30	WGGS LAQTSKTTTAVYVFFLSSLL	1	Bazičen
P12	9,66	WGGLENYGKFEKGYLIFVVVRFLFGLVNQERTSYLEKK	2	Bazičen

Opomba: Rdeče so obarvani kisli aminokislinski ostanki (npr. D, E); modro so obarvani bazični aminokislinski ostanki (npr. R, K, H); zeleno pa hidrofobni, nenabiti aminokislinski ostanki (npr. F, I, L, M, V, W, A, P). Preostali aminokislinski ostanki (npr. G, S, T, C, N, Q, P) so obarvani črno.

4.1.4 Opremljanje peptidov

Peptidi imajo naboj, zato smo predvidevali, da bodo težko prehajali skozi celično membrano. Iz tega razloga smo izbrane peptide opremili za prehod membrane, in sicer z miristinsko skupino na N-terminalnem delu peptida. Aminokislinski ostanek triptofan (W) smo dodali, da lahko spremljamo koncentracijo peptida z merjenjem absorbance. Med triptofanom in začetkom inhibitornega zaporedja smo zaradi preprečevanja steričnih ovir vstavili še dva glicina (G). Na C-terminalni konec smo vstavili še lizin (K) za morebitno kasnejše pripenjanje fluorescenčnih oznak za vizualizacijo peptida znotraj celic.

Za transport peptidov čez membrano se na peptid lahko pripne več različnih skupin npr. palmitinsko kislino, acilne fosfolipide ali pa miristinsko skupino, ki omogoča najuspešnejši prehod peptidov v celice (Avbelj in sod., 2011). Miristinska modifikacija oz. miristat izhaja iz hidrofobne maščobne kisline iz 14 ogljikov (miristinske kisline) (Slika 10). Vstop peptida z miristinsko skupino v celico se začne z vpenjanjem miristata v lipidni dvosloj membrane, pri mehanizmu nadaljnjega vstopa pa si raziskovalci niso enotni. Nekateri podpirajo endocitozno pot, drugi pa so podporniki t.i. flip-flop difuzije (Nelson in sod., 2007). Pri tej se peptid preko miristata pripne na lipid in se z njim preobrne na notranjo fosfolipidno stran. Lipidi v fluidnem modelu membrane se namreč poleg lateralnega premikanja občasno obrnejo tudi navznoter.



Slika 10: Peptid opremljen z miristinsko skupino

4.2 PEPTIDI IZ INTERAKCIJSKIH REGIJ INFLAMASOMA NLRP3

4.2.1 Spremljanje vpliva peptidov na sestavljanje inflamasoma NLRP3

4.2.1.1 Spremljanje količine izločenih citokinov

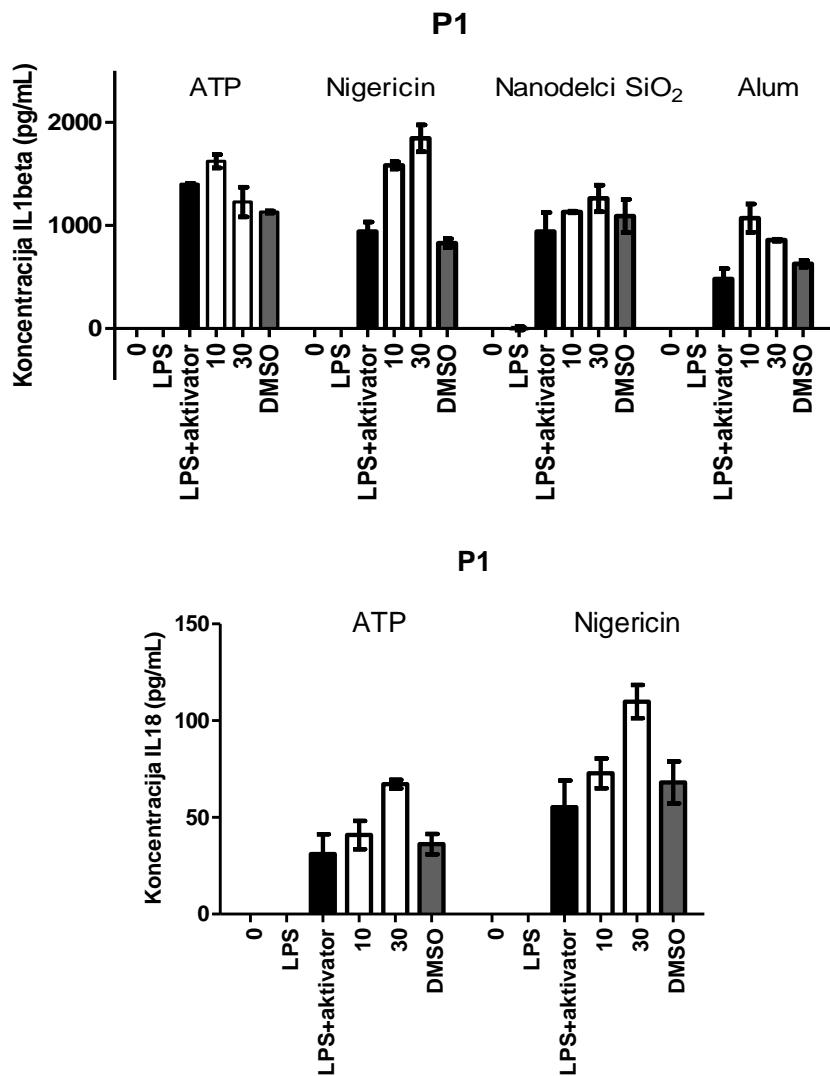
Slike 11, 12, 13 in 14 prikazujejo vpliv inkubacije makrofagov s peptidi P1, P2, P3 in P4 iz interakcijskih regij inflamasoma NLRP3 na koncentracijo izločenega IL1 β ob aktivaciji inflamasoma NLRP3 z različnimi topnimi in partikularnimi aktivatorji. Izmed peptidov iz interakcijskih regij so inhibitorni vpliv na izločanje IL1 β izkazovali peptidi P2, P3 in P4, peptid P1 pa je izločanje IL1 β v nasprotju s pričakovanji dodatno stimuliral.

Peptid P1, ki izhaja iz POP2, endogenega človeškega inhibitorja inflamasoma NLRP3, je povečal izločanje IL1 β pri vseh testiranih aktivatorjih, a brez izrazite koncentracijske odvisnosti (Slika 11). Opažena dodatna stimulacija inflamasoma bi lahko bila posledica vezave P1 na izvorni endogeni inhibitor POP2 namesto na tarčno domeno PYD proteina ASC. Peptid P1 bi na tak način inhibiral endogeno inhibicijo inflamasoma NLRP3, s tem pa povečal aktiviranost inflamasoma. Glede na to, da smo poskuse izvajali na mišjih makrofagih, je ta teorija manj verjetna, saj raziskave kažejo, da miši nimajo endogenih inhibitorjev in da se je kompleksna negativna regulacija inflamasoma s proteini POP in COP pojavila šele pri opicah Starega sveta (Atianand in sod., 2012). Druga možna razloga za dodatno stimulacijo inflamasoma je, da peptid P1 posnema delovanje domene PYD NLRP3 in z vezavo na ASC sproži spontano oligomerizacijo proteina ASC. Ozadja dodatne stimulacije inflamasoma s peptidom P1 nismo dalje raziskovali, saj smo se osredotočili na inhibitorne peptide.

Peptidi P2, P3 in P4 so v koncentracijski odvisnosti inhibirali izločanje IL1 β pri aktivaciji z ATP, nigericinom in nanodelci SiO₂. Izmed teh peptidov sta peptid P2 iz domene CARD ASC in peptid P3 iz domene PYD ASC najbolj učinkovito in pri najnižjih koncentracijah inhibirala sintezo IL1 β (Slike 12 in 13). Peptid P2 je pri večini aktivatorjev 50 % inhibicijo izločanja IL1 β dosegel že pri koncentraciji 20 μ M, peptid P3 pa pri 30 μ M.

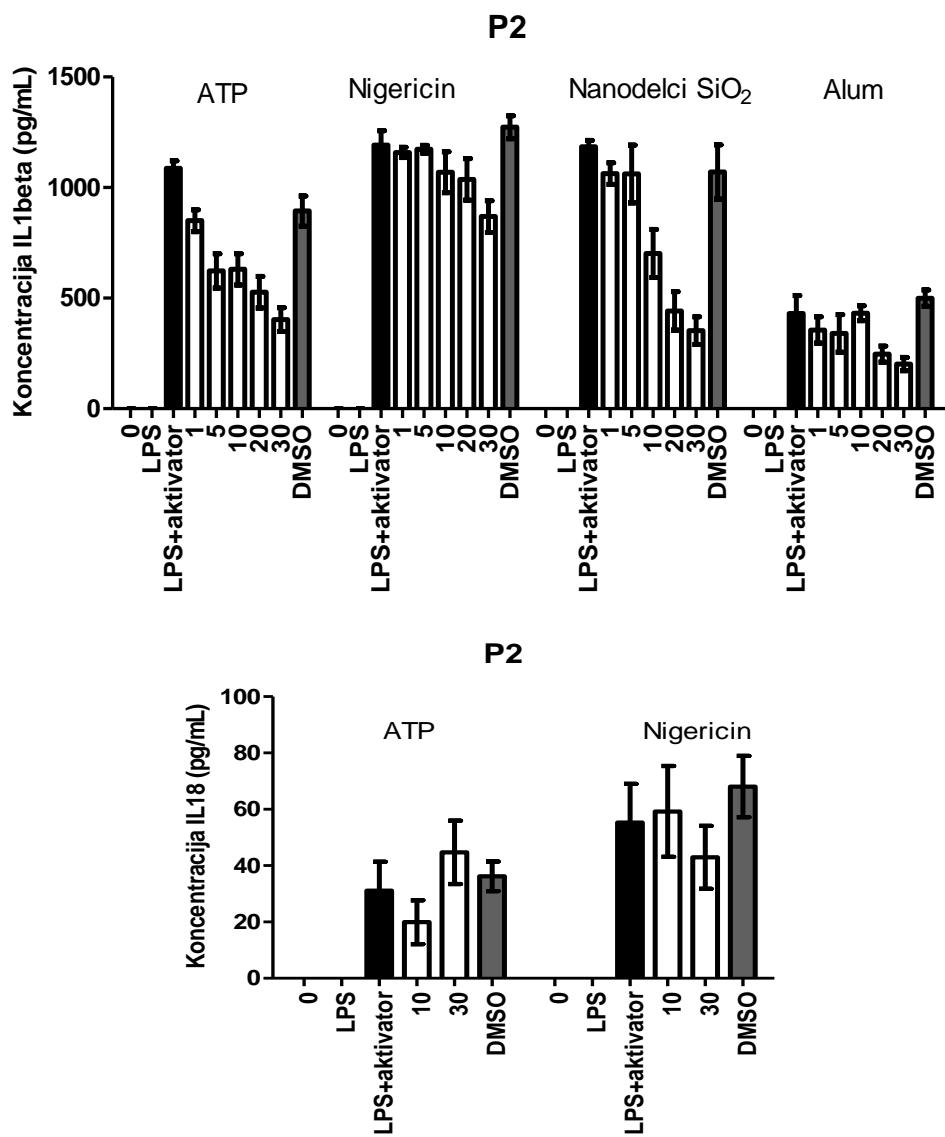
Močan inhibitorni potencial peptida P2 nakazuje, da ta vsebuje aminokislinske ostanke, ki so pomembni za interakcije CARD-CARD med ASC in prokaspazo-1, vendar interakcijska študija, ki bi z mutagenezo aminokislinskih ostankov osvetlila interakcije med temi dvema proteinoma, še ni bila objavljena. Za interakcije PYD-PYD med proteinoma ASC in NLRP3 pa so Vajjhala in sod. (2012) identificirali pet ključnih aminokislinskih ostankov, brez katerih se interakcije ne tvorijo. Peptid P3 vsebuje dva izmed teh ostankov (K21 in R41, Preglednica 15 podčrtano). Zanimivo je, da se preostali trije ključni aminokislinski

ostanki (D48, D51, E13) nahajajo na nasprotni strani proteina ASC, kar nakazuje, da sta vsaj dve različni vezavni mesti kritični za interakcijo med NLRP3 in ASC. To bi lahko pojasnilo, zakaj peptid P3 ni zmožen popolne inhibicije sestave inflamasoma NLRP3.



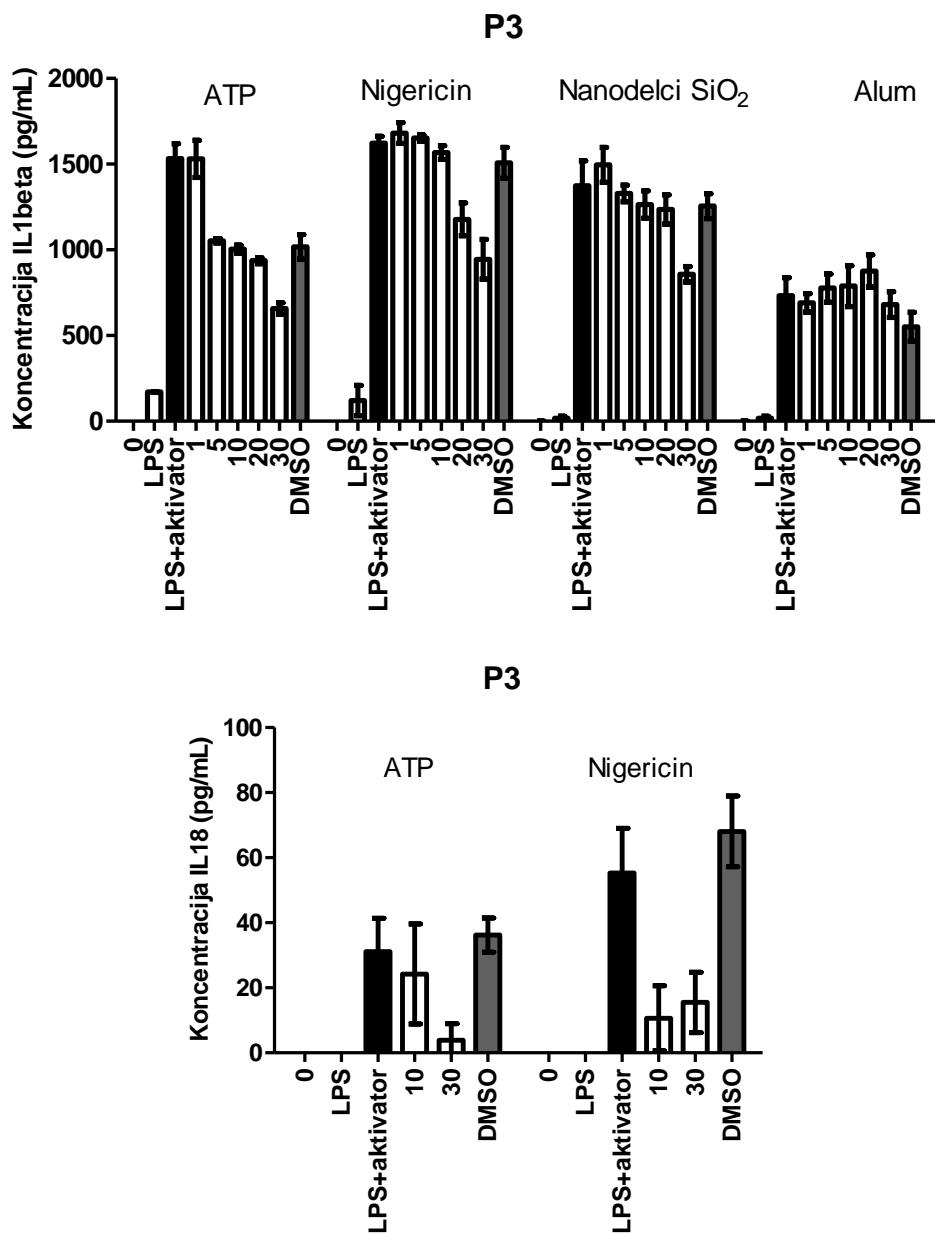
Slika 11: Vpliv peptida P1 na količino izločenega IL1 β (zgoraj) in IL18 (spodaj)

Beli stolpci prikazujejo odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem ob prisotnosti različnih koncentracij peptida P1, navedenih v μ M. Kot kontrolo ozadja navajamo odziv nestimuliranih celic (0), kot kontrolo prvega signala aktivacije odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS (LPS), kot kontrolo drugega signala aktivacije pa odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem (LPS+aktivator). Kot kontrolo inhibitornosti DMSO navajamo odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem, kjer je namesto peptidov prisoten DMSO, in sicer v največjem uporabljenem volumskem deležu (DMSO). Prikazujemo povprečno vrednost s standardnim odklonom, izračunano iz 3 paralelk.



Slika 12: Vpliv peptida P2 na količino izločenega IL1 β (zgoraj) in IL18 (spodaj)

Beli stolpci prikazujejo odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem ob prisotnosti različnih koncentracij peptida P2, navedenih v μM . Kot kontrolo ozadja navajamo odziv nestimuliranih celic (0), kot kontrolo prvega signala aktivacije odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS (LPS), kot kontrolo drugega signala aktivacije pa odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem (LPS+aktivator). Kot kontrolo inhibitornosti DMSO navajamo odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem, kjer je namesto peptidov prisoten DMSO, in sicer v največjem uporabljenem volumskem deležu (DMSO). Prikazujemo povprečno vrednost s standardnim odklonom, izračunano iz 3 paralelk.



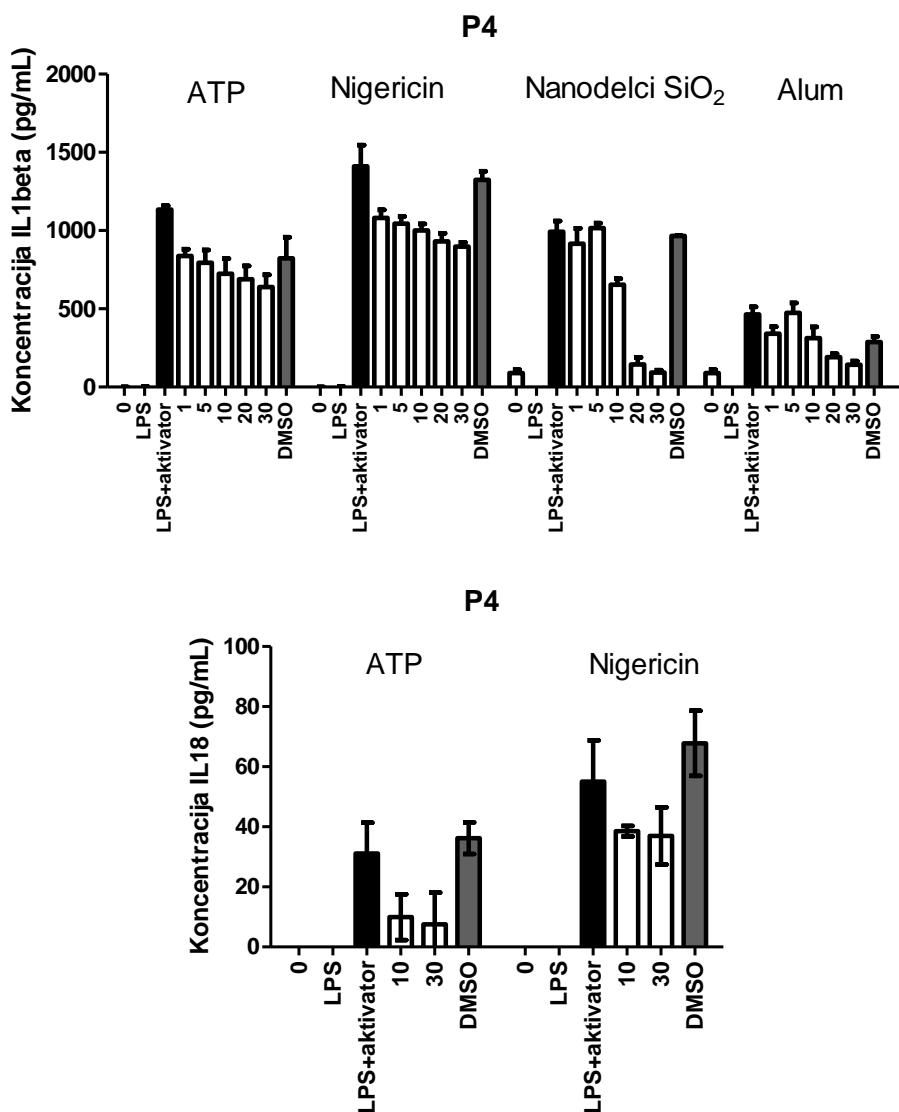
Slika 13: Vpliv peptida P3 na količino izloženega IL1 β (zgoraj) in IL18 (spodaj)

Beli stolpci prikazujejo odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem ob prisotnosti različnih koncentracij peptida P3, navedenih v μ M. Kot kontrolo ozadja navajamo odziv nestimuliranih celic (0), kot kontrolo prvega signala aktivacije odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS (LPS), kot kontrolo drugega signala aktivacije pa odziv, celic stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem (LPS+aktivator). Kot kontrolo inhibitornosti DMSO navajamo odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem, kjer je namesto peptidov prisoten DMSO, in sicer v največjem uporabljenem volumskem deležu (DMSO). Prikazujemo povprečno vrednost s standardnim odklonom, izračunano iz 3 paralelk.

Inhibitorni potencial peptida P4 se je najbolje odrazil pri partikularnih aktivatorjih inflamasoma (nanodelci SiO_2 in aluminijeve soli), šibkeje pa pri topnih (ATP in nigericin) (Slika 14). Peptid P4 je pri aktivaciji s partikularnimi aktivatorji 50 % inhibicijo izločanja IL1 β dosegel že pri koncentraciji peptida med 10 in 20 μM , medtem ko je bila pri aktivaciji s topnimi aktivatorji inhibicija izločanja IL1 β tudi pri največji koncentraciji peptida 30 μM le 30 %. Peptid P4 vsebuje 4 od 6 aminokislinskih ostankov, in sicer K23, K24, M27 in R43 (preostali so E64, D82), ki so ključni oz. imajo velik vpliv na interakcijo PYD-PYD med NLRP3 in ASC (Preglednica 15 podčrtano) (Lu in sod., 2014). Zanimivo je, da sta proteinoma NLRP3 in ASC skupna dva ključna aminokislinska ostanka za interakcijo PYD-PYD, in sicer K23 oz. K21 in R43 oz. R41. Oba smo zajeli v peptidih P3 in P4.

Pri peptidih iz interakcijskih regij nismo opazili večje odvisnosti od tipa aktivatorja inflamasoma, saj so inhibitorno delovanje na inflamasom NLRP3 izkazovali pri vseh testiranih aktivatorjih inflamasoma. Ker so aluminijeve soli v primerjavi z ATP, nigericinom in nanodelci SiO_2 le šibko aktivirale inflamasom, smo aktivacijo inflamasoma z aluminijevimi solmi pri nadaljnjih eksperimentih opustili. Neodvisnost inhibicije od aktivatorjev smo pričakovali, saj peptidi izhajajo iz interakcijskih domen inflamasoma in ne iz senzorskih domen. Predpostavljam to, da peptidi preferenčno inhibirajo sestavo inflamasoma z motenjem interakcij PYD-PYD in CARD-CARD, ne pa že v začetni stopnji sestave inflamasoma, z motenjem vezave aktivatorjev oz. oligomerizacije NLRP3.

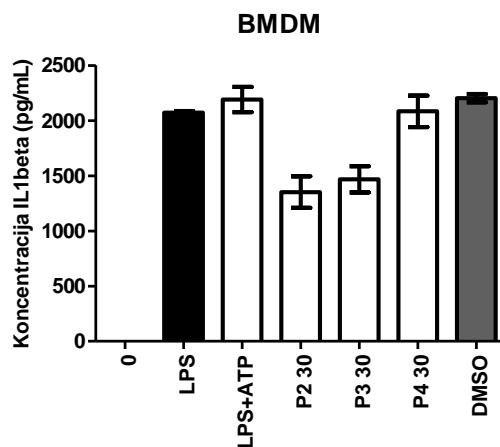
Poleg inhibicije IL1 β smo pri večini inhibitornih peptidov pokazali tudi inhibicijo izločanja IL18 (Slike 11 spodaj do 14 spodaj), vendar so bile količine izločenega IL18 ob enakih pogojih inkubacije precej nižje od IL1 β .



Slika 14: Vpliv peptida P4 na koncentracijo izločenega IL1 β (zgoraj) in IL18 (spodaj)

Beli stolci prikazujejo odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem ob prisotnosti različnih koncentracij peptida P4, navedenih v μ M. Kot kontrolo ozadja navajamo odziv nestimuliranih celic (0), kot kontrolo prvega signala aktivacije odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS (LPS), kot kontrolo drugega signala aktivacije pa odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem (LPS+aktivator). Kot kontrolo inhibitornosti DMSO navajamo odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem, kjer je namesto peptidov prisoten DMSO, in sicer v največjem uporabljenem volumskem deležu (DMSO). Prikazujemo povprečno vrednost s standardnim odklonom, izračunano iz 3 paralelk.

Relevantnost rezultatov v *in vivo* pogojih smo ugotavljali s ponovitvijo eksperimentov na primarnih celičnih linijah - mišjih makrofagih, izoliranih iz kostnega mozga (BMDM). Na teh celicah smo lahko potrdili inhibitorni vpliv peptidov P2 in P3 na inflamasom NLRP3, ne pa tudi peptida P4 (Slika 15).

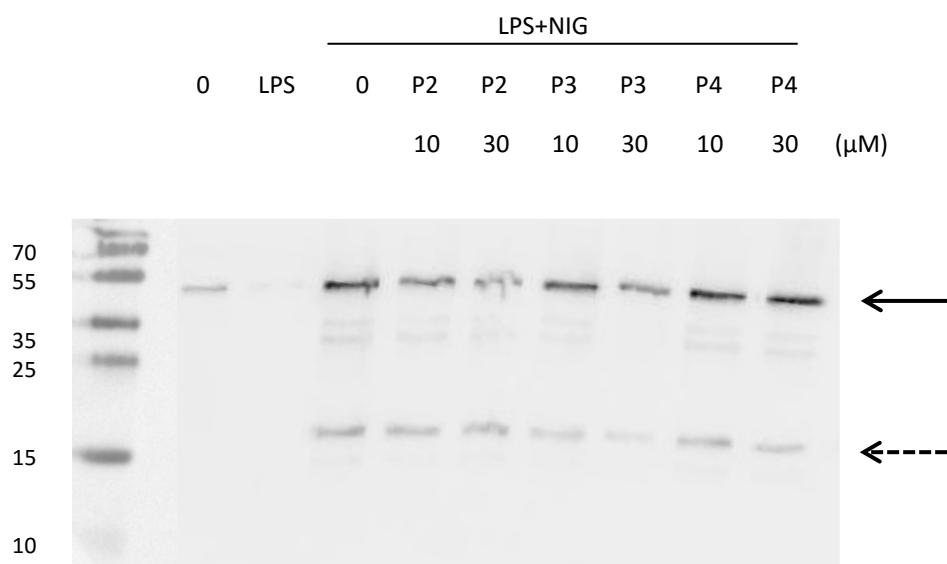


Slika 15: Vpliv peptidov iz interakcijskih regij inflamasoma na koncentracijo izločenega IL1 β na celicah BMDM

Beli stolpci prikazujejo odziv celic, stimuliranih z 10 ng/mL LPS in 1 mM ATP ob prisotnosti peptidov P2 - P4 v koncentraciji 30 μ M. Kot kontrolo ozadja navajamo odziv nestimuliranih celice (0), kot kontrolo prvega signala aktivacije odziv celic, stimuliranih z 10 ng/mL LPS (LPS), kot kontrolo drugega signala aktivacije pa odziv celic, stimuliranih z 10 ng/mL LPS in ATP (LPS+ATP). Kot kontrolo inhibitornosti DMSO navajamo odziv celic, stimuliranih z 10 ng/mL LPS in ATP, kjer je namesto peptidov prisoten DMSO, in sicer v največjem uporabljenem volumskem deležu (DMSO).

4.2.1.2 Spremljanje aktivacije kaspaze-1

Inhibitorni potencial peptidov iz interakcijskih regij na inflamasom NLRP3 smo potrdili tudi na ravni kaspaze-1 (Slika 16). Pri vzorcih supernatanta celic, inkubiranih z aktivatorji inflamasoma in s peptidi smo v primerjavi s celicami z aktiviranim inflamasom brez peptidov detektirali šibkejšo liso kaspaznega fragmenta p20, ki je indikator aktivne kaspaze-1. Razlike so očitne predvsem pri največji koncentraciji peptidov 30 μM . Najučinkovitejša inhibicija kaspaze-1 je opazna pri peptidu P3 (Slika 16).

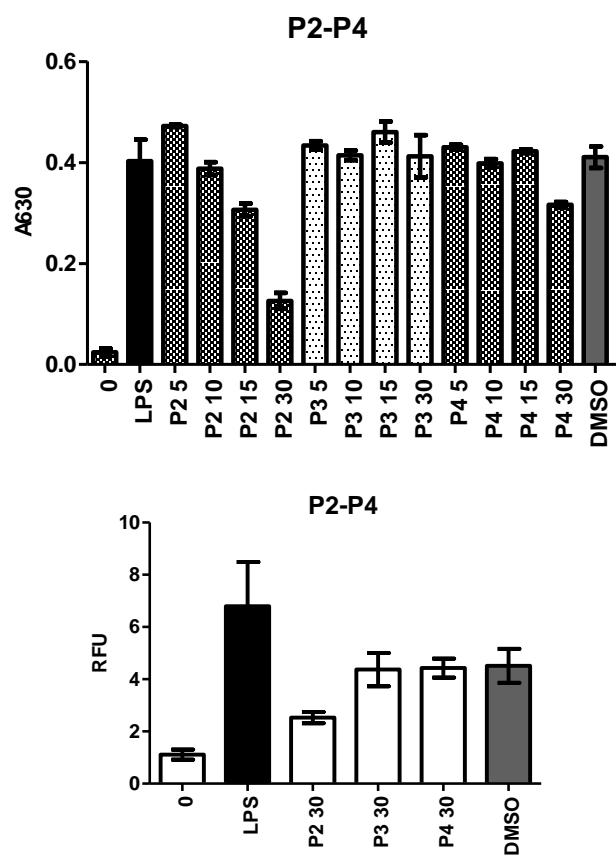


Slika 16: Vpliv peptidov iz interakcijskih regij na aktivacijo kaspaze-1

Lise označene z LPS+NIG prikazujejo odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in 10 μM nigericina ob prisotnosti peptidov P2 - P4 v koncentracijah 10 in 30 μM . Kot kontrolo ozadja navajamo odziv nestimuliranih celic (0), kot kontrolo prvega signala aktivacije odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS (LPS), kot kontrolo drugega signala aktivacije pa odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in 10 μM nigericina (LPS+NIG). Prokaspaza-1 (45 kDa) je prikazana s polno puščico, odcepljen fragment p20 aktivne kaspaze-1 (20 kDa) pa s prekinjeno puščico. Poskus smo ponovili dvakrat in dobili podobne rezultate.

4.2.2 Spremljanje vpliva peptidov na signalno pot NF κ B

Za sestavo inflamasoma NLRP3 je pomembna predhodna aktivacija signalne poti NF κ B preko receptorjev TLR oz. t.i. prvi signal. Če je ta pot inhibirana, bo posledično inhibirana tudi sestava inflamasoma NLRP3. Poudariti velja, da so bili naši eksperimenti v prejšnji točki zasnovani tako, da inhibicija inflamasoma NLRP3 ni bila posledica inhibicije na stopnji poti NF κ B, saj smo peptide dodali celicam šele potem, ko so se v celicah že sintetizirali prekurzorji citokinov. Vsi v prejšnji točki prikazani inhibitorni učinki peptidov so torej povezani z inhibicijo na stopnji sestave inflamasoma NLRP3. Da bi ugotovili ali peptidi slučajno izkazujejo kakršenkoli vpliv tudi na signalno pot NF κ B, smo izvedli eksperiment, v katerem smo celicam najprej dodali peptide, nato pa jih stimulirali z LPS. Aktivnost NF κ B smo določali z različnimi metodami.

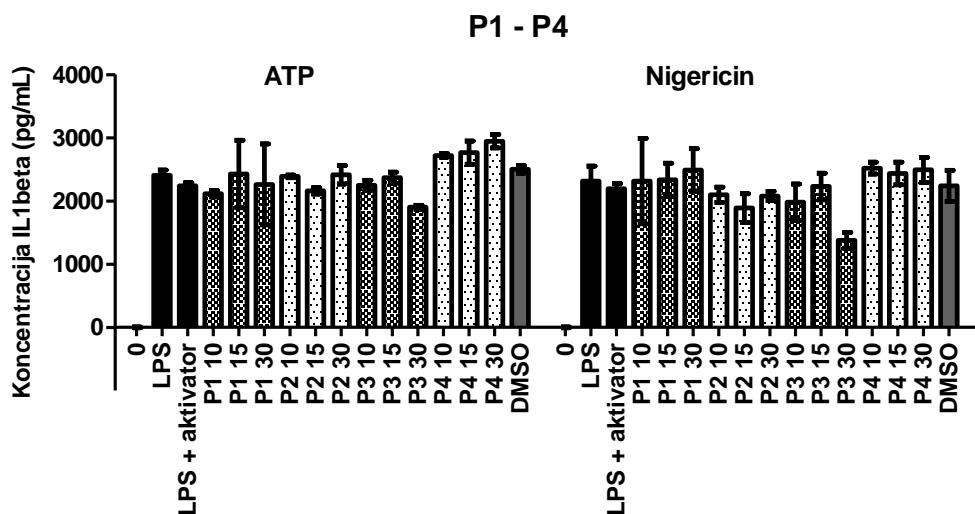


Slika 17: Vpliv peptidov iz interakcijskih regij na pot NF κ B na makrofagih RB (zgoraj) in na celicah HEK293 (spodaj)

Beli stolpci oz. stolpci z vzorcem prikazujejo odziv celic, stimuliranih s 25 ng/mL (RB) oz. 10ng/mL (HEK293T) LPS ob prisotnosti različnih koncentracij peptidov P2 - P4, navedenih v μ M. Kot kontrolo ozadja navajamo odziv celic, stimuliranih z LPS (0), kot kontrolo prvega signala aktivacije pa odziv celic, stimuliranih z LPS (LPS). Kot kontrolo inhibitornosti DMSO navajamo odziv celic, stimuliranih z LPS, kjer je namesto peptidov prisoten DMSO, in sicer v največjem uporabljenem volumskem deležu (DMSO). Prikazujemo povprečno vrednost s standardnim odklonom, izračunano iz 3 paralelk.

Iz slike 17 zgoraj je razvidno, da je pot NF κ B pri makrofagih RB v koncentracijski odvisnosti inhibiral le peptid P2, medtem ko peptida P3 in P4 nanjo nista imela vpliva. To smo potrdili tudi na celicah HEK293, transficiranih s komponentami poti NF κ B (Slika 17 spodaj). Peptid P2 izhaja iz domene CARD ASC, zato je njegova predpostavljena tarča prokaspaza-1. Nedavne raziskave so pokazale, da ASC ni udeležen le v sestavo inflamasomov, pač pa tudi v regulacijo poti NF κ B (Stehlik in sod., 2002), zato je možno, da se peptid P2 veže tudi na vezavne partnerje proteina ASC v tej poti. Kadar inflamasom ni aktiviran, se ASC veže na kinazo I κ B (IKK), ki je odgovorna za fosforilacijo I κ B - inhibitorja prenosa NF κ B v jedro (Martin in sod., 2014) in jo s tem inhibira. Posledično je okrnjena ubikvitinacija in razgradnja I κ B. Ko je ASC povezan z IKK, I κ B ostane aktiven in inhibira prenos NF κ B v jedro. Opažena inhibicija poti NF κ B pri inkubaciji makrofagov RB s peptidom P2 bi lahko bila posledica peptidovega posnemanja ASC in vezave na IKK oz. morebitne druge vezavne partnerje proteina ASC v regulaciji poti NF κ B.

Vzorcem z aktiviranim inflamasomom, ki smo jim z imunsko-encimskim testom določili koncentracijo IL1 β , smo določili tudi koncentracijo TNF α . TNF α je namreč neposreden produkt aktivirane poti NF κ B tako kot tudi proIL1 β . Opazili smo, da nobeden izmed peptidov P1-P4 ni bistveno vplival na koncentracijo TNF α , razen P3 v najvišji koncentraciji (Slika 18). Peptidi torej večinoma niso inhibirali poti NF κ B. Tudi če bi se pri tem eksperimentu pokazala inhibicija poti NF κ B, ne bi bila nujno posledica delovanja peptidov na proteine v poti NF κ B. Lahko bi bila odraz pozitivne povratne zanke IL1 β , pri kateri se izločeni IL1 β veže na membranski receptor IL1 β R in ponovno aktivira NF κ B. V tem eksperimentu, kjer je bil inflamasom aktiviran le 1 h, se sicer učinki pozitivne povratne zanke verjetno še niso pokazali. Če pa bi celice z inhibitornimi peptidi in z aktivatorji inflamasoma inkubirali dlje, bi se pa verjetno pokazal inhibitorni učinek peptidov tudi na poti NF κ B. Inhibicija poti NF κ B bi se pokazala tudi v primeru, ko bi se nabiti peptidi vezali na negativno nabit aktivator poti NF κ B – LPS, in s tem onemogočili njegovo vezavo na TLR4. Po sprožitvi prvega signala smo sicer LPS odstranili, vendar ga nekaj vedno ostane asociranega na receptorju TLR in naprej aktivira pot NF κ B.

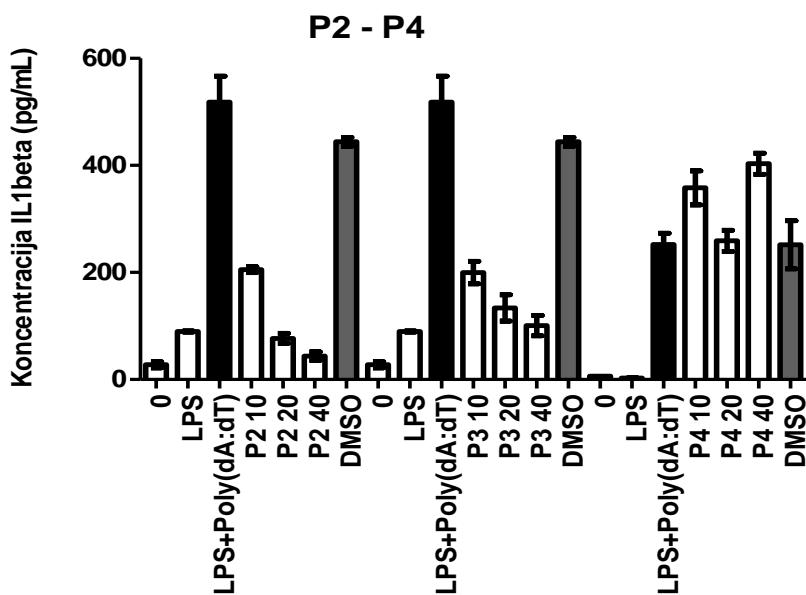


Slika 18: Vpliv peptidov iz interakcijskih regij na koncentracijo TNF α

Stolpci z vzorcem prikazujejo odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem ob prisotnosti različnih koncentracij peptidov P1 - P4, navedenih v μ M. Kot kontrolo ozadja navajamo odziv celic, stimuliranih z LPS (0), kot kontrolo prvega signala aktivacije odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS (LPS), kot kontrolo drugega signala aktivacije pa odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS. Kot kontrolo inhibitornosti DMSO navajamo odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS, kjer je namesto peptidov prisoten DMSO, in sicer v največjem uporabljenem volumskem deležu (DMSO). Prikazujemo povprečno vrednost s standardnim odklonom, izračunano iz 3 paralelk.

4.2.3 Spremljanje vpliva peptidov na inflamasom AIM2

Specifičnost inhibicije peptidov iz interakcijskih regij inflamasoma NLRP3 smo ugotavljali z aktivacijo inflamasoma AIM2 v makrofagih WT, inkubiranih s peptidi. Iz slike 19, ki prikazuje vpliv peptidov iz interakcijskih regij inflamasoma NLRP3 na koncentracijo izločenega IL1 β ob aktiviranem inflamasomu AIM2, je razvidno, da sta peptida P2 in P3 močno inhibirala inflamasom AIM2 v koncentracijski odvisnosti, peptid P4 pa nanj ni imel inhibitornega vpliva. Za peptida P2 in P3 je bila inhibicija inflamasoma AIM2 pričakovana, saj oba prihajata iz proteina ASC, ki je udeležen tudi v sestavo inflamasoma AIM2. Tudi odsotnost vpliva peptida P4 na inflamasom AIM2 smo pričakovali. Peptid P4 izvira iz domene PYD NLRP3, zato smo predpostavili, da se bo specifično vezal na vezavno mesto NLRP3 na domeni PYD ASC in ne bo motil povezav ASC z drugimi vezavnimi partnerji kot je AIM2. Pri tem predpostavljamo, da se NLRP3 in AIM2 ne povežeta s proteinom ASC na istem mestu.

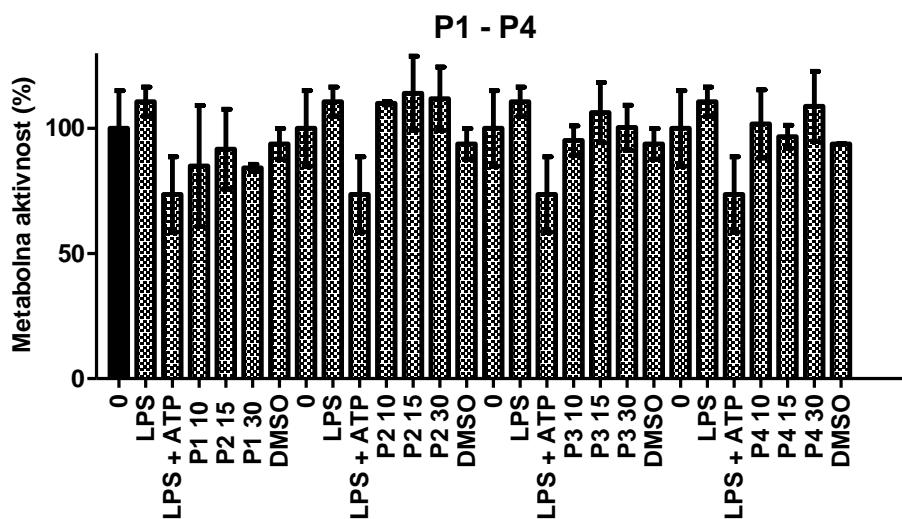


Slika 19: Vpliv peptidov iz interakcijskih regij na inflamasom AIM2

Stolpci z vzorcem prikazujejo odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in 1 µg/mL aktivatorja Poly(dA:dT) ob prisotnosti različnih koncentracij peptidov P2 - P4 navedenih v µM. Kot kontrolo ozadja navajamo odziv celic, stimuliranih z LPS (0), kot kontrolo prvega signala aktivacije odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS (LPS), kot kontrolo drugega signala aktivacije pa odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in 1 µg/mL Poly(dA:dT) (LPS+ Poly(dA:dT)). Kot kontrolo inhibitornosti DMSO navajamo celice, stimulirane s 100 ng/mL LPS in 1 µg/mL Poly(dA:dT), kjer je namesto peptidov prisoten DMSO, in sicer v največjem uporabljenem volumskem deležu (DMSO). Prikazujemo povprečno vrednost s standardnim odklonom, izračunano iz 3 paralelk.

4.2.4 Spremljanje vpliva peptidov na preživelost celic

Makrofagi so dobro preživeli pogoje eksperimenta aktivacije inflamasoma NLRP3 in inkubacije s peptidi iz interakcijskih regij inflamasoma, saj njihova metabolna aktivnost ni bila pretirano okrnjena. Najnižja metabolna aktivnost je bila okoli 70 % glede na nestimulirano kontrolo (Slika 20). Navajamo samo rezultate ob aktivaciji inflamasoma NLRP3 z ATP, saj je bila preživelost podobna pri vseh uporabljenih aktivatorjih.



Slika 20: Vpliv peptidov iz interakcijskih regij na metabolno aktivnost celic

Stolpci z vzorcem prikazujejo odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in 5 mM ATP ob prisotnosti različnih koncentracij peptidov P1 - P4, navedenih v μ M. Kot kontrolo ozadja navajamo odziv nestimuliranih celic (0), kot kontrolo prvega signala aktivacije odziv celic, stimulirane s 100 ng/mL LPS (LPS), kot kontrolo drugega signala aktivacije pa odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ATP (LPS+ATP). Kot kontrolo inhibitornosti DMSO navajamo odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in 5 mM ATP, kjer je namesto peptidov prisoten DMSO, in sicer v največjem uporabljenem volumskem deležu (DMSO). Prikazujemo povprečno vrednost s standardnim odklonom, izračunano iz 3 paralelk.

4.3 PEPTIDI IZ REGIJ NLRP3 S PATOLOŠKIMI MUTACIJAMI

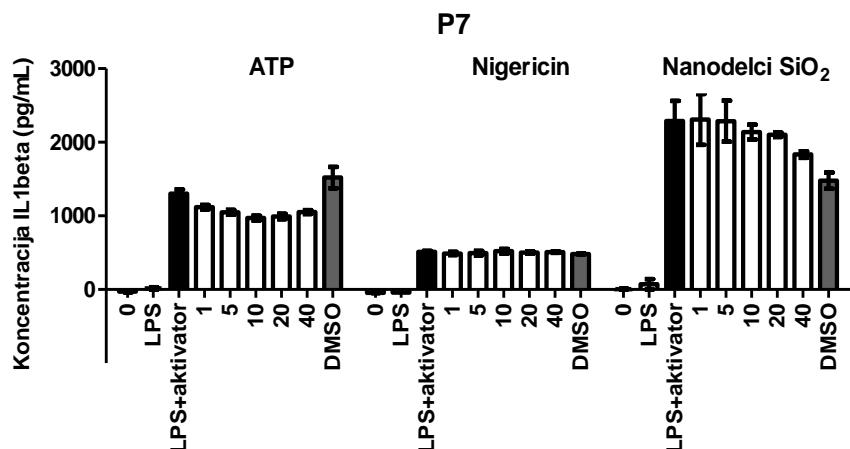
4.3.1 Spremljanje vpliva peptidov na sestavljanje inflamasoma NLRP3

4.3.1.1 Spremljanje količine izločenih citokinov

Za razliko od peptidov iz interakcijskih regij inflamasoma je pri peptidih iz senzorskega proteina NLRP3 s patološkimi mutacijami težko predpostaviti, kako bodo vplivali na inflamasom NLRP3 ob različnih aktivatorjih inflamasoma. Ni namreč povsem jasno, po kakšnem mehanizmu aktivatorji sprožijo drugi signal sestave inflamasoma.

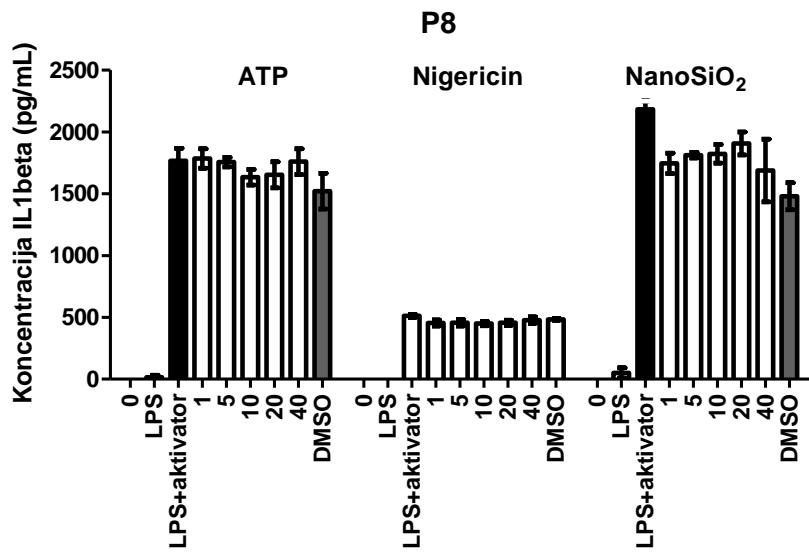
Slike od 21 do 26 prikazujejo vpliv peptidov P7, P8, P9, P10, P11 in P12 iz regij senzorskega proteina NLRP3 s patološkimi mutacijami na koncentracijo izločenega IL1 β , in sicer ob uporabi različnih aktivatorjev inflamasoma NLRP3. Izmed peptidov P7, P9 in P10, ki vsebujejo motive, pomembne za vezavo nukleotidov, sta izločanje IL1 β ob aktivaciji z ATP v koncentracijski odvisnosti inhibirala peptida P9 in P10 (Sliki 23 in 24), P7 pa le šibko (Slika 21). Ob aktivaciji z drugimi aktivatorji peptida P9 in P7 nista imela signifikantnega inhibitornega učinka na izločanje IL1 β (Sliki 23 in 21). P10 je inhibiral izločanje IL1 β tudi ob aktivaciji z nigericinom, vendar slabše (Slika 24). V primerjavi z aktivacijo z ATP, kjer je bila 50 % inhibicija izločanja IL1 β dosežena že pri 20 μ M P10, je pri nigericinu pri tej koncentraciji šele prvič zaznati rahle inhibitorne učinke peptida P10.

Če aktivatorji sprožajo sestavo inflamasoma preko skupnega mehanizma, bi pričakovali enake inhibitorne učinke peptidov pri vseh aktivatorjih. Opažena odvisnost inhibitornega učinka peptidov od tipa aktivatorja morda nakazuje, da peptidi inhibirajo inflamasom nekje na začetni stopnji, ki še ni skupna različnim aktivatorjem.



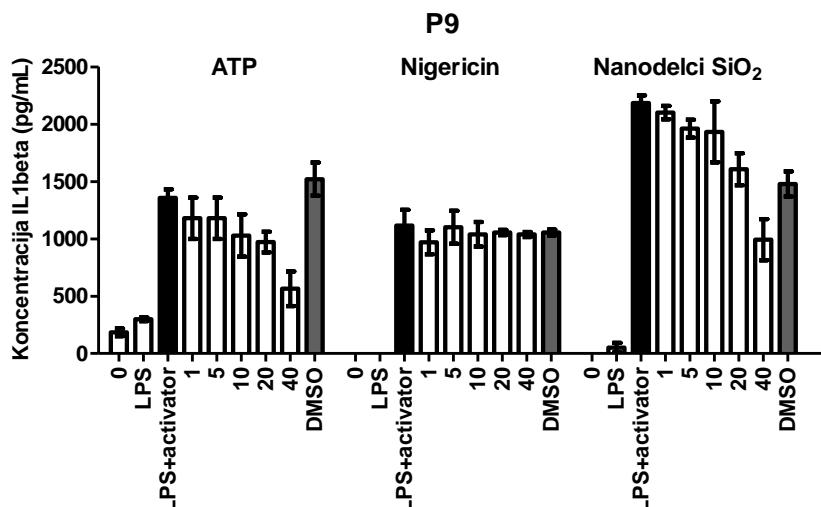
Slika 21: Vpliv peptida P7 na koncentracijo izločenega IL1 β

Beli stolpci prikazujejo odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem ob prisotnosti različnih koncentracij peptida P7, navedenih v μ M. Kot kontrolo ozadja navajamo odziv nestimuliranih celic (0), kot kontrolo prvega signala aktivacije odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS (LPS), kot kontrolo drugega signala aktivacije pa odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem (LPS+aktivator). Kot kontrolo inhibitornosti DMSO navajamo odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem, kjer je namesto peptidov prisoten DMSO, in sicer v največjem uporabljenem volumskem deležu (DMSO). Prikazujemo povprečno vrednost s standardnim odklonom, izračunano iz 3 paralelk.



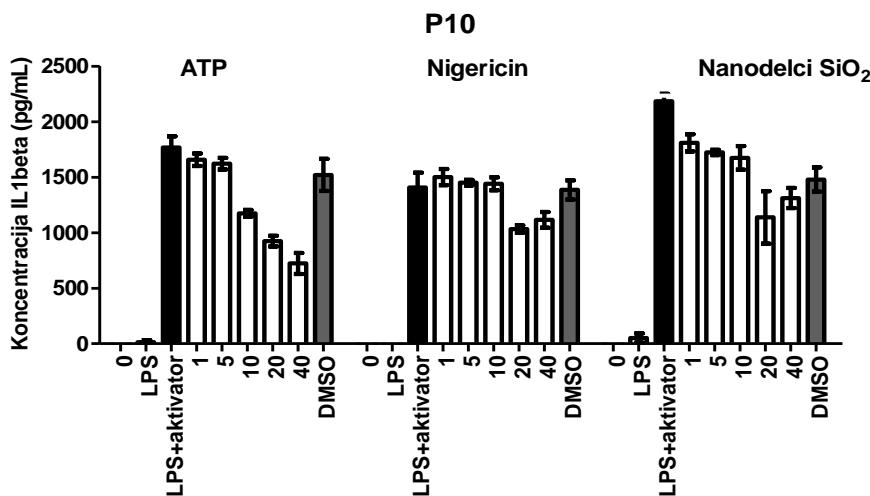
Slika 22: Vpliv peptida P8 na koncentracijo izločenega IL1 β

Beli stolpci prikazujejo odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem ob prisotnosti različnih koncentracij peptida P8, navedenih v μ M. Kot kontrolo ozadja navajamo odziv nestimuliranih celic (0), kot kontrolo prvega signala aktivacije odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS (LPS), kot kontrolo drugega signala aktivacije pa odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem (LPS+aktivator). Kot kontrolo inhibitornosti DMSO navajamo odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem, kjer je namesto peptidov prisoten DMSO, in sicer v največjem uporabljenem volumskem deležu (DMSO). Prikazujemo povprečno vrednost s standardnim odklonom, izračunano iz 3 paralelk.



Slika 23: Vpliv peptida P9 na koncentracijo izločenega IL1 β

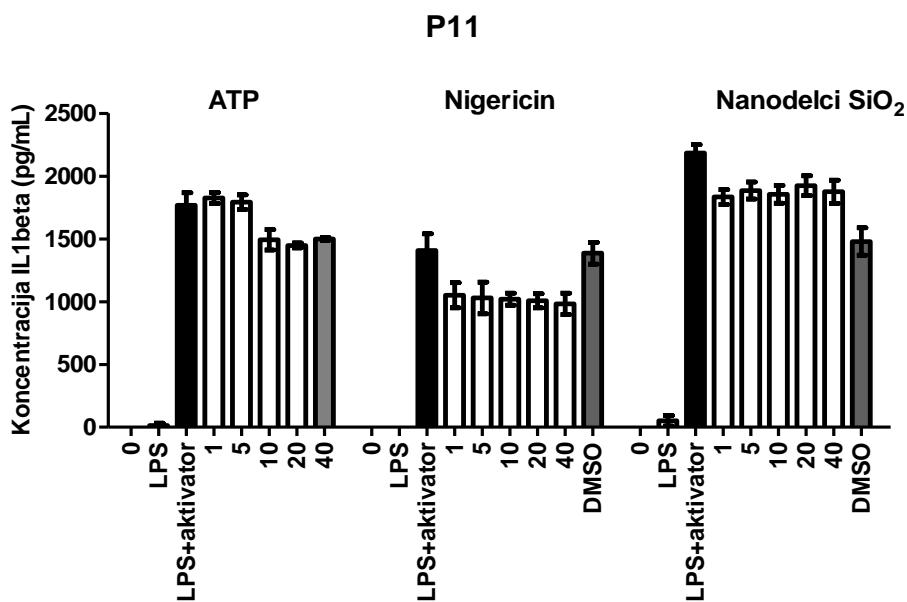
Beli stolpci prikazujejo odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem ob prisotnosti različnih koncentracij peptida P9, navedenih v μ M. Kot kontrolo ozadja navajamo odziv nestimuliranih celic (0), kot kontrolo prvega signala aktivacije odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS (LPS), kot kontrolo drugega signala aktivacije pa odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem (LPS+aktivator). Kot kontrolo inhibitornosti DMSO navajamo odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem, kjer je namesto peptidov prisoten DMSO, in sicer v največjem uporabljenem volumskem deležu (DMSO). Prikazujemo povprečno vrednost s standardnim odklonom, izračunano iz 3 paralelk.



Slika 24: Vpliv peptida P10 na koncentracijo izločenega IL1 β

Beli stolpci prikazujejo odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem ob prisotnosti različnih koncentracij peptida P10, navedenih v μ M. Kot kontrolo ozadja navajamo odziv nestimuliranih celic (0), kot kontrolo prvega signala aktivacije odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS (LPS), kot kontrolo drugega signala aktivacije pa odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem (LPS+aktivator). Kot kontrolo inhibitornosti DMSO navajamo odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem, kjer je namesto peptidov prisoten DMSO, in sicer v največjem uporabljenem volumskem deležu (DMSO). Prikazujemo povprečno vrednost s standardnim odklonom, izračunano iz 3 paralelk.

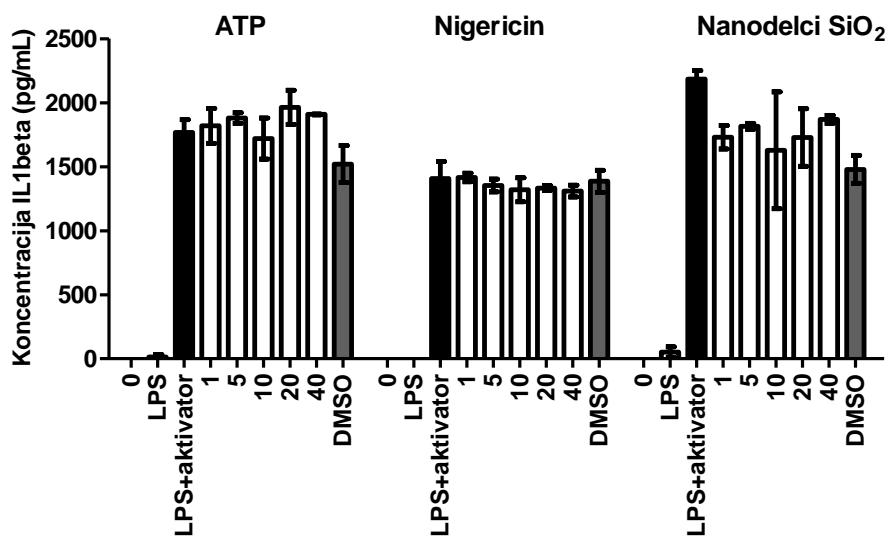
Peptida P8 in P12 nista izkazovala inhibitornega učinka na izločanje IL1 β pri nobenem od testiranih aktivatorjev (Sliki 22 in 26), P7 in P11 pa šibkega pri aktivaciji z ATP (P7, Slika 21) oz. z nigericinom (P11, Slika 25). Obstaja več možnih razlogov za odsotnost oz. nesignifikantnost vpliva teh peptidov na inflamasom NLRP3. Peptidi izven konteksta konformacije matične domene morda izgubijo svojo biološko aktivnost in ne vežejo tarč s tolikšno afiniteto kot v sklopu matične domene. Za funkcionalnost motivov Walker je na primer zelo pomembna ohranjenost trodimenzionalne strukture (Walker in sod., 1982), ki je pri peptidu P7, ki vsebuje motiv Walker A, izven konteksta NLRP3 lahko porušena. Razlog za odsotnost vplivov je lahko tudi v specifiki vezave. Nobeden izmed peptidov P8, P11 in P12 nima izrazitega naboja (Preglednica 17), zato morda niso sposobni tvorbe elektrostatskih vezi ampak tvorijo le šibkejše in manj specifične hidrofobne interakcije.



Slika 25: Vpliv peptida P11 na koncentracijo izločenega IL1 β

Beli stolpci prikazujejo odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem ob prisotnosti različnih koncentracij peptida P11, navedenih v μM . Kot kontrolo ozadja navajamo odziv nestimuliranih celic (0), kot kontrolo prvega signala aktivacije odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS (LPS), kot kontrolo drugega signala aktivacije pa odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem (LPS+aktivator). Kot kontrolo inhibitornosti DMSO navajamo odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem, kjer je namesto peptidov prisoten DMSO, in sicer v največjem uporabljenem volumskem deležu (DMSO). Prikazujemo povprečno vrednost s standardnim odklonom, izračunano iz 3 paralelk.

P12

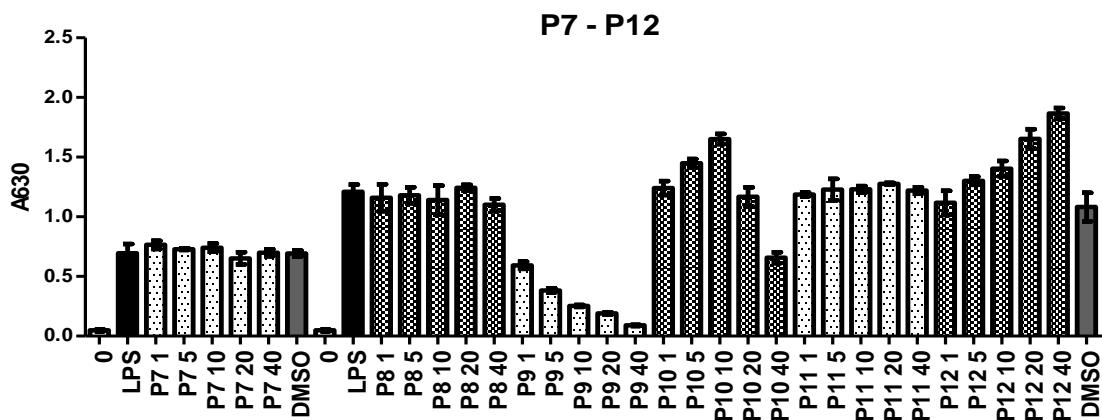


Slika 26: Vpliv peptida P12 na koncentracijo izločenega IL1 β

Beli stolpci prikazujejo odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem ob prisotnosti različnih koncentracij peptida P12, navedenih v μM . Kot kontrolo ozadja navajamo odziv nestimuliranih celic (0), kot kontrolo prvega signala aktivacije odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS (LPS), kot kontrolo drugega signala aktivacije pa odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem (LPS+aktivator). Kot kontrolo inhibitornosti DMSO navajamo odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in ustreznim aktivatorjem, kjer je namesto peptidov prisoten DMSO, in sicer v največjem uporabljenem volumskem deležu (DMSO). Prikazujemo povprečno vrednost s standardnim odklonom, izračunano iz 3 paralelk.

4.3.2 Spremljanje vpliva peptidov na signalno pot NF κ B

Med inhibitorji inflamasoma NLRP3 je peptid P9 v izraziti koncentracijski odvisnosti inhibiral pot NF κ B, peptid P10 pa je inhibitorni učinek izkazoval le pri največji koncentraciji. Peptidi P7, P8 in P11 niso imeli nobenega vpliva na pot NF κ B. Peptid P12 pa je presenetljivo v izraziti koncentracijski odvisnosti dodatno aktiviral pot NF κ B (Slika 27).

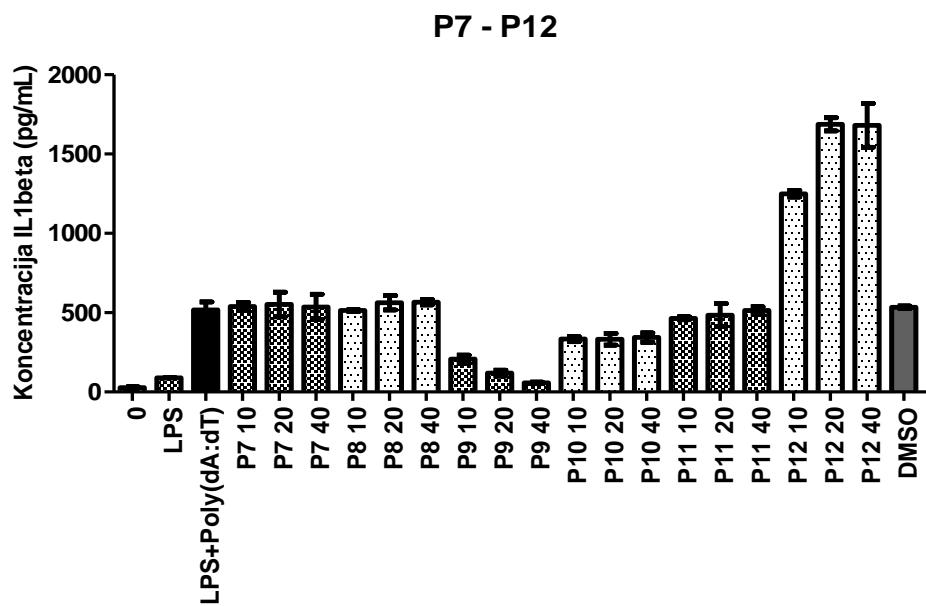


Slika 27: Vpliv peptidov iz regij NLRP3 s patološkimi mutacijami na pot NF κ B na makrofagih RB

Stolpci z vzorcem prikazujejo odziv celic, stimuliranih s 25 ng/mL LPS ob prisotnosti različnih koncentracij peptidov P7 - P12, navedenih v μ M. Kot kontrolo ozadja navajamo odziv nestimuliranih celic (0), kot kontrolo prvega signala aktivacije pa odziv celic, stimuliranih s 25 ng/mL LPS (LPS). Kot kontrolo inhibitornosti DMSO navajamo odziv celic, stimuliranih s 25 ng/mL LPS, kjer je namesto peptidov prisoten DMSO, in sicer v največjem uporabljenem volumskem deležu (DMSO). Prikazujemo povprečno vrednost s standardnim odklonom, izračunano iz 3 paralelk.

4.3.3 Spremljanje vpliva peptidov na inflamasom AIM2

Slika 28 prikazuje vpliv peptidov iz regij NLRP3 s patološkimi mutacijami na koncentracijo izloženega IL1 β ob aktiviranem inflamasomu AIM2. Peptid P9 je v izraziti koncentračijski odvisnosti inhibiral inflamasom AIM2 (Slika 28). Tudi peptid P10 je bil rahlo inhibitoren (Slika 28). Vzrok za opaženo inhibicijo morda tiči v tem, da tako regije NLRP3, iz katerih sta bila izbrana peptida P9 in P10, kot tudi senzorski protein AIM2 vežejo neko obliko nukleotidov: NLRP3 veže ATP, AIM2 pa dsDNA. Peptida P9 in P10 se morda vežeta na domeno HIN senzorja AIM2, kamor se veže dsDNA (Fernandes-Alnemri in sod., 2009) in preprečujeta povezavo med dsDNA in AIM2, ki je ključna za aktivacijo tega inflamasoma. Zanimiv je tudi odziv inflamasoma AIM2 na peptid P12, ki je dodatno stimuliral inflamasom. Peptidi P7, P8, P11 podobno kot na inflamasom NLRP3 tudi niso izkazovali signifikantnega vpliva na inflamasom AIM2 (Slika 28).

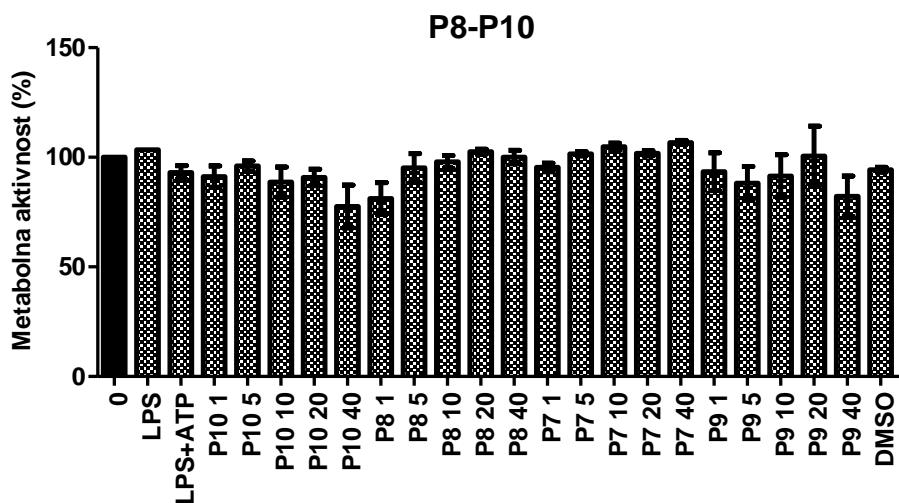


Slika 28: Vpliv peptidov iz regij NLRP3 s patološkimi mutacijami na inflamasom AIM2

Stolpci z vzorcem prikazujejo odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in 1 μ g/mL Poly(dA:dT) ob prisotnosti različnih koncentracij peptidov P7 - P12 navedenih v μ M. Kot kontrolo ozadja navajamo odziv nestimuliranih celic(0), kot kontrolo prvega signala aktivacije odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS (LPS), kot kontrolo drugega signala aktivacije pa odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in 1 μ g/mL Poly(dA:dT) (LPS+ Poly(dA:dT)). Kot kontrolo inhibitornosti DMSO navajamo celice, stimulirane s 100 ng/mL LPS in 1 μ g/mL Poly(dA:dT), kjer je namesto peptidov prisoten DMSO, in sicer v največjem uporabljenem volumskem deležu (DMSO).

4.3.4 Spremljanje preživelosti celic

Celice so dobro preživele pogoje eksperimentov aktivacije inflamasoma NLRP3 in inkubacije celic s peptidi iz regij NLRP3 s patološkimi mutacijami. Najnižja metabolna aktivnost je bila okoli 80 % glede na kontrolo, kjer ni bil aktiviran inflamasom NLRP3 (Slika 29).



Slika 29: Vpliv peptidov iz regij NLRP3 s patološkimi mutacijami na metabolno aktivnost celic

Stolci z vzorcem prikazujejo odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in 5 mM ATP ob prisotnosti različnih koncentracij peptidov P1 - P4, navedenih v μ M. Kot kontrolo ozadja navajamo odziv nestimuliranih celic (0), kot kontrolo prvega signala aktivacije odziv celic, stimulirane s 100 ng/mL LPS (LPS), kot kontrolo drugega signala aktivacije pa odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in 5 mM ATP (LPS+ATP). Kot kontrolo inhibitornosti DMSO navajamo odziv celic, stimuliranih s 100 ng/mL LPS in 5 mM ATP, kjer je namesto peptidov prisoten DMSO, in sicer v največjem uporabljenem volumskem deležu (DMSO). Prikazujemo povprečno vrednost s standardnim odklonom, izračunano iz 3 paralelk.

5 RAZPRAVA

5.1 ŽELENE LASTNOSTI PEPTIDNIH INHIBITORJEV

Večina znanih inhibitorjev inflamasoma NLRP3 inhibira poznejše stopnje sestave inflamasoma, ki so skupne več inflamasomom. Inflamasomi se namreč med seboj razlikujejo v poteh sprožitve drugega signala, nato pa konvergirajo na stopnji povezave z ASC oz. na stopnji povezave s prokaspazo-1. Cilj te naloge je bil načrtovati inhibitorje, ki bi inflamasom NLRP3 inhibirali v čim bolj zgodnjih stopnjah njegove sestave, saj tu obstaja največja verjetnost, da bo inhibicija zanj specifična.

S terapevtskega stališča je za inhibitorje inflamasoma NLRP3 pomembno, da so učinkoviti v čim nižjih koncentracijah, da inhibirajo aktivacijo preko vseh aktivatorjev NLRP3 in da delujejo čim bolj specifično. Pri tem je zaželeno, da imajo čim manjši vpliv na druge inflamasome in na signalno pot NF κ B. Vpliv na NF κ B pot ni zaželen, saj je NF κ B glavni transkripcijski faktor, ki regulira izražanje genov za številne citokine, kemokine, rastne faktorje, receptorje, regulatorje apoptoze in druge transkripcijske faktorje, ki so udeleženi v procesu naravne imunosti. V tej magistrski nalogi smo kot potencialne inhibitorje inflamasoma NLRP3 uporabili peptide, ki imajo zaradi svojega kemijskega značaja velik potencial za specifično vezavo na tarče. Večino peptidov smo načrtovali tako, da so njihove tarče locirane na stopnjah sestave inflamasoma NLRP3 pred povezavo proteina ASC s prokaspazo-1.

V eksperimentalnem delu te naloge smo ugotavljali, kako načrtovani peptidi ustrezajo zgoraj opisanim kriterijem (Preglednica 18). Inhibitorni potencial peptidov smo ugotavljali z merjenjem koncentracije končnih produktov aktivacije inflamasoma NLRP3 - citokinov IL1 β in IL18, in sicer z imunsko-encimskimi testi ELISA. Inhibitorni potencial peptidov smo določali tudi z detekcijo aktivacije kaspaze-1, ki je odgovorna za zorenje citokinov, pri čemer smo se poslužili Western prenosa. Za določanje specifičnosti vpliva peptidov na inflamasom NLRP3 smo z enakimi metodami spremljali vpliv peptidov na še enega znanega predstavnika inflamasomov – inflamasom AIM2. Vpliv peptidov na pot NF κ B pa smo določali na tri različne načine, in sicer z določanjem koncentracije neposrednega produkta poti NF κ B – TNF α ter z določanjem aktivnosti encimov alkalna fosfataza in luciferaza, katerih izražanje je uravnavano s promotorjem, odzivnim na NF κ B.

Eksperimente spremljanja vpliva peptidov na inflamasom NLRP3 smo zasnovali tako, da smo pri celicah z agonisti receptorjev TLR najprej sprožili prvi signal aktivacije inflamasoma, pri čemer je prišlo do sinteze prekurzorjev citokina IL1 β ter receptorja NLRP3. Nato smo celice inkubirali v mediju z raztopljenimi peptidi, da so se ti lahko

vezali na svoje tarče. Na koncu smo z dodatkom aktivatorjev inflamasoma sprožili še drugi signal, ki je sprožil sestavljanje inflamasoma in s tem aktivacijo kaspaze-1 ter posledično pretvorbo citokinskih prekurzorjev proIL1 β in proIL18 v njihove zrele oblike.

Preglednica 18: Izvedba raziskave

Cilji	Merjeni parametri	Metoda
1. Inhibicija sestave inflamasoma NLRP3 s peptidi	Koncentracija IL1 β Koncentracija IL18 Prisotnost fragmenta p20 kaspaze-1	ELISA ELISA Western prenos
2. Vpliv peptidov na inflamasoma AIM2	Koncentracija IL1 β	ELISA
3. Vpliv peptidov na pot NF κ B	Koncentracija TNF α Aktivnost alkalne fosfataze pod promotorjem za NF κ B Aktivnost luciferaze pod promotorjem za NF κ B	ELISA Uporaba makrofagov RAWBlue in substrata QUANTIBlue Dvojni luciferazni test

5.2 INHIBITORNI POTENCIJAL NAČRTOVANIH PEPTIDOV

Izmed desetih načrtovanih peptidov sta se kot najobetavnejša inhibitorja inflamasoma NLRP3 izkazala peptida P4 in P10, ki predstavljata največji kompromis med želenimi lastnostmi za peptidne inhibitorje. Peptid P4 je predstavnik peptidov iz interakcijskih regij in domnevno inhibira interakcije PYD-PYD med NLRP3 in ASC. Peptid P10 pa je predstavnik peptidov iz oligomerizacijske/senzorske regije NACHT.

Oba peptida sta po aktivaciji inflamasoma NLRP3 v makrofagih inhibirala izločanje IL1 β in zorenje kaspaze-1, obenem pa nista izkazovala velikega vpliva na inflamasom AIM2 oz. signalno pot NF κ B, zaradi česar imata po našem mnenju največji potencial za nadaljnje raziskave. Peptid P4 je izkazoval inhibitorni vpliv na izločanje IL1 β pri vseh testiranih aktivatorjih, kar smo pričakovali, saj interakcije PYD-PYD, ki jih P4 domnevno moti, nastopajo šele po zaznavi aktivatorjev in oligomerizaciji NLRP3. Peptid P10 pa je bil pri aktivaciji z ATP bolj inhibitoren kot pri nigericinu, kar morda nakazuje, da inhibitorno deluje na neki začetni stopnji aktivacije, ki ni skupna različnim aktivatorjem.

Inflamasom NLRP3 so močno inhibirali tudi peptidi P2, P3 in P9, vendar so imeli inhibitoren vpliv tudi bodisi na inflamasom AIM2 bodisi na pot NF κ B. Da peptidi verjetno ne bodo delovali izključno na inflamasom NLRP3 smo pravzaprav pričakovali. Peptida P2 in P3 izhajata iz domen PYD in CARD ASC, torej delujeta na stopnji vključitve proteina ASC in prokaspaze-1 v inflamasom, ki je skupna več inflamasomom. Za ta dva peptida bi bilo zanimivo preveriti še vpliv na inflamasom NLRC4, ki se lahko sestavlja brez ASC.

Peptid P3 ni imel vpliva na signalno pot NF κ B, je pa inhibiral inflamasom AIM2, zato je morda zanimiv s stališča generalne inhibicije inflamasomov.

Presenetljiv je inhibitoren vpliv peptida P9, ki izhaja iz senzorske regije NLRP3, na inflamasom AIM2. Glede na to, da izhaja iz proteina NLRP3, smo pričakovali, da bo inhibiral le inflamasom NLRP3. Eden izmed razlogov za opaženo inhibicijo inflamasoma AIM2 je morda v tem, da peptid P9 morda preprečuje vezavo dsDNA na senzorski protein AIM2, saj vsebuje motiv za vezavo nukleotidov. Vsekakor bomo delovanje teh peptidov še raziskovali.

Inhibitorni potencial peptidov se je pokazal v mikromolarnem območju, in sicer pri koncentracijah okoli 20-30 μ M, kjer smo ga glede na naše izkušnje in literaturo tudi pričakovali. Na poti peptidov do njihovih tarč prihaja do izgub. Nabiti peptidi se lahko vežejo na druge nabite molekule npr. na LPS, ki je negativno nabit, kratke peptide lahko razgradijo proteaze. Vsi peptidi tudi ne preidejo celične membrane ali pa ostanejo ujeti v njenem lipidnem dvosloju.

5.3 VPLIV EKSPERIMENTALNIH POGOJEV NA INHIBITORNI POTENCIJAL PEPTIDOV

Pri vsakem poskusu smo spremljali tudi metabolno aktivnost celic in inhibitorni potencial DMSO, v katerem so bili raztopljeni peptidi. Ugotovili smo, da so celice dobro preživele eksperimente. V volumskih deležih, ki smo jih uporabljali pri eksperimentih, DMSO večinoma ni inhibiral inflamasoma. Opazili pa smo, da DMSO v kombinaciji z ATP včasih deluje rahlo inflamatorno na koncentracijo izločenega IL1 β (npr. Slike 13, 25, 26). To opažanje je v skladu z Ahn in sod. (2014), ki so s testiranjem supernatantov celic z aktiviranim inflamasomom z Western prenosom pokazali, da DMSO lahko inhibitorno deluje na izločanje IL1 β . Inhibitorni vpliv DMSO se je sicer pojavil šele v volumskih deležih nad 2 %, medtem ko smo v naših poskusih uporabljali največ 0,6 % delež DMSO. Skladno z našimi opažanjji pa je v njihovih rezultatih opaziti šibkejše lise IL1 β , kadar so DMSO testirali v kombinaciji z ATP. Inhibitorna sposobnost DMSO bi lahko bila povezana z njegovo vlogo antioksidanta oz. lovilca hidroksilnih radikalov, kot so ROSi, znani intermediatni aktivatorji inflamasoma NLRP3 (Zhou in sod., 2011). DMSO naj bi lovil in nevtraliziral ROS, s tem pa preprečeval aktivacijo inflamasoma NLRP3 (Ahn in sod., 2014). Za DMSO je sicer znano, da inhibira pot NF κ B, zato pojav inhibicije pri kontrolah z DMSO pri eksperimentih, kjer smo ugotavljali vpliv peptidov na pot NF κ B, ni bil nepričakovani (Slika 17 spodaj).

5.4 NADALJNJE DELO

V magistrski nalogi smo ovrednotili potencial peptidov kot inhibitorjev inflamasoma NLRP3. Z nadaljnji poskusi bi se radi osredotočili na razvijanje njihove aplikativne vrednosti, predvsem v smislu testiranja peptidov na biološko bolj relevantnih modelih in razvoju dostavnih mehanizmov. Peptide bomo na primer opremili s skupinami, ki omogočajo prehod krvno-možganske bariere, kar bi imelo velik pomen predvsem na področju razvoja terapij za nevrodegenerativne bolezni ali pa jih bomo zapakirali v liposome.

Dokazati bo potrebno, da peptidi z miristinsko skupino lahko uspešno prehajajo membrano. V ta namen bomo na peptide obesili fluorescenčne oznake, ki nam bodo omogočile lokalizacijo peptidov v celici. Za neposredni dokaz vezave peptidov na njihove proteinske tarče se bomo poslužili koimunoprecipitacije. Osvetlili bi radi tudi sekundarno strukturo, ki jo peptidi zavzemajo v raztopini, in sicer z uporabo cirkularnega dikroizma. Sposobnost peptidov, da zavzemajo strukturo vijačnice, je namreč dober indikator, da peptidi dobro posnemajo starševsko strukturo in s tem omogočajo biološko relevantne interakcije.

Odprtih je torej veliko možnosti za nadaljnji razvoj inhibitorjev inflamasoma NLRP3. Glede na odkrivanje vpletenosti inflamasoma NLRP3 v patofiziologijo čedalje več pogostih bolezni ter nekaterih redkih dednih bolezni, je razvoj terapevtikov, ki bi specifično inhibirali sestavo inflamasoma NLRP3 in ne le blažili učinkov proinflamatornih citokinov, izrednega pomena.

6 SKLEPI

- Na podlagi kristalnih zgradb smo načrtovali peptide P1-P4, ki posnemajo interakcijske regije PYD in CARD vezavnih partnerjev v inflamasomu NLRP3.
- Načrtovali smo tudi peptide P7-P12, ki posnemajo predele regije NACHT NLRP3, kjer se nahajajo pomembni motivi za vezavo nukleotidov in kjer se pojavljajo patološke mutacije, ki se odražajo v kriopirinopatijah.
- Izmed desetih načrtovanih peptidov sta se kot najobetavnejša inhibitorja inflamasoma NLRP3 izkazala peptida P4 in P10.
- Peptida P4 in P10 izkazujeza inhibitorni vpliv na inflamasom NLRP3 v mikromolarnih koncentracijah in sta najbolj specifična, saj izmed vseh peptidnih kandidatov izkazujeta najmanjši vpliv na glavno signalno pot naravne imunosti NF κ B in na druge inflamasome kot je AIM2.
- Peptida P4 in P10 oba izhajata iz senzorja NLRP3, P4 iz njegove interakcijske domene PYD, P10 pa iz njegove senzorske/oligomerizacijske domene NACHT. S tem smo potrdili našo hipotezo, da peptidi lahko inhibitorno delujejo bodisi z motenjem interakcij v procesu sestave inflamasoma, bodisi z motenjem zaznave aktivatorjev oz. oligomerizacije NLRP3.
- S stališča splošne inhibicije inflamasomov je zelo obetaven tudi peptid P3 iz domene PYD proteina ASC, ki inhibira inflamasoma NLRP3 in AIM2, ne pa tudi poti NF κ B.
- Peptida P2 iz domene CARD proteina ASC in P9 iz domene NACHT proteina NLRP3 sicer najučinkoviteje inhibirata inflamasom NLRP3, vendar močno inhibirata tudi pot NF κ B in inflamasom AIM2, kar zmanjšuje njun terapevtski potencial.
- Celice dobro preživijo inkubacijo s peptidi oz. eksperimentalne pogoje izvedenih eksperimentov.

7 POVZETEK

Za čedalje več pogostih bolezni današnje dobe ugotavljajo, da je v njihovo patofiziologijo vključen inflamasom NLRP3. Alzheimerjeva bolezen, sladkorna bolezen tipa II, ateroskleroza, azbestoza in hiperholesteremija so vse bolezni, pri katerih se v telesu kronično nalagajo raznovrstne snovi od kristalov do proteinskih agregatov in aktivirajo inflamasom NLRP3. Inflamasom NLRP3 je supramolekularni kompleks, ki se običajno sestavi znotraj celic kot odziv na okužbo in preko encima kaspaze-1 sproži zorenje glavnega proinflamatornega citokina IL1 β . Inflamasom NLRP3 pod takšnimi pogoji deluje kot obrambni mehanizem organizma, ki je sposoben učinkovito zatreći infekcijo. Pri zgoraj omenjenih boleznih in pri nekaterih redkejših avtoimunskih boleznih kot so periodični vročinski sindromi v povezavi s kriopirinom, pa je inflamasom NLRP3 aktiviran v sterilnem stanju in prispeva k napredovanju bolezni.

Za aktivacijo inflamasoma NLRP3 sta potrebna dva signala. Prvi signal predstavlja vezava PAMP na receptorje TLR in posledična aktivacija transkripcijskega faktorja NF κ B, ki sproži prepisovanje prekurzorja IL1 β ter senzorskega proteina NLRP3. Drugi signal sproži zaznava raznovrstnih aktivatorjev (ATP, ROS, nigericin, urat, aluminijeve soli ipd.) po še nepojasnjenu mehanizmu preko senzorskega proteina NLRP3. Drugi signal se odrazi v zaporednem povezovanju in oligomerizaciji več proteinov v inflamasomski kompleks. NLRP3 se poveže z adapterjem ASC, ta pa s prokaspazo-1, od katere se odcepi aktivna kaspaza-1, ki cepi prekurzorje IL1 β v aktivno obliko. Proteini se v inflamasom povezujejo preko homotipnih interakcij PYD-PYD oz. CARD-CARD med domenami PYD oz. CARD proteinov udeleženih v inflamasomu. Interakcije PYD-PYD in CARD-CARD pretežno temeljijo na elektrostatskem privlaku med nasprotno nabitimi predeli na domenah PYD oz. CARD vezavnih partnerjev.

Za uspešno zdravljenje bolezni, v katere je vključen inflamasom NLRP3 je med drugim ključnega pomena zajezitev njegove aktivacije. Obstojeci inhibitorji inflamasoma NLRP3 delujejo šele v poznih stopnjah njegove sestave, ki niso specifične za inflamasom NLRP3, ampak potekajo tudi pri drugih vrstah inflamasomov, ki v patologijo bolezni niso vključeni. V tej magistrski nalogi smo želeli ovrednotiti potencial peptidov kot inhibitorjev inflamasoma NLRP3. V ta namen smo načrtovali dve vrsti peptidov: peptide P1, P2, P3 in P4, ki posnemajo motive iz interakcijskih regij PYD in CARD proteinov inflamasoma ter peptide P7, P8, P9, P10, P11 in P12, ki posnemajo regije NLRP3, kjer se pojavljajo pomembni motivi za vezavo nukleotidov in mutacije, ki povzročajo periodične vročinske sindrome v povezavi s kriopirinom. Peptide P7-P12 smo izbrali iz regije NACHT oz. NAD NLRP3. Peptide smo za prehod celične membrane opremili z miristinsko skupino.

Inhibitorni potencial peptidov na inflamasom NLRP3 smo ugotavljali z inkubacijo različnih vrst celic z aktivatorji prvega signala aktivacije inflamasoma (LPS), z različnimi koncentracijami načrtovanih peptidov in različnimi aktivatorji drugega signala inflamasoma. Na supernatantih teh celic smo nato z imunsko-encimskimi testi spremljali koncentracijo citokinov IL1 β in IL18. Prav tako smo z Western prenosom spremljali tudi aktivacijo kaspaze-1. Da bi preverili specifičnost inhibitornega učinka peptidov za inflamasom NLRP3, smo preverili tudi vpliv peptidov na inflamasom AIM2 in na glavno signalno pot naravne imunosti – pot NF κ B.

Izmed desetih načrtovanih peptidov sta se kot najobetavnejša inhibitorja inflamasoma NLRP3 izkazala peptida P4 in P10. Peptid P4 izhaja iz PYD NLRP3 in po naših predpostavkah moti interakcije PYD-PYD med NLRP3 in ASC. Peptid P10 izhaja iz oligomerizacijske domene NLRP3 NACHT in vsebuje pomemben motiv za vezavo nukleotidov. Predpostavljam, da P10 inhibira bodisi oligomerizacijo NLRP3 bodisi vezavo nukleotidov na NLRP3 in s tem prepreči sproženje sestave inflamasoma. Peptida P4 in P10 sta bila inhibitorna v mikromolarnem območju in najbolj specifična, saj izmed vseh peptidnih kandidatov izkazujeta najmanjši vpliv na inflamasom AIM2 in pot NF κ B. Inflamasom NLRP3 sta inhibirala tudi peptida P2 in P3 iz domen PYD in CARD ASC ter peptid P9, iz NACHT NLRP3, ki podobno kot P10 vsebuje pomembno mesto za vezavo nukleotidov. Ker pa so ti peptidi inhibirali tudi bodisi inflamasom AIM2 bodisi pot NF κ B, so iz terapevtskega stališča manj primerni.

V prihodnje načrtujemo še vrsto eksperimentov, s katerimi želimo dodatno potrditi inhibitorno delovanje peptidov na inflamasom NLRP3, hkrati pa se posvetiti razvijanju njihove aplikativne vrednosti. Razvoj učinkovitih specifičnih inhibitorjev inflamasoma NLRP3 ima namreč velik potencial za načrtovanje terapij za nekatere vse pogosteje pojavljajoče se neozdravljive bolezni.

8 VIRI

- Abderrazak A., Syrovets T., Couchie D., El Hadri K. B., Simmet T., Rouisa M. 2015. NLRP3 inflammasome: From a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biology*, 4: 296-307
- Ahn H., Kim J., Jeung E.B., Lee G.S. 2014. Dimethyl sulfoxide inhibits NLRP3 inflammasome activation. *Immunobiology*, 219, 4: 315-322
- Albrecht M., Domingues F.S., Schreiber S., Lengauer T. 2003. Structural localization of disease-associated sequence variations in the NACHT and LRR domains of PYPAF1 and NOD2. *FEBS Letters*, 554, 3: 520-528
- Atianand M.K., Fuchs T., Harton J.A. 2011. Recent evolution of the NF-κB and inflammasome regulating protein POP2 in primates. *BMC Evolutionary Biology*, 11: 56, doi:10.1186/1471-2148-11-56: 10 str.
- Avbelj M., Horvat S., Jerala R. 2011. The role of intermediary domain of MyD88 in cell activation and therapeutic inhibition of TLRs. *The Journal of Immunology*, 187, 5: 2394-2404
- Bae J.Y., Park, H.H. 2011. Crystal Structure of NALP3 Protein Pyrin Domain (PYD) and its Implications in Inflammasome Assembly. *The Journal of Biological Chemistry*, 286: 39528-39536
- Blander J.M. 2014. A long-awaited merger of the pathways mediating host defence and programmed cell death. *Nature Reviews Immunology*, 14: 601-618
- Brili A. 2015. Načrtovanje in vrednotenje aktivnosti peptidnih zaviralcev inflamasoma NLRP3. Magistrsko delo. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 60 str.
- Bryan N.B., Dorfleutner A., Rojanasakul Y., Stehlik C. 2009. Activation of inflammasomes requires intracellular redistribution of the apoptotic speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC). *The Journal of Immunology*, 182, 5: 3173-3182

Cheng H.C., Kemp B.E., Pearson R.B., Smith A.J., Misconi L., Van Patten S.M., Walsh D.A. 1986. A potent synthetic peptide inhibitor of the cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 261, 3: 989-992

Coll R.C., Robertson A.A., Chae J.J., Higgins S.C., Muñoz-Planillo R., Inserra M.C., Vetter I., Dungan L.S., Monks B.G., Stutz A., Croker D.E., Butler M.S., Haneklaus M., Sutton C.E., Núñez G., Latz E., Kastner D.L., Mills K.H., Masters S.L., Schroder K., Cooper M.A., O'Neill L.A. 2015. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nature Medicine*, 21, 3: 248-255

Cruz C.M., Rinna A., Forman H.J., Ventura A.L., Persechini P.M., Ojcius D.M. 2007. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 2871-2879

De Alba E. 2009. Structure and interdomain dynamics of apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC). *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 47: 32932-32941

Dinarello C.A. 2005. Interleukin-1beta. *Critical Care Medicine*, 33, S12: S460-2

Dostert C., Pétrilli V., Van Bruggen R., Steele C., Mossman B.T., Tschoop J. 2008. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science*, 320: 674-677

Duewell P., Kono H., Rayner K.J., Sirois C.M., Vladimer G., Bauernfeind F.G., Abela G.S., Franchi L., Nuñez G., Schnurr M., Espevik T., Lien E., Fitzgerald K.A., Rock K. L., Moore K.J., Wright S.D., Hornung V., Latz E. 2010. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*, 464: 1357-1361

Eldar-Finkelman H., Eisenstein M. 2009. Peptide inhibitors targeting protein kinases. *Current Pharmaceutical Design*, 15, 21: 2463-2470

Fernandes-Alnemri T., Yu J.W., Wu J., Datta P., Alnemri E.S. 2009. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature*, 458, 7237: 509-513

Franklin B.S., Bossaller L., De Nardo D., Ratter J.M., Stutz A., Engels G., Brenker C., Nordhoff M., Mirandola S.R., Al-Amoudi A., Mangan M.S., Zimmer S., Monks B.G., Fricke M., Schmidt R.E., Espenik T., Jones B., Jarnicki A.G., Hansbro P.M., Buste P., Marshak-Rothstein A., Hornemann S., Aguzzi A., Kastenmüller W., Latz E. 2014. The adaptor ASC has extracellular and 'prionoid' activities that propagate inflammation. *Nature Immunology*, 15, 8: 727-737

GenScript. 2014. Peptide Property Calculator.

https://www.genscript.com/ssl-bin/site2/peptide_calculation.cgi (Julij, 2015)

Gregory S.M., B. Damania. 2011. Inhibition of the inflammasome response by a viral protein that interacts with NLRs. *Communicative & Integrative Biology*, 4, 4: 416-418

Gross O., Thomas C.J., Guarda G., Tschopp J. 2011. The inflammasome: an integrated view. *Immunological Reviews*, 243, 1: 136-151

Halle A., Hornung V., Petzold G.C., Stewart C.R., Monks B.G., Reinheckel T., Fitzgerald K.A., Latz E., Moore K.J., Golenbock D.T. 2008. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . *Nature Immunology*, 9: 857-865

Heneka M.T., Kummer M. P., Stutz A., Delekate A., Schwartz S., Saecker A., Griep A., Axt D., Remus A., Tzeng T.C., Gelpi E., Halle A., Korte M., Latz E., Golenbock D. 2013. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature*, 493: 674-678

Hornung V., Ablasser A., Charrel-Dennis M., Bauernfeind F., Horvath G., Caffrey D.R., Latz E., Fitzgerald K.A. 2009. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature*, 458, 7237: 514-518

Hornung V., Bauernfeind F., Halle A., Samstad E.O., Kono H., Rock K.L., Fitzgerald K.A., Latz E. 2008. Silica crystals and aluminum salts mediate NALP-3 inflammasome activation via phagosomal destabilization. *Nature Immunology*, 9, 8: 847-856

Infevers. 2014. NLRP3 sequence variants.

<http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers/search.php?n=4> (Avgust 2015)

Johnston J.B., Barrett J.W., Nazarian S.H., Goodwin M., Ricciuto D., Wang G., McFadden G. 2005. A poxvirus-encoded pyrin domain protein interacts with ASC-1 to inhibit host inflammatory and apoptotic responses to infection. *Immunity*, 23, 6: 587-598

- Juliana C., Fernandes-Alnemri T., Wu J., Datta P., Solorzano L., Yu J.W., Meng R., Quong A.A. Latz E., Scott C.P., Alnemri E.S. 2010. Anti-inflammatory compounds parthenolide and Bay 11–7082 are direct inhibitors of the inflammasome. *Journal of Biological Chemistry*, 285: 9792-9802
- Komune N., Ichinohe T., Ito M., Yanagi Y.J. 2011. Measles virus V protein inhibits NLRP3 inflammasome-mediated interleukin-1 β secretion. *Virology*, 385, 24: 13019-13026
- Lamkanfi M., Mueller J.L., Vitari A.C., Misaghi S., Fedorova A., Deshayes K., Lee W.P., Hoffman H.M., Dixit W.M. 2009. Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *The Journal of Cell Biology*, 187: 61-70
- Lu A., Magupalli V.G., Ruan J., Yin Q., Atianand M.K., Vos M.R., Schröder G.F., Fitzgerald K.A., Wu H., Egelman E.H. 2014. Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. *Cell*, 156, 6: 1193-1206
- Lucena Lage S., Longo C., Migliari Branco L., Boccia da Costa T., De Lima Buzzo C., Ramalho Bortoluci C. 2014. Emerging Concepts about NAIP/NLRC4 Inflammasomes. *Frontiers in Immunology*, 5: 309, doi.org/10.3389/fimmu.2014.00309: 10 str.
- MacDonald J.A., Wijakoon C.P., Liao K.C., Muruve D.A. 2013. Biochemical and structural aspects of the ATP-binding domain in inflammasome-forming human NLRP proteins. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 65: 851-862
- Mariathasan S., Weiss D.S., Newton K., McBride J., O'Rourke K., Roose-Girma M., Lee W.P., Weinrauch Y., Monack D.M., Dixit V.M. 2006. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, 440, 7081: 228-232
- Martin B.N., Wang C., Willette-Brown J., Herjan T., Gulen M.F., Zhou H., Bulek K., Franchi L., Sato T., Alnemri E.S., Narla G., Zhong X.P., Thomas J., Klinman D., Fitzgerald K.A., Karin M., Nuñez G., Dubyak G., Hu Y., Li X. 2014. IKK α negatively regulates ASC-dependent inflammasome activation. *Nature Communications*, 5: 4977, doi:10.1038/ncomms5977: 14 str.
- Martinon F., Pétrilli V., Mayor A., Tardivel A., Tschopp J. 2006. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*, 440: 237-241

Master S.S., Rampini S.K., Davis A.S., Keller C., Ehlers S., Springer B., Timmins G.S., Sander P., Deretic V. 2008. *Mycobacterium tuberculosis* prevents inflammasome activation. *Cell Host & Microbe*, 3, 4: 224-232

Miao E.A., Alpuche-Aranda C.M., Dors M., Clark A.E., Bader M.W., Miller S.I., Aderem A. 2006. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1 β via Ipaf. *Nature Immunology*, 7, 6: 569-575

Misawa T., Takahama M., Kozaki T. H. Lee, Zou J., Saitoh T., Akira S. 2013. Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nature Immunology*, 14: 454-460

Muñoz-Planillo R., Kuffa P., Martínez-Colón G., Smith B.L., Rajendiran T.M., Núñez G. 2013. K $^{+}$ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity*, 38, 6: 1142-1153

Muruve D.A., Pétrilli V., Zaiss A.K., White L.R., Clark S.A., Ross P.J., Parks R.J., Tschoopp J. 2008. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature*, 452, 7183: 103-107

Nelson A.R., Borland L., Allbritton N.L., Sims C.E. 2007. Myristoyl-Based Transport of Peptides into Living Cells. *Biochemistry*, 46, 51: 14771-14781

Palacios-Rodríguez Y., García-Laínez G., Sancho M., Gortat A., Orzáez M., Pérez-Payá E. 2011. Polypeptide modulators of caspase recruitment domain (CARD)-CARD-mediated protein-protein interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 52: 44457-44466

Perregaux D., Gabel C.A. 1994. Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 269: 15195-15203

Rathinam V.A., Vanaja S.K., Fitzgerald K.A. 2012. Regulation of inflammasome signaling. *Nature Immunology*, 13, 4: 333-342

Schroder K., Tschoopp J. 2010. The inflammasomes. *Cell*, 140, 6: 821-832

- Shi J.Q., Zhang C.C., Sun X.L., Cheng X.X., Wang J.B., Zhang Y.D., Xu J., Zou H.Q. 2013. Antimalarial drug artemisinin extenuates amyloidogenesis and neuroinflammation in APPswe/PS1dE9 transgenic mice via inhibition of nuclear factor- κ B and NLRP3 inflammasome activation. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 19, 4: 262-268
- Srimathi T., Robbins S.L., Dubas R.L., Chang H., Cheng H., Roder H., Park Y.C. 2008. Mapping of POP1-binding site on pyrin domain of ASC. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 22: 15390-15398
- Stehlik C., Fiorentino L., Dorfleutner A., Bruey J.M., Ariza E.M., Sagara J., Reed J.C. 2002. The PAAD/PYRIN-family protein ASC is a dual regulator of a conserved step in nuclear factor kappaB activation pathways. *The Journal of Experimental Medicine*, 196, 12: 1605-1615
- Stehlik C., Dorfleutner A. 2007. COPs & POPs: Modulators of Inflammasome Activity. *The Journal of Immunology*, 179, 12: 7993-7998
- Uhlig T., Kyprianou T., Martinelli F.G., Oppici C.A., Heiligers D., Hills D., Calvoa X.R., Verhaert P. 2014. The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation. *EuPA Open Proteomics*, 4: 58-69
- Vajjhala P.R., Mirams R.E., Hill J.M. 2012. Multiple binding sites on the pyrin domain of ASC protein allow self-association and interaction with NLRP3 protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 287, 50: 41732-41743
- Walker J.E., Saraste M., Runswick M.J., Gay N.J. 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO Journal*, 1, 8: 945-951
- Xing L., Remick D.G. 2007. Promoter elements responsible for antioxidant regulation of MCP-1 gene expression. *Antioxidants and Redox Signaling*, 9, 11: 1979-1989
- Yang C.S., Kim J.J., Kim T.S., Lee P.Y., Kim S.Y., Lee H.M., Shin D.M., Nguyen L.T., Lee M.S., Jin H.S., Kim K.K., Lee C.H., Kim M.H., Park S.G., Kim J.M., Choi H.S., Jo E.K. 2015. Small heterodimer partner interacts with NLRP3 and negatively regulates activation of the NLRP3 inflammasome. *Nature Communications*, 6: 6115, doi:10.1038/ncomms7115: 11 str.

Youm Y.H., Nguyen K.Y., Grant R.W., Goldberg E.L., Bodogai M., Kim D., D'Agostino D., Planavsky N., Lupfer C., Kanneganti T.D., Kang S., Horvath T.L., Fahmy T.M., Crawford P.A., Biragyn A., Alnemri E., Dixit V.D. 2015. The ketone metabolite β -hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nature Medicine*, 21, 3: 263-269

Young J.L., Sukhova G.K., Foster D., Kisiel W., Libby P., Schönbeck U. 2000. The serpin proteinase inhibitor 9 is an endogenous inhibitor of interleukin 1 β -converting enzyme (caspase-1) activity in human vascular smooth muscle cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 191, 9: 1535-1544

Zhou R., Yazdi A.S., Menu P., Tschoopp J. 2011. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, 469, 7329: 221-225

ZAHVALA

Svojemu mentorju prof. dr. Petru Dovču se zahvaljujem za prevzem mentorstva moje magistrske naloge in za njen natančen pregled.

Iskrena hvala moji somentorici dr. Ivi Hafner Bratkovič za uvajanje v svet imunološkega raziskovanja, za vse nasvete in zanimiva razpravljanja o inflamasomu ter nenazadnje za kritičen pregled spisane naloge.

Zahvaljujem se prof. dr. Gregorju Anderluhu za hiter in natančen pregled naloge.

Iskrena hvala prof. dr. Romanu Jerali, ki mi je omogočil delo v svoji raziskovalni skupini.

Za številne kreativne razprave in prijetno vzdušje v pisarni se zahvaljujem "sostanovalkam" v sobi "*Ad Futura*" Tini Tinkari Peternelj, Moniki Avbelj in Karen Butina.

Najlepša hvala Ireni Škraba, Dariji Oven in Robertu Bremšaku za tehnično podporo.

Hvala vsem sodelavcem in študentom v Laboratoriju za biotehnologijo za ustvarjanje stimulativnega, a hkrati sproščenega raziskovalnega vzdušja.

Hvala vsem profesorjem in asistentom študija biotehnologije za kvaliteten in zanimiv študij, ki mi je nedvomno dal dobro podlago za nadaljnjo akademsko pot.

Predvsem pa neizmerna hvala moji družini, staršem in sestri Staši, za vse.